



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de Doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL

**Estudio y caracterización de un perfil de miRNAs  
en el líquido peritoneal de pacientes con  
endometriosis para su posterior validación como  
herramienta diagnóstica y/o pronóstica y su  
relación con el estatus de fertilidad**

AUTOR

**Moisés Barceló Molina**

DIRECTORES/AS

**Dra. Aitana Braza Boïls**

**Dr. Juan Gilabert Estellés**

Valencia 2023



INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

**Director (es) / Codirector (es):**

1.- Apellidos y nombre: Aitana Braza Boïls N.I.F. 24383027-Z, Departamento/Instituto: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Departamento: Unidad de Cardiopatías Familiares y Muerte Súbita Centro: Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

2.- Apellidos y nombre: Juan Gilabert Estellés N.I.F. 24360447-C, Departamento/Instituto: Servicio de Obstetricia y Ginecología. Centro: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

**Tutor o tutora (si procede)**

Apellidos y nombre: [REDACTED].N.I.F. [REDACTED], Departamento/Instituto: [REDACTED] Centro: [REDACTED]

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: “**Estudio y caracterización de un perfil de miRNAs en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis para su posterior validación como herramienta diagnóstica y/o pronóstica y su relación con el estatus de fertilidad**”

de D. Moisés Barceló Molina,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe **favorable** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 29 de diciembre de 2022

Fdo.: Dra. Aitana Braza Boïls

Firmado digitalmente por AITANA|BRAZA|BOILS  
Fecha: 2022.12.29 13:43:45 +01'00'

Director/a

Fdo.: Dr. Juan Gilabert Estellés

Firmado digitalmente por JUAN|GILABERT|ESTELLES  
Fecha: 2022.12.29 16:15:58 +01'00'

Director/a

ESCUELA DOCTORAL  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de Doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL

**Estudio y caracterización de un perfil de miRNAs  
en el líquido peritoneal de pacientes con  
endometriosis para su posterior validación como  
herramienta diagnóstica y/o pronóstica y su  
relación con el estatus de fertilidad**

AUTOR

**Moisés Barceló Molina**

DIRECTORES/AS

**Dra. Aitana Braza Boïls**

**Dr. Juan Gilabert Estellés**

Valencia 2023





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis que después de tanto tiempo me han ayudado a terminar este proyecto. Gracias Dra. Braza y Dr. Gilabert por vuestro trabajo, dedicación y confianza depositada. Mis compañeros del IIS La Fe, Ana, que tantos momentos hemos pasado juntos, risas, congresos, cafés y habitaciones compartidas. A Josep (Xavi) por tantas horas y trabajo compartido y Manu que tanto nos alegraba las mañanas de bancada de laboratorio. A Toni (Dr. Moscardó) que tanto humor aportaba.

A la Dra. Zorio, por sus proyectos motivadores, a la Dra. Estellés, por aportarnos su serenidad, experiencia y conocimientos. No puedo olvidar a la EGES, dirigida por el Dr. Gilabert y el Dr. Gilabert-Aguilar que financiaron mi estancia en el grupo.

No puedo no acordarme de mis amigos los biólogos que tanto me han preguntado y animado a terminar este proyecto, Cosme, Majo, Blanca, Pili, Ángela, David, Marmaneu Katy. Usua y Sandra que sin ser biólogas y justo del gremio opuesto también son parte de mí. Gracias Samu, tú también formas parte de esto.

Me gustaría tener unas palabras de recuerdo a mis queridas Verónica y Laura que tan fácil me lo han puesto estos últimos meses, es un orgullo decir que sois mis jefas, pero lo es más decir que sois amigas. Y como no a mis compis del CEBAT que tanta guardia me habéis hecho y tantos ánimos me aportasteis en la recta final para que yo pudiera terminar esto, Marta, Natalia, Triana, Maru y Olvido.

Pero sin duda hay dos personas que me han motivado y apostado por mi hasta el final, Mi Madre y Padre, gracias por ser y por todo lo que soy yo, sin vosotros no podría haber llegado hasta este punto. Y como no a mi otra mitad, mi Hermana Gloria, que este año ha estirado del carro como nadie, gracias también a Fran, por formar parte de esta familia. Tíos, primas y mis abus, gracias por confiar en mí.

## ABREVIATURAS

ACA45 (Small Cajal body-specific RNA 45)  
AGO1 (argonaute RISC component 1)  
AGO2 (argonaute RISC component 2)  
ASRM (American Society for Reproductive Medicine)  
C (cytosine)  
CAF-1(Chromatin assembly factor 1)  
CAP (Catabolite Activator Protein)  
CCR4 (Carbon Catabolite Repression 4)  
CD-X (CD-X Lymphocytes)  
DBR1 (debranching enzyme (*S. Cerevisiae*) homolog 1)  
DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8)  
DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)  
DICER (Double-stranded RNA-specific endoribonuclease)  
DNAsa (deoxyribonuclease)  
DROSHA (Double-strand RNA-specific endoribonuclease)  
EGF (Epidermal growth factor)  
EIF1A (Eukaryotic translation initiation factor 1A)  
EIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E)  
EIF4G (Eukaryotic translation initiation factor 4 G)  
EP (Endometriosis Profunda)  
G (Guanine)  
GDP (Guanosine diphosphate)  
GTP (Guanosine-5'-triphosphate)  
GW182 (Genome-wide protein).  
IL-X (Interleukin-X)  
INF- $\gamma$  (Interferon-X)  
ISH (In situ Hybridization)  
LNA (Locked Nucleic Acid)  
LP (Líquido Peritoneal)  
LPC (Líquido peritoneal de pacientes)



LPP (Líquido peritoneal de controles)

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant protein-1)

MIP1b (Macrophage inflammatory protein 1b)

miRNA (micro- RNA)

MMP3 (Matrix Metalloproteinase-3)

NK (Natural Killer)

NOT (*Negative On TATA-less*)

PABPC1 (Polyadenylate-Binding Protein 1)

PAI-1 (Plasminogen Activator inhibitor-1)

PCA (Principal Component Analysis)

PCR (Polymerase chain reaction)

PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

PRKRA (Protein Kinase Interferón-inducible double stranded RNA dependent Activator)

RAN (RAs-related nuclear protein)

RANTES (Regulated upon Activation Normally T-Expressed and presumably Secreted)

RISC (RNA-induced silencing complex)

RNA (Ribonucleic Acid)

RNAasa (Ribonuclease)

RNAm (messenger RNA)

RNAnc (non-coding Ribonucleic Acid)

RNAt (Transfer Ribonucleic Acid)

snoRNAs (Small nucleolar RNAs)

ssRNA (Single-stranded RNA)

TNF-  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor)

TRBP (Transactivation Response RNA-Binding Protein)

TSP-1 (Thrombospondin 1)

uPA (urokinase-type plasminogen activator)

UTR (unstranlated región)

VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A)

# ÍNDICE



- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**
- 3. MATERIAL Y MÉTODOS**
- 4. RESULTADOS**
- 5. DISCUSIÓN**
- 6. CONCLUSIONES**
- 7. BIBLIOGRAFÍA**
- 8. ANEXOS**

# ÍNDICE

<b>1.1 DEFINICIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 TIPOS DE ENDOMETRIOSIS .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 HISTOLOGIA DE LA ENDOMETRIOSIS .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 ETIOPATOGENIA .....</b>	<b>8</b>
1.4.1 TEORIAS BASADAS EN EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS EN ENDOMETRIO UTERINO.....	9
I) TEORÍA DE LA MENSTRUACIÓN RETRÓGRADA .....	9
II). TEORÍA DE LA DISEMINACIÓN LINFÁTICA, VASCULAR O NERVIOSA. ....	11
1.4.2 TEORIAS BASADAS EN EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS EN ENDOMETRIO EXTRAUTERINO .....	11
I). TEORIA DE LA METAPLASIA CELÓMICA.....	11
II). TEORIA DE LA INDUCCIÓN .....	12
III). TEORIA DE LOS RESTOS EMBRIONARIO MÜLLERIANOS.....	12
IV). TEORIA DE LAS CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA .....	12
<b>1.5 ARNs NO CODIFICANTES .....</b>	<b>13</b>
1.5.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS RNA no codificantes: Proyecto ENCODE .....	15
1.5.2 miARNs .....	16
1.5.3. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs .....	17
A) VÍA CANÓNICA DE BIOGÉNESIS DE miRNAs.....	17
B) VÍA NO CANÓNICA .....	21
1.5.4 miRtrones .....	21
1.5.5 Procesamiento de miRNAs independientes de DICER .....	22
1.5.6 miRNAs derivados de RNA nucleolares pequeños .....	22
1.5.7 miRNAs derivados de RNAt .....	24
1.5.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS miRNAs.....	25
1.5.9 LOCALIZACIÓN DE LOS miRNAs EN EL GENOMA .....	29
1.5.10 NOMENCLATURA DE LOS miRNAs.....	30
1.5.11 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS miRNAs.....	31
1.5.11 miRNAs COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD .....	35
1.5.12 miRNAs Y SU ROL EN PATOLOGÍAS GINECOLÓGICAS.....	37
A) miRNAs Y CÁNCER ENDOMETRIAL.....	38
A) miRNAs Y CÁNCER DE CUELLO UTERINO .....	40
B) miRNAs Y CÁNCER DE OVARIO .....	41
C) miRNAs Y ENDOMETRIOSIS .....	42

<b>1.6 miRNAs CIRCULANTES PROPUESTOS COMO BIOMARCADORES DE ENDOMETRIOSIS.....</b>	<b>45</b>
<b>1.7 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE PERITONEAL EN LA ENDOMETRIOSIS.....</b>	<b>48</b>
1.7.1 COMPOSICIÓN DEL LIQUIDO PERITONEAL.....	49
1.7.2 VOLUMEN DEL LÍQUIDO PERITONEAL.....	53
<b>2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 GRUPOS CLÍNICOS.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 LUGARES DE EJECUCIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3 MUESTRAS DE LÍQUIDO PERITONEAL.....</b>	<b>64</b>
<b>3.4 METODOLOGÍA.....</b>	<b>67</b>
3.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DEL LÍQUIDO PERITONEAL.....	67
3.4.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES Y LA CALIDAD DEL RNA.....	68
3.4.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA LOS ARRAYS. ARRAY DE EXPRESIÓN DE miRNA (Affymetrix GeneChip miRNA 4.0).....	69
3.4.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS (Partek Genomic Suite®).....	71
I) Clústers jerárquicos.....	71
II) Componentes principales del análisis (PCA).....	72
III) Vulcano plots.....	72
IV) ANOVA.....	73
V) PCA ( <i>Principal Component Analysis</i> ).....	73
3.4.5 ANÁLISIS IN SÍLICO PARA VALIDACIÓN Y SELECCIÓN DE MIRNAS MADUROS.....	74
I) miRDB.....	74
II) TargetScan.....	75
3.4.6 VALIDACIÓN POR qRT- PCR.....	78
3.4.7 CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS.....	80
<b>3.4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>80</b>
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE miRNAs EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 VALIDACIÓN DE LA SELECCIÓN DE MIRNAS POR qRT-PCR.....</b>	<b>93</b>
<b>4.3 NIVELES PROTEICOS EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES COMPARADOS CON LOS NIVELES PRESENTES EN EL LÍQUIDO PERITONEAL DE LOS CONTROLES... 94</b>	<b>94</b>
<b>4.4 CONTENIDO DE miRNAs EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES Y CONTROLES SEGÚN LAS FASES DEL CICLO MENSTRUAL.....</b>	<b>95</b>
<b>4.5 VALIDACIÓN DE LOS NIVELES DE miRNAs EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES Y CONTROLES DE ACUERDO CON LAS FASES DEL CICLO.....</b>	<b>97</b>

<b>4.6 ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO EN EL LÍQUIDO PERITONEAL EN FUNCIÓN DEL LA FASE DEL CICLO MESNTRUAL.....</b>	<b>100</b>
<b>4.7 ANÁLISIS SEGÚN EL ESTADO DE SEVERIDAD DE LA ENDOMETRIOSIS.....</b>	<b>104</b>
4.7.1 VALORES DE LOS NIVELES DE MIRNAS SEGÚN EL ESTADIO DE LA PATOLOGÍA .....	104
4.7.2 NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y PROTEOLÍTICOS EN LP EN FUNCIÓN DEL ESTADIO DE LA ENFERMEDAD .....	105
I) ANÁLISIS DE LOS miRNAs SEGÚN EL ESTATUS DE FERTILIDAD. ....	106
<b>4.8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES PROTEICOS SEGÚN EL ESTATUS DE FERTILIDAD....</b>	<b>108</b>
I) CORRELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS EVALUADOS. ....	110
<b>5.DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>126</b>
<b>7.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>131</b>
<b>8.ANEXOS.....</b>	<b>177</b>





# ÍNDICE DE TABLAS

## INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Teorías etiopatogénicas clásicas. ....	9
---	---

## MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 2. Número de pacientes y controles, edad media y estatus de fertilidad. ....	62
Tabla 3. Valores de progesterona y estradiol por fase del ciclo. ....	63
Tabla 4. Número de pacientes según fase del ciclo menstrual. ....	63
Tabla 5. Número total de pacientes y controles incluidas en el estudio de miRNAs en el líquido peritoneal, así como la clasificación por estadios de estos.....	66
Tabla 6. Número total de pacientes incluidas en el estudio de los niveles de proteínas en el líquido peritoneal, así como la clasificación por estadios de los mismos.....	66
Tabla 7. Bases de datos para dianas de miRNAs validadas/ predichas. ....	74
Tabla 8. Recopilación de las dianas predichas y validadas de los miRNAs. ....	77
Tabla 9. Dianas validadas de los miRNAs que no presentan diferencias significativas en los niveles de expresión entre controles y pacientes. ....	78

## RESULTADOS

Tabla 10. Número de muestras seleccionadas para el array con medias de edad. ....	85
Tabla 11. miRNAs seleccionados para el array. ....	87
Tabla 12. miRNAs seleccionados por su importancia en la patología.....	87
Tabla 13. miRNAs seleccionados para su validación por RT-qPCR.....	91
Tabla 14. miRNAs seleccionados a partir de la experiencia previa del grupo para su posterior validación por qRT-PCR. ....	92
Tabla 15. Niveles de miRNAs en LPP (estadios I-II y III- IV) y en LPC.....	104
Tabla 16. Niveles de metabolitos en LPP (estadios I-II y III- IV) y en LPC.....	105

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura 1. Tres ejemplos de las formas más comunes de endometriosis.....	3
Figura 2. Distribución de los órganos afectados por EP (12) .....	4
Figura 3. Glándula endometrial. ....	4
Figura 4. Tipos de lesiones peritoneales.....	6
Figura 5. Clasificación de los grados de la endometriosis según la ASRM.....	8
Figura 6. Dogma central de la biología molecular .....	14
Figura 7. Tipos de RNAs no codificantes (RNAnc).....	15
Figura 8. Proceso de biogénesis de los miRNAs. ....	20
Figura 9. Características anatómicas de los snoRNA de C/D y H/ACA. ....	23
Figura 10. miRNAs dependiente de tRNasa Z.....	24
Figura 11. Mecanismos de acción de los miRNA en el proceso de silenciamiento génico una vez iniciado el proceso de traducción. ....	27
Figura 12. Mecanismos de acción de los miRNA en el proceso de silenciamiento génico antes del inicio de la traducción. ....	28
Figura 13. Diagrama <i>de</i> flujo del trabajo en un estudio clásico de miRNAs.(120).....	32

## MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 14. Lugares de realización. ....	64
Figura 15. Protocolo de recogida de muestras de líquido peritoneal.....	65
Figura 16. Protocolo de extracción del RNA. ....	67
Figura 17. Fundamentos experimentales de un Microarray de oligonucleótidos de ADN. ....	70
Figura 18. Sitios predichos de complementariedad en la secuencia del miRNA (TargetScan).....	76
Figura 19. Esquema de miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR System .....	79

## RESULTADOS

Figura 20. Analisis de los componentes principales .....	86
Figura 21. Vulcano plot del contraste controles vs pacientes.....	88
Figura 22. Vulcano plot del contraste controles vs pacientes con miRNAs. ....	89
Figura 23. Clúster jerárquico supervisado. ....	90
Figura 24. Niveles de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes (EPF) y controles (CPF).....	93
Figura 25. Niveles proteicos en líquido peritoneal de pacientes (EPF) y controles (CPF). ....	94
Figura 26. Clúster jerárquico supervisado de los niveles de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes y controles según la fase del ciclo menstrual.....	95
Figura 27. Vulcano plots de los arrays de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes y controles por fase del ciclo menstrual. ....	96

<b>Figura 28. Niveles de miRNAs (A- miR-106-3p; B- miR-130a-3p; C- miR-150-5p; D- 451a; E- miR486-5p), en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual .....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 29. Niveles de miRNAs (A -miR-29c-3p; B -miR-185-5p; C- miR-195-5p) en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. ....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 30. Niveles del miRNA miR-1343 en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. ....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 31. Niveles de proteínas en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. ....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 32. Niveles de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes y controles de acuerdo con el estatus de fertilidad. ....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 33. Niveles factores angiogénicos y proteolíticos en líquido peritoneal de pacientes y controles de acuerdo con el estatus de fertilidad. ....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 34. Niveles factores angiogénicos y proteolíticos en líquido peritoneal de pacientes y controles de acuerdo con el estatus de fertilidad. ....</b>	<b>110</b>

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 DEFINICIÓN

La endometriosis es una patología ginecológica benigna que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial en localizaciones extrauterinas, es decir, tejido estromal y glándulas endometriales en localizaciones ectópicas.

Generalmente, las localizaciones extrauterinas de estos implantes endometriales suelen ser la cavidad peritoneal, los ovarios (endometriomas) y el tabique recto-vaginal (nódulos) [1]. Cabe destacar, que se han descrito implantes endometriósicos en otras localizaciones menos frecuentes como en el pericardio, pleuras o cerebro [2], pulmones [3] o hígado [4].

Es una patología estrógeno-dependiente que afecta a las mujeres que se encuentran en su etapa reproductiva y que conlleva asociado dolor pélvico y en algunos casos cuadros de esterilidad. Se trata de una patología altamente incapacitante por los episodios de dolor que experimentan estas pacientes, así como en su repercusión en las probabilidades de embarazo.

La endometriosis ha sido clasificada como una patología ginecológica benigna cuya prevalencia se estima entre un 10-15 % en la población general y que llega a alcanzar un 30% en las mujeres con problemas de esterilidad y un 50% en aquellas pacientes en las que se dan a la vez esterilidad y dolor pélvico crónico [5].

Además de los diversos síntomas clínicos de la patología (dispareunia, dismenorrea, dolor pélvico crónico, sangrado uterino irregular) [6] se ha observado que las pacientes con endometriosis pueden tener un mayor riesgo de padecer cáncer de ovario o de mama [7].

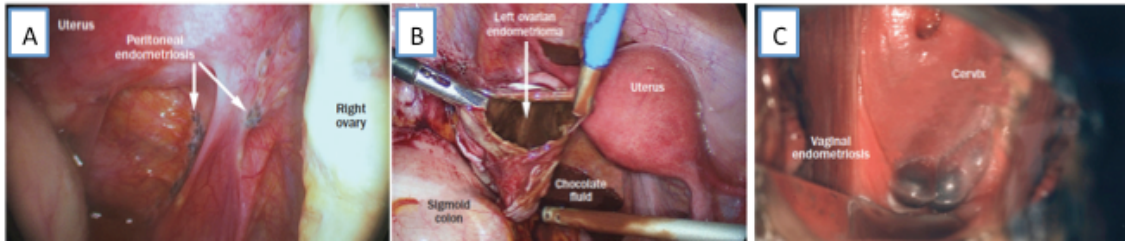


## 1.2 TIPOS DE ENDOMETRIOSIS

Clínicamente podemos distinguir tres formas de endometriosis o implantes endometrióticos [7].

- **1. Endometriosis peritoneal:** se define como la presencia de implantes endometrióticos en la superficie del peritoneo o en los ovarios. Estos implantes se caracterizan por la presencia de numerosas glándulas endometriales y estroma distribuidas por la cavidad peritoneal o bien adheridas a la capa serosa de los órganos abdominales, siempre con una profundidad inferior a 5mm [8] **(Figura 1A)**.
- **2. Quistes endometrióticos o endometriomas:** es la presencia de implantes endometrióticos en localización ovárica que por un proceso de menstruación cíclica produce lesiones quísticas de contenido denso procedente de la hemólisis de los restos hemáticos contenidos bajo la cortical ovárica [9] **(Figura 1B)**.
- **3. Endometriosis profunda:** es definida como la presencia de lesiones endometrióticas que infiltran en el peritoneo o el órgano afecto al menos 5mm en profundidad. Se manifiestan como lesiones sólidas en que el tejido endometriótico se combina con el tejido adiposo y fibro-muscular. Su localización más frecuente es entre el recto y la vagina, el denominado tabique rectovaginal [1] **(Figura 1C)**.

Todas estas lesiones son variantes del mismo proceso patológico que puede ser originado por diversos mecanismos. Si bien es cierto, que las tres lesiones comparten como características histológicas comunes la presencia en todas ellas de estroma endometrial o células epiteliales, así como sangrado crónico y signos de inflamación.



**Figura 1. Tres ejemplos de las formas más comunes de endometriosis.** A) Implantes endometrióticos peritoneales en el ligamento útero-sacro derecho. B) Endometrioma ovárico en el ovario izquierdo. C) Nódulos endometriósicos en el área recto-cervical. (Imágenes cedidas por el Dr. Gilabert-Estellés).

En el caso de la endometriosis peritoneal podemos distinguir dos variantes; por un lado, hablaremos de endometriosis peritoneal superficial en aquellos casos en las que los implantes endometriósicos no superen una profundidad de 5mm. Por otro lado, aquellas lesiones en las que el tejido endometriósico ectópico supere los 5mm por debajo de la superficie peritoneal (retroperitoneo) recibirá el nombre de endometriosis profunda (EP). En la EP se verán afectas las capas más superficiales (serosas) así como las capas musculares llegando en algunas ocasiones a las mucosas [10].

Se ha propuesto [11] que el término de EP se aplique únicamente en aquellas lesiones que cumplan las siguientes condiciones:

- Lesiones ubicadas en el retroperitoneo.
- Que dichas lesiones se encuentren localizadas en ubicaciones diferentes de la endometriosis común.
- Que afecten a diferentes órganos pélvicos (intestino, uréter, vejiga, tabique recto-vaginal) pudiendo alterar la calidad de vida de la mujer por la presencia de dolor abdominal severo.

En términos de localización de estas lesiones profundas, la ubicación más frecuente es el compartimento posterior (fondo del saco de Douglas; 55%) seguido del compartimento lateral (ligamentos útero sacros; 35%) y finalmente podemos encontrar en el compartimento anterior (repliegue besico vaginal; 11%). Los órganos y estructuras afectados se ha comprobado que siguen la siguiente distribución en cuanto a términos de afectación [12] (**Figura 2**).

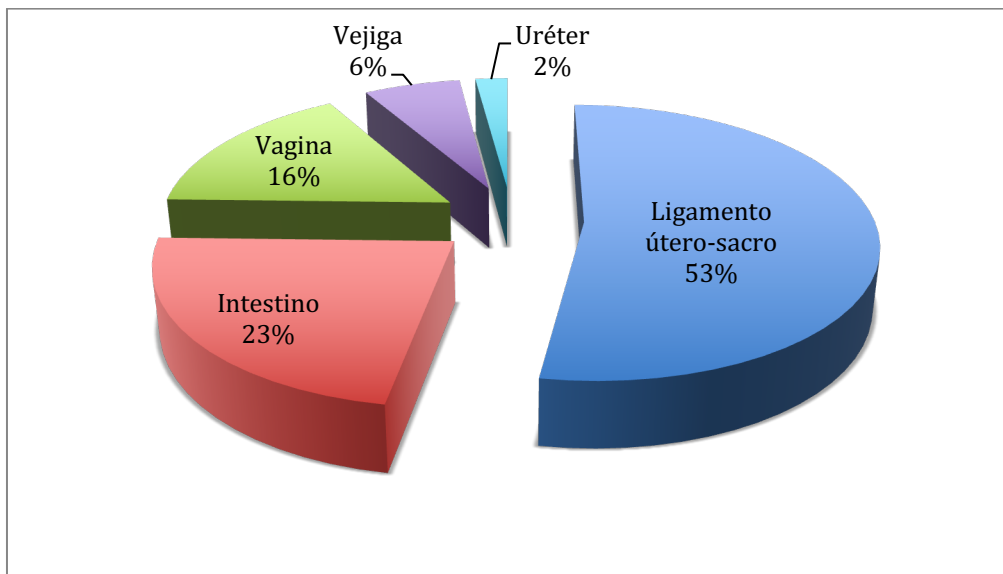


Figura 2. Distribución de los órganos afectados por EP [12]

### 1.3 HISTOLOGIA DE LA ENDOMETRIOSIS

Clásicamente, desde un punto de vista histológico, la endometriosis se ha definido como la presencia de glándulas endometriales y estroma en localización ectópica, fuera de la cavidad uterina [13] (**Figura 3**).

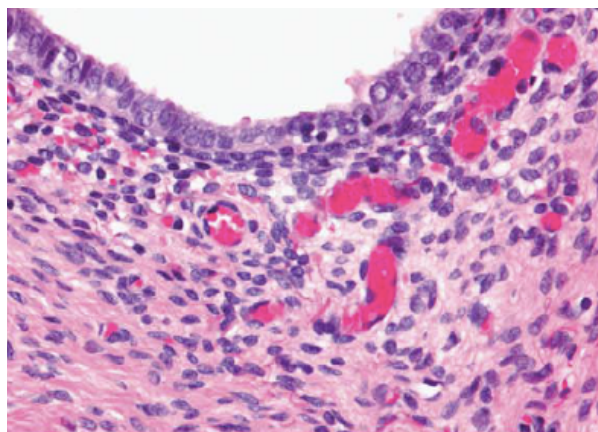


Figura 3. Glándula endometrial. Se observa una glándula endometrial con una pequeña capa periglandular de estroma endometriótico que contiene vasos sanguíneos dilatados [13].

Los estudios histológicos de las lesiones endometrióticas han podido corroborar que dichas lesiones son diferentes en función del tipo de lesión [13].

En el caso de la **endometriosis peritoneal** podemos distinguir 3 tipos de lesiones en función del grado de desarrollo de esta.

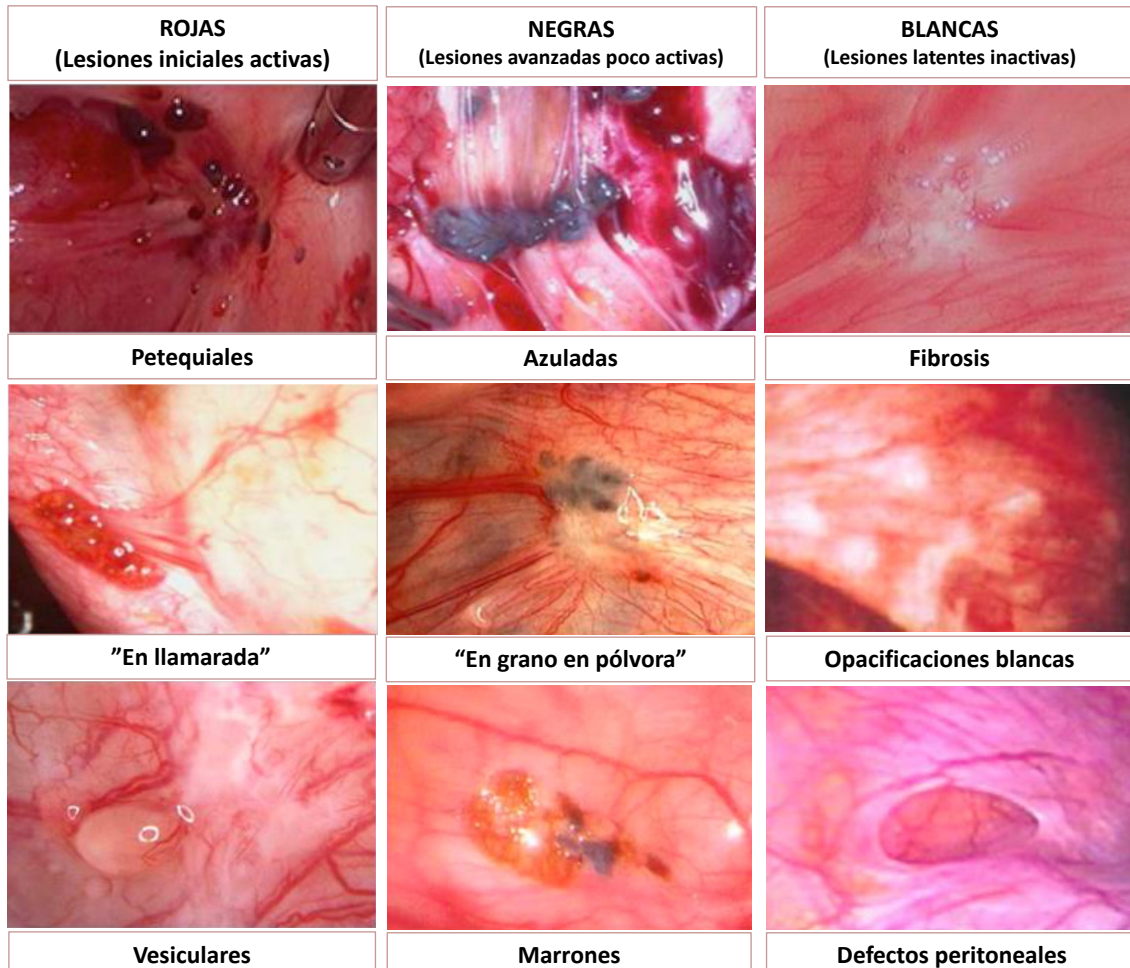
1. **Lesiones rojas:** Son lesiones correspondientes a los estadios iniciales de la enfermedad. Se las ha nombrado así por su color rojo brillante que procede de la prominente red vascular entre el estroma recientemente implantado hacia la superficie y las capa peritoneal y subperitoneal. La vascularización de los implantes peritoneales es uno de los aspectos más importantes para permitir el desarrollo del subsiguiente tejido glandular endometrial. Además, en estas lesiones encontramos una moderada actividad proliferativa que junto con la detección en el líquido peritoneal de metaloproteinasas de matriz (degradan el colágeno y permiten la remodelación de la matriz intercelular) facilitan la diseminación de los implantes a otras zonas del peritoneo [14].

En este estadio inicial, estos implantes guardan estrechas similitudes con el endometrio eutópico en cuanto a segregación de factores de crecimiento endotelial y presencia de receptores en superficie de estrógeno y progesterona.

En este estadio también se corresponde a la endometriosis inicial, activa o funcionante.

2. **Lesiones negras:** después de la fase inicial de adhesión de las células endometriales a la membrana basal, es necesario que se produzca una degradación parcial de forma continua de dichos implantes y posteriormente un nuevo crecimiento. Se produce una cicatrización periférica que congestiona el implante y da un aspecto engrosado a las glándulas, con un color más oscuro (**Figura 4**) debido a que su interior queda pigmentos sanguíneos encerrados. En estas lesiones el proceso de vascularización es menor que en el caso de las lesiones rojas, predominando procesos inflamatorios, hemorragias y fibrosis. Se trata de lesiones menos activas que no van a responder a la acción hormonal bien sea endógena o exógena. Estas lesiones corresponden a formas intermedias caracterizando un cuadro de endometriosis avanzada poco activa [15].

**3.Opacificaciones / lesiones blancas:** son lesiones inactivas, que se consideran cicatrizadas, en reposo o latentes (**Figura 4**). Caracterizadas por estar compuestas en su mayor parte por tejido fibroso, aunque en algunas ocasiones pueden tener pequeñas estructuras glandulares con escaso corion citogénico y tejido fibroso cicatriza. Estamos entonces ante una endometriosis latente o inactiva.



**Figura 4. Tipos de lesiones peritoneales.** Se suelen dividir en implantes activos, intermedios o no activos; o bien en implantes típicos ("en grano de pólvora") o atípicos [16].

Existe otra clasificación para las lesiones peritoneales siendo esta la que las distingue entre típica o atípicas. En el caso de las lesiones típicas son las lesiones que llamamos negras o en "quemadura de pólvora" que son las que siempre se han vinculado más con la endometriosis.

Por otro lado, las lesiones atípicas también aparecen con cierta frecuencia pudiendo presentar aspectos variados como podrían ser lesiones rojas (peteciales, polipoides,

vesiculares, hemorrágicas o en llamarada) lesiones negras (pardas o marrones) o lesiones blancas (fibróticas, opacificaciones blancas, adherencias y defectos peritoneales) compuestas por áreas y fibrosas y cicatrización [17,18].

En el caso de la **endometriosis ovárica**, esta se encuentra caracterizada por focos superficiales (recuerda a la endometriosis peritoneal) así mismo también es frecuente encontrar morfologías de quistes achocolatados y endometriomas.

Los nódulos endometriósicos profundos se encuentran caracterizados por la presencia de células de músculo liso y reacción fibrosa y son pocas las células endometriales que encontramos en estas lesiones. De hecho, esta presencia de células glandulares inmersas en matriz muscular ha sido descrita por algunos autores como una adenomiosis retroperitoneal [19].

Hoy en día los especialistas manejan muchas y muy diversas clasificaciones de la patología, aunque ninguna de ellas llega a establecer una correlación entre estadios, tipos y gravedad de los síntomas que manifiestan las pacientes. Del mismo modo que ninguna clasificación clarifica el pronóstico de la patología ni a nivel reproductivo ni evolutivo.

De la variedad de clasificaciones que existen la más conocida y empleada por los facultativos especialistas es una revisión de la propuesta por la *American Society For Reproductive Medicine (ASRM)* de 1996 (**Anexo 1**). Esta versión supone un actualización de la propuesta por la *American Fertility Society (AFS)* (**Anexo 2**) de 1979, ya que la de la ASRM contempla la morfología, invasión del tejido y ubicación anatómica de la lesión. Según la clasificación de la ASMR la endometriosis quedaría estratificada en los 4 grados que se recogen en la **Figura 5**.



Figura 5. Clasificación de los grados de la endometriosis según la ASRM.

#### 1.4 ETIOPATOGENIA

Hoy en día no existe una hipótesis clara que consiga explicar la etiopatogenia de la endometriosis. Actualmente se considera que el origen de la enfermedad es multifactorial, continuando por discernir el origen principal.

Son muchas las teorías que se han ido postulando a lo largo de la historia de esta patología que buscaban dar una explicación a su origen.

A continuación, se recogen en la **Tabla 1** las principales teorías que explican el origen de la endometriosis.

TEORIAS SOBRE EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS	
ORIGEN BASADO EN EL ENDOMETRIO UTERINO O TEORÍAS DE DISEMINACIÓN	ORIGEN BASADO EN ENDOMETRIO EXTRAUTERINO O TEORIAS DE LA TRANSFORMACIÓN
IMPLANTACIÓN (MENSTRUACIÓN RETRÓGRADA)	MÉDULA ÓSEA (CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES, HEMATOPOYÉTICAS O ENDOTELIALES)
DISEMINACIÓN VESICULAR, LINFÁTICA O NERVIOSA	RESTOS MULERIANOS
	METAPLASIA CELÓMICA
	INDUCCIÓN

**Tabla 1. Teorías etiopatogénicas clásicas.** Teorías basadas en que el origen de la endometriosis es en endometrio uterino o teorías de diseminación (columna izquierda). Teorías basadas en que el origen se encuentra en endometrio extrauterino o teorías de transformación celular (columna derecha).

#### 1.4.1 TEORIAS BASADAS EN EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS EN ENDOMETRIO UTERINO

##### I) TEORÍA DE LA MENSTRUACIÓN RETRÓGRADA

Propuesta por Sampson en el 1927 [20], es la teoría que actualmente más aceptada está. Dicha teoría propone que durante la menstruación existe un reflujo de células endometriales que viajan a través de las trompas de Falopio hasta la cavidad peritoneal. Una vez se encuentran en el espacio del peritoneo, dichas células tienen la capacidad de adherirse, proliferar y llevar a cabo toda una serie de procesos angiogénicos que les van a permitir sobrevivir [20]. Esta teoría propone entonces, que dichas células suponen un autotransplante, en el que parte del tejido endometrial eutópico se trasplanta a ubicaciones ectópicas del cuerpo.

Esta teoría se ve respaldada por una serie de estudios:

A) Se plantea un reflujo de células endometriales durante la menstruación, prácticamente en todas las mujeres en la que células de endometrio eutópico viajen a través de las trompas de Falopio [21]. Se ha visto que este reflujo está estadísticamente relacionado con el hiperperistaltismo uterino [22]. En este punto, las células endometriales refluidas que se encuentran en la cavidad peritoneal se encuentran en



condiciones de adherirse, invadir, implantarse y proliferar. En diversos estudios se discernió que estas células endometriales refluidas tenían la capacidad de adherirse al peritoneo porque presentaban en su superficie integrinas (moléculas de adhesión) [23–25]. Una vez estas células de endometrio eutópico conseguían adherirse, ponen en marcha todo un proceso de remodelación para poderse implantar. Esta capacidad se la confieren las metaloproteasas que presentan, cuya función será degradar la membrana basal y otros componentes de la matriz extracelular, imprescindibles para comenzar todo el proceso de remodelación celular [26] Por otro lado, además de todo el proceso de remodelación celular y con el fin de asegurar la supervivencia de dichos implantes se ha visto que estas células producen una gran cantidad de factores angiogénicos imprescindibles para la neovascularización. [27–29].

B) La manera en la que encontramos distribuidas las lesiones endometriósicas también suponen un punto de apoyo para esta teoría. Los implantes endometriósicos se encuentran más comúnmente en regiones caudales debido al efecto de la gravedad y en contacto con el reflujo tubárico, estas localizaciones son en los ovarios y en la hoja posterior del ligamento ancho [27]. Además, en el caso de las lesiones endometriósicas profundas también se cumple esta regla ya que las zonas más comunes donde podemos encontrar estos implantes son las zonas posteriores de la pelvis (fondo del saco de Douglas y la región del tabique rectovaginal [12].

Según estudios llevados cabo por el grupo de Linda Giudice [7], queda patente que cerca del 90% de las mujeres presentan menstruación retrógrada, no todas ellas sufren endometriosis, esto nos evidencia que deben existir otros mecanismos que impiden que las células endometriales migradas se implanten.

Otro punto débil de esta teoría radica en que mediante estos postulados no somos capaces de dar una explicación a la presencia de endometriosis fuera de la cavidad peritoneal. Por otro lado, son muchas las dudas que surgen de como esta teoría de la menstruación retrógrada podría dar explicación al hecho de encontrar lesiones endometriósicas en recién nacidos, en la etapa menopaúsica de las mujeres, en mujeres sin útero o incluso en varones [30].

## II). TEORÍA DE LA DISEMINACIÓN LINFÁTICA, VASCULAR O NERVIOSA.

Esta teoría comparte con la anterior en que fragmentos de endometrio eutópico migrarán a otras zonas del cuerpo mediante diferentes vías, entre las cuales se han propuesto que lo pueden hacer a través de los vasos sanguíneos, vasos linfáticos [31] incluso se ha podido encontrar que las fibras nerviosas sirven como canal de diseminación [32]. Estos estudios permiten explicar cómo podemos encontrar lesiones endometriósicas en otras localizaciones abdominales o extra-abdominales.

La evidencia que más refuerza esta teoría de las vías alternativas de diseminación de endometrio eutópico es la presencia de endometrio ectópico en localizaciones muy distantes del útero como pulmón, cerebro o hueso [33].

### 1.4.2 TEORIAS BASADAS EN EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS EN ENDOMETRIO EXTRAUTERINO

#### I). TEORIA DE LA METAPLASIA CELÓMICA

El término metaplasia en el campo de la histología se conoce como un cambio histológico de un epitelio maduro en otro de un tipo diferente. De manera que un cambio metaplásico supone un paso atrás en el proceso de diferenciación y especialización celular, generalmente hacia formas más primitivas para posteriormente evolucionar, madurando hacia otra clase de celular [34].

La metaplasia celómica está basada; en que tanto el endometrio como el epitelio que recubre la superficie ovárica podrían tener un mismo precursor embrionario derivado del epitelio celómico y que ambos podrían sufrir procesos metaplásicos hasta transformarse en tejido endometrial [35].

Se ha propuesto como agentes causales de dicha metaplasia a las dioxinas externas. Con esta teoría se podría dar explicación al fenómeno que, pese a que la mayoría de las mujeres presentan menstruación retrógrada, tan solo una pequeña parte de ella padece endometriosis, así como mujeres que puedan desarrollar la enfermedad aun en ausencia de la menstruación [36].

## II). TEORIA DE LA INDUCCION

Esta teoría se trata de una ampliación de la teoría de la metaplasia celómica ya que postula que las células del peritoneo podrían llegar a transformarse en células endometriales por metaplasia, siempre que este cambio fuera originado por un estímulo de diferente naturaleza ya fuera inmunológico, hormonal o incluso genético [37,38].

## III). TEORIA DE LOS RESTOS EMBRIONARIO MÜLLERIANOS

Dentro del proceso del desarrollo del aparato genital, las células que conforman los conductos Müller sufren un proceso de migración, dicho proceso puede tener como consecuencia la presencia de células remanentes müllerianas en sitios ectópicos, las cuales, mantienen su capacidad de diferenciación en respuesta al estímulo estrogénico. Esta teoría propone que bajo la influencia de los estrógenos al inicio de la pubertad o bien como respuesta a agonistas estrogénicos, las células müllerianas ectópicas avanzan hacia el desarrollo de lesiones endometriósicas [39,40].

## IV). TEORIA DE LAS CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA

Dicha teoría propone que células progenitoras (células madre) que provienen de la médula ósea (células tipo mesenquimal o endotelial) podrían a través de la circulación, diferenciarse en tejido endometrial ubicándose en distintas localizaciones [30,41,42]. Esto explicaría por que pueden tener endometriosis pacientes sin útero o hombres con cáncer de próstata, así como pacientes sometidos a tratamientos con dosis elevadas de estrógenos.

Existen teorías que combinan postulados de varias de las anteriores ya que por sí mismas no pueden dar lugar a una explicación completa de la etiopatogenia de la endometriosis [43,44].

Actualmente, se proponen diferentes orígenes para cada una de las manifestaciones clínicas de la endometriosis. Así, para explicar las endometriosis peritoneales la teoría que más se ajusta es la de la implantación. Por el contrario, la endometriosis profunda donde las lesiones se sitúan principalmente en el tabique rectovaginal, algunos autores

proponen que pudiera deberse a procesos metaplásicos que sufren los restos müllerianos localizados en el septo rectovaginal [8]. No obstante, también hay discrepancia entre los diferentes autores ya que otros autores ante el mismo tipo de lesión proponen que se producen como consecuencia del reflujo menstrual y que posteriormente este endometrio ectópico en función de su agresividad y de la respuesta inflamatoria que es capaz de desencadenar, van infiltrando los distintos órganos en los que se localizan los implantes [11].

### 1.5 ARNs NO CODIFICANTES

Basándonos en el dogma central de la biología molecular (**Figura 6**), sabemos que en las células eucariotas los genes contienen la información necesaria para codificar las proteínas. Propuesta por Crick en 1970. Este dogma nos dice que la información genética contenida en el ADN que se encuentra en el núcleo es transcrita a una molécula monohebra que contiene los tripletes de bases nitrogenadas que corresponden con los codones que codifican para cada aminoácido, y sólo sabíamos que nuestro material genético se transcribía a proteínas. Esto se dio por sentado hasta que en 1965 se descubrió el primer fragmento de ARN no codificante. Este fragmento que no codificaba para ninguna proteína correspondía a un RNAt (ARN de transferencia) para la alanina descubierto en levadura común [45]. Desde entonces, el conocimiento y los papeles que estos fragmentos no codificantes desempeñan han experimentado un gran aumento. También se ha visto que estos fragmentos desempeñan roles fundamentales en la regulación génica, a diferentes niveles [46].

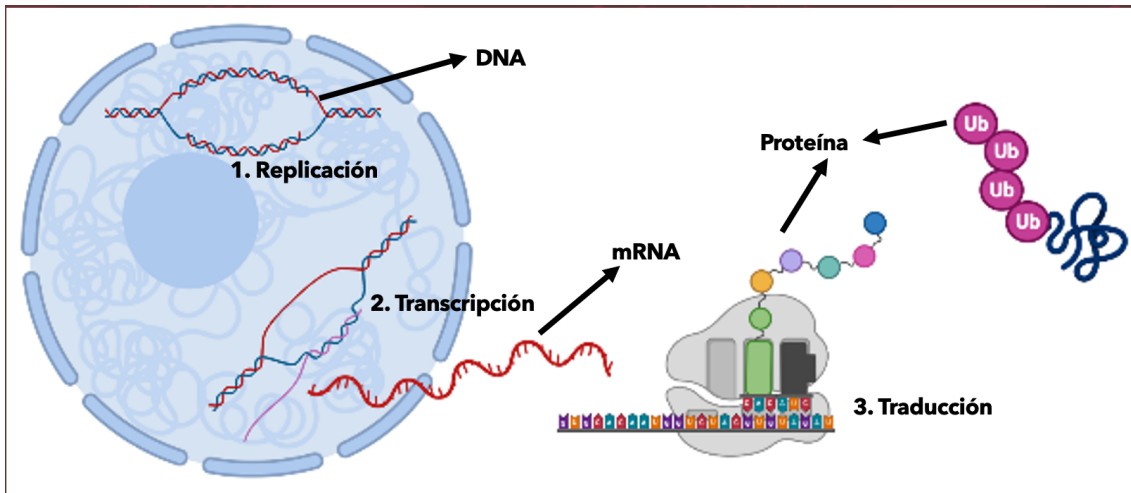


Figura 6. Dogma central de la biología molecular

Hoy en día ya se considera que el RNA no es una simple molécula mensajera entre el DNA y las proteínas, ya que son muchas las evidencias de que estas moléculas juegan roles nuevos como moléculas reguladoras de la organización del genoma y de la expresión génica. Los RNAnc (ARN no codificantes) desempeñan sus funciones reguladoras a diferentes niveles, incluso a nivel epigenético se ha visto que son capaces de controlar la diferenciación celular e incluso se les ha relacionado con diferentes patologías.

Se ha visto que los RNAnc son reguladores clave en la expresión génica, en la estabilidad del genoma e intervienen en la defensa de la inserción de elementos genéticos exógenos en el genoma propio (**Tabla 2**). Cabe destacar que los RNA no codificantes que se encuentran codificados en el genoma nunca llegan a ser proteínas, demostrándose así que estas moléculas podían cumplir una gran diversidad de funciones que para nada eran las que se esperaban desde un primer momento [47].

## Non-coding transcriptome

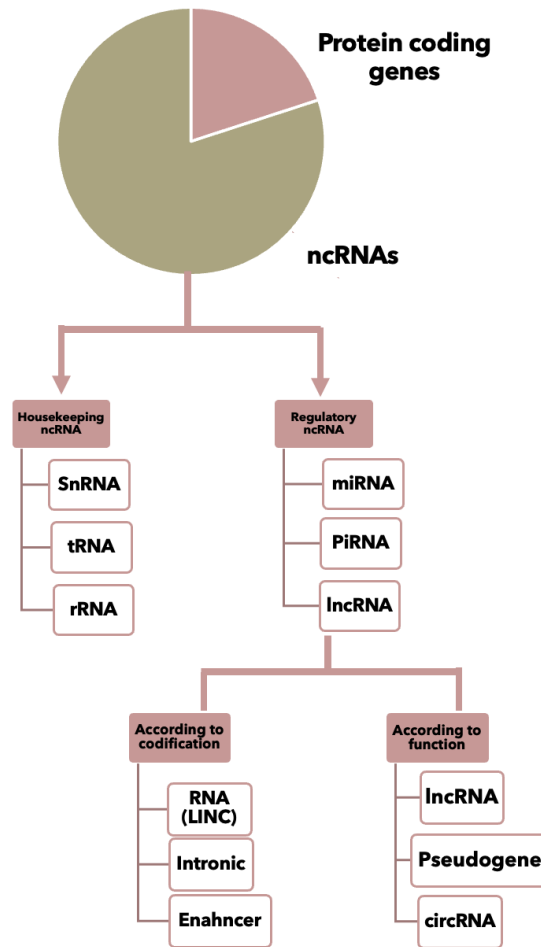


Figura 7. Tipos de RNAs no codificantes (RNAnc). Modificado de Piquer-Gil M et al [48].

### 1.5.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS RNA no codificantes: Proyecto ENCODE

Como ya hemos dicho los ARNnc son fragmentos de RNA que son transcritos a partir del DNA pero que estos no son traducidos en proteínas. La principal función de los ARNnc es regular la expresión genética a nivel transcripcional y post-transcripcional.

A su vez los RNAnc se pueden dividir en dos grandes familias; RNAnc estructurales o RNAnc reguladores. Dentro de los RNAnc reguladores los podemos clasificar en función de su longitud en RNAnc cortos (< de 30 nucleótidos) o RNAnc largos (> de 200 nucleótidos) [49]. La cantidad de RNAnc que hay codificados en el genoma humano se desconoce, aunque estudios bioinformáticos recientes han descrito la secuencia de miles de ellos [50]. Una gran aportación de la identificación de dichos RNAnc ha sido la

*ENcyClopedia of DNA Elements (ENCODE <http://www.genome.gov/enccode/>)* creada en 2003. Las conclusiones sobre este proyecto piloto fueron publicadas en junio del 2007 [51–53].

El proyecto ENCODE se centró en definir los fragmentos de RNA, identificar los sitios reguladores de unión donde se unían en diferentes tipos de células y que funciones realizaban como reguladores y a que niveles desde distintas aproximaciones, a) nivel genómico, se encontraron elementos funcionales donde mutaciones y modelos *knock-down* demostraron fenotipos asociados a la secuencia genómica, b) permitían ver la conservación evolutiva como indicador de las secuencias funcionales y además, c) desde una vertiente bioquímica sirvió para caracterizar la actividad de los ARNnc en tipos celulares específicos y procesos moleculares concretos [54].

Diferentes estudios bioinformáticos sobre regulación génica y metabolismo y procesado de RNA han descrito una nueva variedad de secuencias no codificantes, que incluyen promotores, *enhancers* (sitios de unión), silenciadores y genes de RNAnc. Estos elementos no codificantes están asociados con la cromatina o con diferentes mecanismos que regulan la transcripción, como por ejemplo intervienen modificando las histonas, en la metilación del DNA, en como de accesible esté el DNA a la DNAsa [55–57].

La mayoría de los RNAnc se pueden considerar como secuencias estructurales. Los RNAs pequeños son capaces de modificar la estructura de la cromatina y silenciar la transcripción guiando al complejo argonauta hacia las cadenas de RNA complementario recién sintetizado bloqueándolo, o mediando la metilación de las histonas.

### 1.5.2 miARNs

Será en el 1993 cuando los investigadores Víctor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum, en un estudio llevado a cabo con el gene *lin-4* que controlaba los tiempos del desarrollo larvario de *Caenorhabditis elegans* describirían el primer microRNA (miRNA) cuya función era la de reprimir la expresión de *lin-4*. Así desde ese momento se abrió una nueva línea de investigación en la regulación de la expresión genómica [52,53].

Se definió entonces a los miRNA como pequeños RNAm de unas 21-22 nucleótidos capaces de regular la expresión génica y que desempeñan papeles fundamentales regulatorios en una gran cantidad de procesos biológicos [58–61]

Los miRNA eran capaces de inhibir la traducción de cientos de RNAm ya que eran capaces de unirse a una secuencia específica de la molécula de RNAm (*seed sequence*) y según el grado de complementariedad que presentaran se puede llegar a la inhibición de la traducción o a la degradación de la molécula de RNAm [36,58,60,61].

Posteriores estudios funcionales de los miRNAs arrojaron luz sobre la influencia reguladora en que estos RNAm tenían sobre secuencias dianas localizadas tanto en genes relacionados con determinados procesos fisiológicos, así como patológicos incluyendo como objeto de regulación de estas determinadas patologías ginecológicas entre las que se encuentra la endometriosis [49,62–66].

Es importante destacar algunos aspectos de los miRNAs como que son específicos de cada tipo de tejido; además se ha descrito que se unen a las regiones 3' UTR de los mRNAs pudiendo así unirse a estas regiones una gran diversidad de miRNAs, y por último también se sabe que un miRNA puede tener la capacidad de unirse como elemento regulador a cientos de mRNA diferentes. Por lo que se llegó a la conclusión que cambios en el perfil de expresión de miRNAs de una célula podía afectar a muchísimas funciones celulares [58,62–64,67,68].

### 1.5.3. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs

#### A) VÍA CANÓNICA DE BIOGÉNESIS DE miRNAs

Para explicar la biogénesis de los miRNAs o microRNAs debemos remontarnos a las primeras observaciones que el científico Víctor Ambros [58] y sus colaboradores, pioneros en este campo Rosalind Lee [52] y Rhonda Feinbaum [53] hicieron con el gen *lin-4* de *C. elegans*.

Se conocía que era un gen que intervenía en el desarrollo larvario de *C. elegans*, sin embargo, este gen no codificaba ninguna proteína. En lugar de ello producía un par de pequeñas moléculas de RNA [52]. Una de estas moléculas de RNA contenía aproximadamente 22 nucleótidos, la otra molécula era un poco más larga alcanzando



los 61 nucleótidos. Los autores propusieron que la molécula más larga (plegada en bucle) podría ser el precursor a partir del cual se formaría la otra molécula más corta. En los laboratorios de Ambros y Ruvkun [69] se dieron cuenta entonces, que los RNAs procedentes de *lin-4* tenían múltiples sitios anti-sentido complementarios en la región 3' UTR con el gen *lin-14* [52,69]. Esta complementariedad en la región 3' UTR, fue propuesta como una posible mediación de la represión de *lin-14* por el producto génico de *lin-4* [69]. Sería el laboratorio de Ruvkun [69] quien llegó a demostrar la importancia de esta complementariedad en la regulación de *lin-14* por *lin-4*, mostrando que esta regulación reducía considerablemente la cantidad de proteína LIN-14 sin un cambio significativo en los niveles del mRNA para *lin-14*.

A partir de estos experimentos iniciales se comenzó a discernir el proceso por el cual se podían formar los miRNA. Se ha visto que los los miRNAs se encuentran codificados principalmente en regiones intergénicas o intrones de sus genes diana. En estos casos un miRNA se transcribe al mismo tiempo que su gen huésped, de manera que le proporciona una regulación acoplada de ambos. Otros pri-miRNA pueden estar codificados en regiones intrónicas de genes que codifiquen para proteínas o no o incluso también en exones de miRNAs largos que no codifican para proteínas. Sin embargo, otros miRNA muestran un promotor común formando así unidades policistrónicas conteniendo muchos bucles que podrán ser procesados a miRNAs maduros [50].

El proceso de biogénesis de los miRNA (**Figura 8**) comprende un conjunto de etapas secuenciales partiendo desde el mi RNA primario hasta que llega a ser un mi RNA maduro. Este proceso se inicia en el núcleo de las células y termina en el citoplasma de las mismas, lugar donde realizará su función. Se transcriben gracias a la acción de la RNA polimerasa II, que sintetiza una molécula larga de RNA que puede llegar a alcanzar una longitud de una kilo base; esta molécula recibe el nombre de miRNA primario (pri-RNA). Este transcrito primario tiene una estructura llamada “horquilla-tallo-bucle” (del inglés “hairpin-stem-loop”), la cual sufrirá un proceso de corte en el núcleo por una endonucleasa llamada RNA polimerasa III, también conocida como Drosha [53,70,71] que está asociada a la proteína DGCR8 en mamíferos (del inglés *DiGorge síndrome critical región gene 8 protein*) o Pasha en *Drosophila* y *C.Elegans*. La función de Drosha junto con su cofactor DGCR8 es cortar de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios

cercanos a la base de la estructura primaria en forma de horquilla, el resultado de dicho corte será el pre-miRNA cuya longitud variará entre los 60-70 nucleótidos. La proteína DGCR8 interactúa con los pri-miRNAs a través de los segmentos de ssRNA y el tallo [53,72]. A continuación, el pri-miRNA será exportado al citoplasma a través del complejo dependiente de RAN-GTP que es la exportina-5 [73,74].

Una vez dicha molécula se encuentra en el citoplasma, la molécula de GTP (*Guanosine-5'-triphosphate*) será hidrolizada a GDP (*Guanosine diphosphate*) y el pre-miRNA será entonces liberado del complejo exportador. Posteriormente, esta molécula será cortada por la endonucleasa RNAasa III (ribonucleasa) también conocida como Dicer, que se encuentra asociada a las proteínas TRBP (del inglés "Transactivation Response RNA-Binding Protein") y a la proteína quinasa activadora dependiente de RAN de cadena doble inducible por interferón (PRKRA, del inglés *protein kinase interferón-inducible double stranded RNA dependent activator*) en mamíferos que formará el complejo de procesamiento de pre-miRNAs.

El resultado de la acción de este complejo será a una molécula de doble cadena conocida como miRNA dúplex; con una longitud de unos 22 nucleótidos [75]. Posteriormente, este complejo se ensambla con la proteína Argonauta 2, para formar el complejo silenciador inducido por mi RNAs (miRISC del inglés *miRNA-induced silencing complex*). Este último paso definirá los extremos 3' y 5' de un fragmento y los 5' y 3' de la hebra complementaria [57]. Seguidamente Dicer transfiere el mi RNA dúplex a la proteína AGO (Argonauta) que es el núcleo de RISC (del inglés "*RNA-Induced Silencing Complex*"). En este momento, dicho complejo recibe el nombre de pre-RISC. El RISC maduro se consigue una vez que se elimina una de las dos hebras del RNA dúplex y este proceso recibe el nombre de selección de hebras (**Figura 8**).

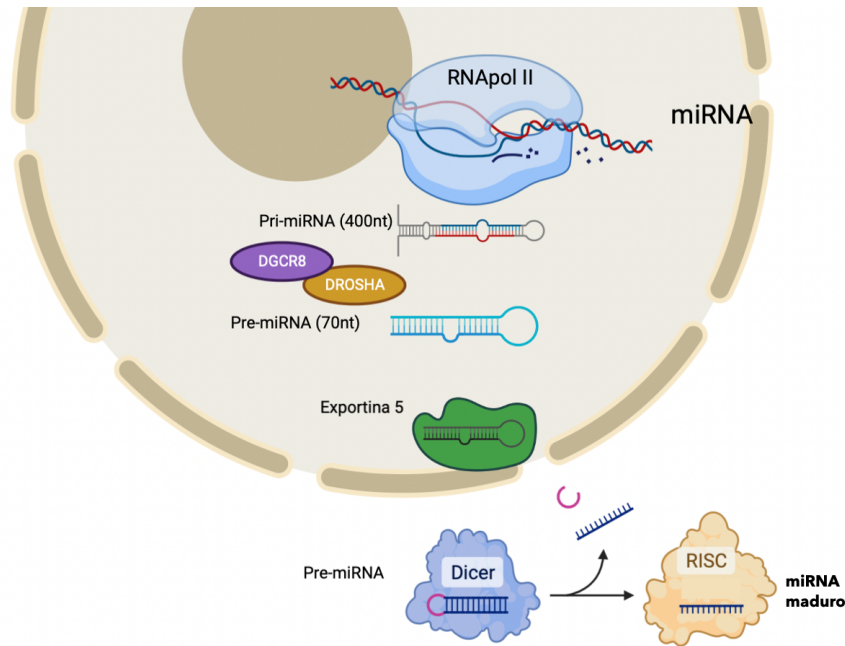


Figura 8. Proceso de biogénesis de los miRNAs.

El factor determinante del proceso de “selección de hebra” parece ser un factor termodinámico, determinado principalmente por el orden de los cuatro primeros nucleótidos del RNA-dúplex. Por tanto, el extremo que contenga interacciones más débiles se desenrollará preferentemente y permanecerá, es la llamada “hebra líder” mientras que la otra hebra denominada “hebra pasajera” no será seleccionada [74].

El complejo RISC maduro posee la capacidad de hacer un barrido por el espacio citoplasmático en busca de un RNAm capaz de experimentar complementariedad con el miRNA que lleva cargado. El emparejamiento del miRNA con el RNAm quedará determinado por las interacciones de Watson-Crick entre la región 3’UTR (región no traducida) del RNAm una región corta de nucleótidos en las posiciones 2 a 8 del miRNA conocida como la “seed sequence”. Además de este tipo principal de interacción entre el ARNm y el miRNA, también se ha estudiado y definido por poseer un relevante interés clínico [75] el apareamiento del miRNA con la región 5’UTR y que nucleótidos cercanos a la secuencia “seed” también pueden influir en la determinación del destino RNAm [60].

Existe la opción de que un único pre-miRNA pueda convertirse en múltiples miRNAs maduros mediante el mecanismo de “splicing” alternativo. Estos diferentes miRNAs

maduros que proceden del mismo pre-miRNA reciben el nombre isomiR. Como consecuencia de este procesamiento diferencial del RNA precursor puede originar distintas regiones diana o “seed sequence” que se traducirá en la práctica en una diferente afinidad por otros lugares de unión de distintos RNAm que vayan a regular [50,76].

En este contexto, la expresión celular específica de diferentes isomiRs implica una expresión proteica diferente y dependiendo del tipo de célula cada variante de miRNA le conferirá un significado biológico.

## B) VÍA NO CANÓNICA

Se han identificado algunos miRNAs que se generan por una vía de biogénesis diferente a la canónica y que reciben el nombre de miRNAs no canónicos. También se ha relacionado que muchos de estos miRNAs no canónicos se encuentran implicados en diversas patologías humanas, incluido el cáncer [77–80].

### 1.5.4 miRtrones

Recientemente se han identificado diferentes vías de biogénesis de miRNA. Por ejemplo, algunos pri-miRNAs no canónicos están codificados en intrones de genes codificadores y se denominan miRtrones [81]. Todos los miRtrones se procesan inicialmente por la maquinaria nuclear como intrones típicos y forman horquillas estables, pero a diferencia de los pri-miRNAs canónicos, estas horquillas tienen un tallo más corto [82]. La consecuencia del acortamiento de la secuencia es que no pueden ser procesadas por Drosha/DGCR8 (del inglés “*Double-strand RNA-specific endoribonuclease/ DiGeorge syndrome critical region gene 8*”), sino que se someten a un proceso de corte llevado a cabo por la enzima DBR1 (*debranching enzyme S. Cerevisiae homolog 1*) [83].

Posteriormente, y del mismo modo que ocurre con los miRNAs generados por la vía canónica los miRNAs derivados de miRtrones serán exportados al citoplasma desde el núcleo unidos a la proteína exportina 5 y procesados por DICER (del inglés “*Double-stranded RNA-specific endoribonuclease*”).

Recientemente se ha desarrollado un algoritmo que sirve para poder distinguir de manera predictiva que miRNAs han sido generados por la vía canónica y cuáles de ellos derivan de los miRtrones en función de la longitud de la horquilla y el contenido en guaninas y citosinas [84].

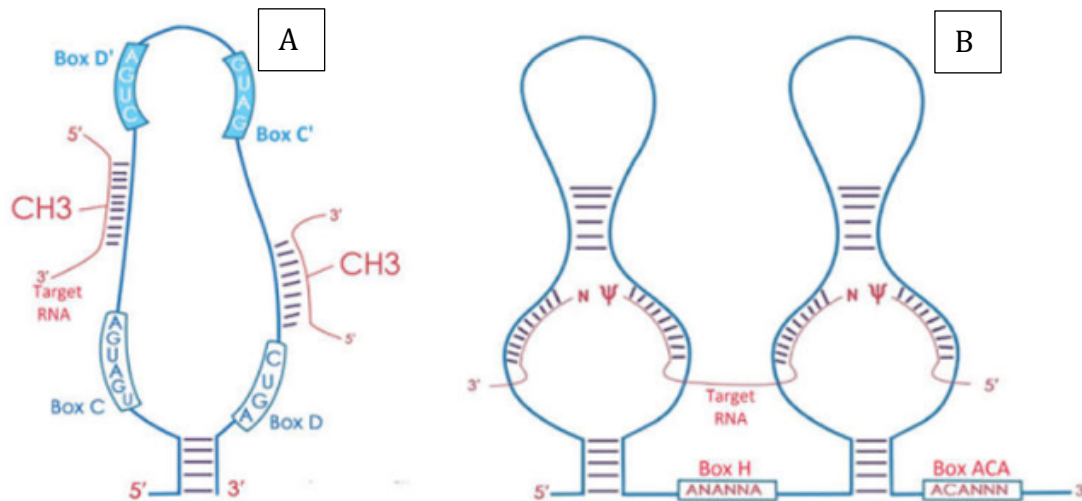
#### 1.5.5 Procesamiento de miRNAs independientes de DICER

Hasta ahora, sólo se ha descrito que existe un miRNA cuyo procesamiento es independiente de DICER. Se trata del pre-miR-451, que presenta una estructura de tallo-bucle, más corta, por lo que no puede ser escindida por DICER y requiere por el contrario de la actividad cortadora de AGO2 para su maduración [85]. El apareamiento de bases imperfecto en el tallo y el bajo grado de contenido GC (guanina y citosina) en el tallo distal de pre-miR-451 son los factores que determinan que su procesamiento sea a cargo de AGO2 que posteriormente cargarlo en el complejo RISC. No podemos olvidar que el factor de iniciación de la traducción en eucariotas (EIF1A) que forma parte de RISC, también es crucial para el correcto procesamiento de miR-451[86].

#### 1.5.6 miRNAs derivados de RNA nucleolares pequeños

Los RNA nucleolares pequeños (snoRNA) son una clase de RNA no codificante que se encuentran en el nucléolo de muchos organismos. Se ha descubierto que se unen a proteínas AGO, en muchos casos interfiriendo con el proceso expresión génica a nivel de traducción del mRNA. Así mismo se ha propuesto que también a su vez son modificadores de RNAr, RNAt y RNAsn [87].

Los snoRNA se clasifican según la presencia de submotivos en clases de caja C/D o caja H/ACA (**Figura 9**) [88].



**Figura 9. Características anatómicas de los snoRNA de C/D y H/ACA.** A) La estructura secundaria de la caja de snoRNA C/D implica secuencias conservadas (caja C y caja D) que se emparejarán con su RNA diana. B) Los snoRNA de H/ACA están formados por dos unidades de horquilla separadas por una bisagra monocatenaria que contiene la caja H. Cada estructura de horquilla está formada por un vástago inferior, una bolsa de pseudouridilación, un vástago superior y un bucle apical. El RNA diana está contenido en el bolsillo de pseudouridilación [88]

También hay muchas moléculas de snoRNA que carecen de cualquier objetivo/ diana por lo que potencialmente siguen vías distintas a las canónicas y poseen otras funciones. Estos snoRNA se han denominado snoRNA huérfanos [89,90]. Se encontraron que algunos snoRNA podían ser una fuente de miRNAs que siguiera la vía canónica en algunos casos [91,92].

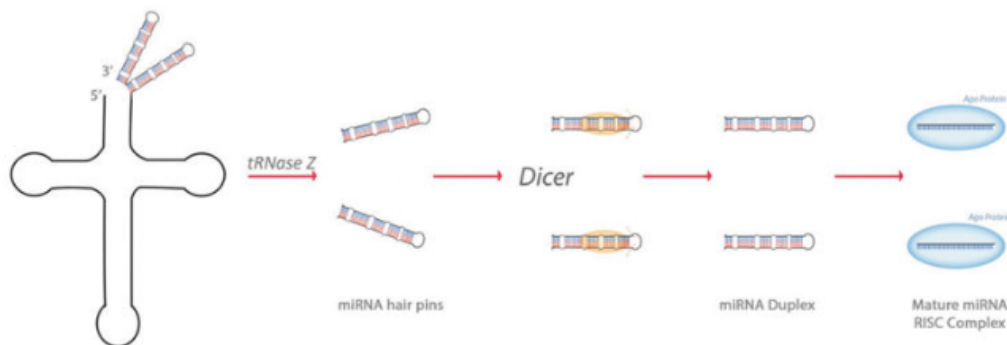
Otro estudio caracterizó al snoRNA GlsR17 de *Giardia lamblia* como un precursor de un miRNA dependiente de Dicer, pero independiente de Drosha / DGCR8 que participa en la represión translacional[92].

Estos estudios han ampliado el conocimiento que poseemos sobre cuáles son las funciones biológicas de los snoRNAs y han puesto de manifiesto que esta familia de pequeños RNAs también es una fuente de miRNA funcionales que se sintetizan por medio de una vía biosintética distinta a la canónica y que cuyo objetivo también es el silenciamiento de la expresión del RNA.

### 1.5.7 miRNAs derivados de RNAt

Se ha observado que una fuente muy distinta de miRNAs generados por vías no canónicas, son los derivados del RNA de transferencia (RNAt) [93] La estructura de hoja de trébol de los RNAt es un sustrato para DICER, que es capaz de escindir el tallo de RNAt en fragmentos de RNA, generando así un RNA derivado de RNAt [94,95].

Estas nuevas líneas de síntesis de miRNAs a partir de un RNAt comenzaron a explorarse poco después del descubrimiento de un miRNA derivado del RNAt de isoleucina. Dichos miRNAs se diferencian de los miRNAs clásicos en la ruta biosintética pero su función es la misma, siguen participando en el silenciamiento de la expresión del mensaje genético. La ruta biosintética de los miRNAs derivados de RNAt surge de que las enzimas de procesamiento de los RNAt como puede ser la RNAtasa Z, son capaces de liberar especies funcionales similares a miRNAs (**Figura 10**).



**Figura 10. miRNAs dependiente de tRNasa Z.** Se cree que estas especies de miRNA son subproductos de la vía de maduración del tRNA. Los pre-miRNAs generados son luego procesados por Dicer en miRNAs maduros. [93].

Uno de los primeros estudios en los que se observaron miRNAs derivados de RNAt fueron los llevados a cabo en células infectadas por VIH. Se detectaron fragmentos de RNA correspondientes a una porción del RNAt-Lys de la célula huésped, que se conoce que es capaz de unirse a un lugar del genoma del VIH para ser utilizado como cebador para la transcriptasa inversa. Se encontró que este RNA de unos 20 nucleótidos aproximadamente se unía a las proteínas AGO2. También se vio que se expresaba proporcionalmente al nivel de expresión de VIH [96].

Otro equipo, que trabajó con célula de carcinoma de próstata humano encontró 17 fragmentos de RNA correspondientes a secuencias de RNAt. Estos fragmentos descubiertos tenían una longitud entre 18-22 nucleótidos y se encontró que derivaban

de los extremos 3' y 5' de los RNAt maduros o de la región final de los RNAt precursores. Uno de dichos fragmentos de RNA descubierto era el tRF-1001 que correspondía al precursor tRNA-Ser-TGA. Se vio que se encontraba muy expresado en varios órganos y dicha tasa de expresión se correlacionó con la tasa de proliferación celular.

Otro estudio mostró que junto con los miRNAs los fragmentos de RNAt eran las principales fuentes de pequeños RNA en las células HeLa inmortales. Se encontró que los cuatro RNAt más abundantes en las células HeLa (RNAt-Lys, RNAt-Val, RNAt-Gln y RNAt-Arg) estaban escindidos en sus extremos 5' por Dicer para producir abundantes fragmentos de RNA de 19 nucleótidos de longitud. Aunque estos fragmentos se generaron por la acción de DICER y se unieron a AGO1 y AGO2 se encontró que eran más sensibles a la disminución de la cantidad de DICER disponible que otros miRNAs. También se vio que su unión a las proteínas AGO eran menos estable que los complejos miRNA-AGO generados por la vía canónica [97].

Todos los estudios anteriores entre otros ponen de manifiesto que los RNAs derivados de RNAt, difieren de las características típicas de los miRNAs de mamíferos. No obstante, desde su descubrimiento se han ido postulando diferentes teorías e hipótesis sobre su función biológica [97].

Todavía hoy en día no se ha dilucidado completamente el mecanismo de acción de estos RNAt, ya que por una parte actúan como sustratos de DICER como se ha visto en las células HeLa, lo que se traduce en una competencia directa con el pre-miRNA por unirse a DICER. Esto podría llevarnos a pensar que en realidad su función es regular la generación de miRNA en lugar de realizar funciones de silenciamiento de la expresión génica propiamente dicho. O, bien por el contrario, podrían ser los responsables de la desregulación de los niveles de miRNA y de la actividad de DICER [93].

#### 1.5.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS miRNAs

Se conoce que estos miRNA silencian la expresión génica post-transcripcionalmente uniéndose principalmente a las regiones 3' no traducidas de su RNAm diana [60]. Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la biogénesis, así como en las innumerables funciones biológicas que realizan los miRNAs, todavía hay mucho



desconocimiento sobre los distintos mecanismos moleculares que permiten a los miRNA silenciar la expresión génica.

Como ya hemos comentado los distintos mecanismos que poseen los miRNAs para regular la expresión génica siguen siendo objeto de estudios. De hecho, actualmente se postulan 4 maneras diferentes por las cuales los miRNAs;

1. Degradación co-traduccional de las proteínas.
2. Inhibición de la elongación
3. Terminación prematura de la traducción (caída del ribosoma)
4. Inhibición del inicio de la traducción

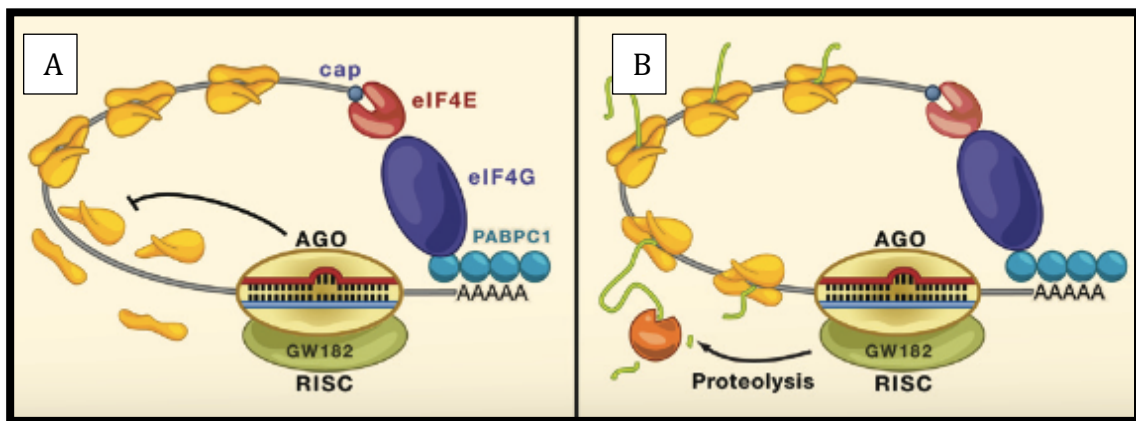
Además, los miRNA en animales pueden inducir una degradación significativa de los mRNA diana (como los miRNA de plantas), a pesar del apareamiento imperfecto mRNA-miRNA.

Sin embargo, el mecanismo de degradación suele ser diferente: los miRNA inducen la degradación de los mRNA diana mediante la eliminación de la caperuza (en el extremo 5') y de la cola de poli-adenina (cola de poly-A) en el extremo 3'UTR [60].

Finalmente, los miRNAs podrían también silenciar sus mRNA dianas secuestrándolos en *loci* (sitios) citoplasmáticos discretos, son los llamados cuerpos de procesamiento de mRNA o cuerpos-P (*P bodies*), que carecen de maquinaria de traducción. Sin embargo, a pesar de las discrepancias existentes entre los diferentes mecanismos propuestos, los apoyos experimentales para cada mecanismo son variados, y son el objeto actual de intensos estudios, para tratar de elucidarlas. Se ha sugerido que las diferencias observadas se deben a deficiencias en los experimentos realizados, en algunos casos originadas por la utilización de modelos erróneos en los estudios de regulación de la traducción [98].

Son varios los estudios actuales realizados en el gusano *C. elegans* así como en diversos estudios realizados con cultivos celulares de mamíferos que demuestran que los miRNAs reprimirían la síntesis de proteínas una vez iniciado el proceso de traducción (**Figura 11**) [99–101] .

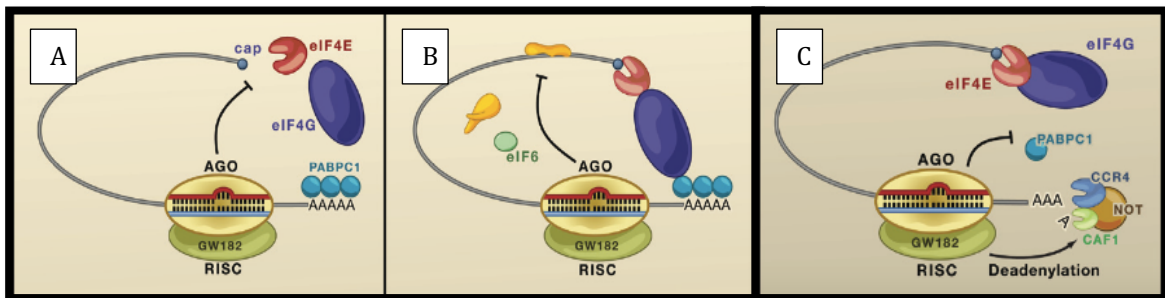
Aunque estos estudios presentan algunas diferencias en cuanto a sus diseños experimentales, las conclusiones a las que llegaron fueron muy similares. En estos estudios observaron que, en gradientes de sedimentación de sacarosa, los miRNAs estaban unidos a sus regiones diana del mRNA en forma de polisomas. Dichos estudios demostraron que estos polisomas traducían activamente dianas de mRNA, aunque se demostró eran sensibles a una variedad de condiciones que podían inhibir la traducción. Entre otros factores que provocan la disociación de los polisomas en monosomas o bien hacen que se separen las unidades ribosomales se encuentran sustancias como el hippuristanol, la puromicina o la pactamicina [100,101].



**Figura 11. Mecanismos de acción de los miRNA en el proceso de silenciamiento génico una vez iniciado el proceso de traducción. A) Mecanismos posteriores a la iniciación. B) Degradación co-traduccional de proteínas [60]** AGO (Proteína argonatura) eIF4E (Factor de Inicio de la traducción) eIF4G (proteína de inicio de la traducción), RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), PABPC1 (proteína de unión a poli-A citoplasmática) GW182 (proteína clave constituyente de los complejos represores de miRNAs).

Como hemos comentado anteriormente una parte de las vías moleculares de regulación se basan en mecanismos posteriores a la iniciación. En la **figura 11A** los miRNA (rojo) reprimen la traducción de los mRNA diana bloqueando el proceso de elongación o bien facilitando la disociación prematura de las subunidades de los ribosomas (del inglés “ribosome drop-off”). En la **figura 11B** observa la degradación co-traduccional de proteínas. Este modelo propone que la traducción no inhibe, sino que la cadena polipeptídica en crecimiento se va degradando co-traduccionalmente debido a la acción de una proteasa.

En contraposición a los estudios anteriores, que defendían que los miRNAs detenían el proceso de traducción una vez éste había sido iniciado, tenemos los estudios llevados a cabo por Pillai *et al* [102] en los que se pone de manifiesto que los miRNA y sus dianas correspondientes en el mRNA no están asociados al inicio de la traducción para realizar su función inhibidora [102–105]. Se observó en los estudios llevados a cabo por Kiriakidou M *et al* [106] que el dominio central de las proteínas argonautas presentaba ciertas similitudes con la secuencia de la proteína de unión al casquete eIF4E (factor de iniciación de la traducción en eucariotas) siendo éste esencial para el inicio del proceso de traducción. Con estos resultados se podía proponer que los miRNAs inhibían la traducción en el paso concreto de reconocimiento de la caperuza por parte de eIF4E (**Figura 12**).



**Figura 12. Mecanismos de acción de los miRNA en el proceso de silenciamiento génico antes del inicio de la traducción.** A-B-C representan los esquemas de modelos de regulación de miRNAs antes de la iniciación del proceso de traducción CCR4 (Carbon Catabolite Repression 4), NOT (Negative On TATA-less) [60].

Diversos mecanismos reguladores por parte de los miRNAs son capaces de inhibir el inicio del proceso de traducción. En el mecanismo representado en la **Figura 12A** se observa como la proteína AGO compite con el eIF4E por unirse a la caperuza 3' (punto azul marcado como CAP) [60].

El mecanismo representado en la **Figura 12B** muestra como las proteínas argonauta reclutan al eIF4G lo que evita que la subunidad mayor del ribosoma se una a la subunidad pequeña del mismo, y ya se conoce que en la subunidad mayor del ribosoma es donde se encuentra el lugar donde se produce el enlace peptídico entre los distintos aminoácidos que conformarán la futura proteína. Y por último el mecanismo representado en la **Figura 12C**. Este procedimiento todavía un poco desconocido se basa

en la capacidad que tienen la proteína argonauta que evita que se ensamblen las subunidades del ribosoma al mRNA mediante un proceso que podría incluir una desadenilación.

Hay diversos estudios que reportan que los miRNAs en animales son capaces de reprimir la traducción sin afectar significativamente a la cantidad de RNAm diana. Sin embargo, aparecieron estudios en los que se puso de manifiesto que los miRNAs en animales inducían una degradación significativa de sus mRNAs [60,107–111]. De acuerdo con los estudios anteriores se comprobó que los niveles de mRNA diana de miRNAs tanto predichos como validados aumentaban en las células en las que de alguna manera quedaba inhibida la vía de actuación de los miRNAs, como por ejemplo porque se hayan agotado las proteínas Dicer o Argonauta [110,111].

La degradación del RNAm mediada por miRNAs requiere a su vez de la proteína AGO, el componente p-body GW182, el complejo desadenilasa CAF1 (*Chromatin assembly factor 1*) -CCR4-NOT y varios activadores más [60,110].

Analizados la gran diversidad de modelos que explican el proceso de represión de la traducción por parte de los miRNAs, podemos pensar que dicha variedad se deba por una parte a los diferentes enfoques experimentales que han llevado al planteamiento de los distintos modelos o bien que realmente los miRNAs silencien la expresión génica a través de múltiples mecanismos.

#### 1.5.9 LOCALIZACIÓN DE LOS miRNAs EN EL GENOMA

Se puede afirmar que la distribución genómica de los genes de miRNAs es, que se encuentran dispersos en todos los cromosomas humanos a excepción del cromosoma Y [112,113]. Se ha visto que los miRNAs codificados por grupos generalmente se encuentran relacionados entre si, lo que podría sugerir que el grupo de genes de miRNAs agrupados estén funcionalmente relacionados, ya que irían destinados al mismo gen o genes diferentes, pero en la misma vía [114].

Inicialmente, se pensó que la mayoría de los genes de miRNAs estaban ubicados en regiones intergénicas [115,116]. Sin embargo, análisis más recientes demostraron que la mayoría de los genes de miRNAs en mamíferos se encontraban en unidades de

transcripción definidas. De este mismo estudio se observó que muchos genes de miRNAs se encontraban en intrones tanto en algunos intrones que por *splicing* alternativo codificaban para proteínas como en otras regiones no codificante [117].

Resumiendo, los miRNAs pueden encontrarse; a) en regiones exónicas, b) en intrones localizados en transcritos codificantes para proteínas, c) en regiones intergénicas, y d) en transcritos de RNAs no codificantes.

#### 1.5.10 NOMENCLATURA DE LOS miRNAs

Los avances en secuenciación masiva aplicados a los miRNA han supuesto un enorme desafío a la hora de nombrarlos. Los criterios y normas para nombrarlos actualmente están definidos por miRBase 21 [118]. Los miRNAs maduros en humanos se ajustan a la siguiente fórmula hsa-miR-XX-39/5p, donde el prefijo se refiere a la especie (por ejemplo, hsa- es para Homo sapiens). Si nosotros escribimos en mayúscula “MIR” estamos refiriéndonos en este caso al gen que codifica para ese miRNA y si queremos expresar las formas inmaduras del miRNA lo nombramos pre-miRNA o pri-miRNA. Distintas secuencias precursoras y *loci* pueden expresar secuencias maduras idénticas muy relacionadas (hsa-miR-121a y hsa-miR-121b) esto son las llamadas familias miR.

Diferentes estudios de clonación algunas veces han identificado que a partir de un mismo pre-miRNA se pueden originar dos secuencias diferentes. La relación entre las dos hebras maduras opuestas puede variar dependiendo de la etapa de desarrollo, llegando a ser diferentemente expresada en distintos tejidos o tipos de célula, así como dependiendo de las condiciones patológica [50,74].

En otras versiones anteriores de dichas reglas para la nomenclatura de los miRNA se distinguía a las cadenas menos expresadas con un asterisco (\*) (hsa-miR-XX\*). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que ambas cadenas son funcionales y que la expresión de un o de la otra depende de tipo celular o del estado en el que se encuentre dicha célula. Esto provocó un cambio de nomenclatura al -5p/-3p que está en uso actualmente.

Además de esta nomenclatura, en miRBase también se identifica a los miRNAs maduros con un número de acceso MIMAT. Por la experiencia que tiene en el grupo en el manejo

de miRNA siempre hemos utilizado y recomendamos el uso en los manuscritos de los sufijos -5p o -3p y si es posible también incluir el número de MIMAT, también solemos incluir la secuencia del oligonucleótido (miRNA) con el fin de poder evitar posibles confusiones si se cambiaran los criterios para la nomenclatura de los miRNAs.

En base a los últimos descubrimientos sobre el origen de los miRNAs, cuáles son sus vías biosintéticas y las variantes que existen de una misma secuencia, Desvignes y sus colaboradores han propuesto una nueva nomenclatura revisada de los miRNAs con nuevos criterios con el fin de compaginarlos con los hallazgos más recientes. Dichos autores propusieron modificar la nomenclatura de los miRNAs no solo basándose en la biogénesis de estos sino también en su función [50].

#### 1.5.11 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS miRNAs

Generalmente, en los estudios clásicos de miRNAs se suelen llevar a cabo tres fases. La primera fase comprendería el objetivo de evaluar el perfil de expresión de miRNAs donde compararíamos un grupo patológico con un grupo control.

El segundo paso o fase de validación tendría por finalidad corroborar los resultados de la elaboración de los perfiles de miRNAs tanto del grupo patológico como el grupo control. Este segundo paso también recibe el nombre de validación, porque vamos a validar la expresión de algunos de los miRNAs seleccionados (según los que sean de nuestro interés) en una cohorte más grande de muestras. Y por último para terminar el estudio con miRNAs resulta interesante diseñar y llevar a cabo estudios funcionales con el fin de validar la regulación de un RNAm específico por su miRNA.

En la **Figura 13** se resumen las distintas técnicas aplicadas en el estudio de los miRNAs, aunque las técnicas más utilizadas para el estudio de los perfiles de expresión de miRNAs son la secuenciación y los microarrays.

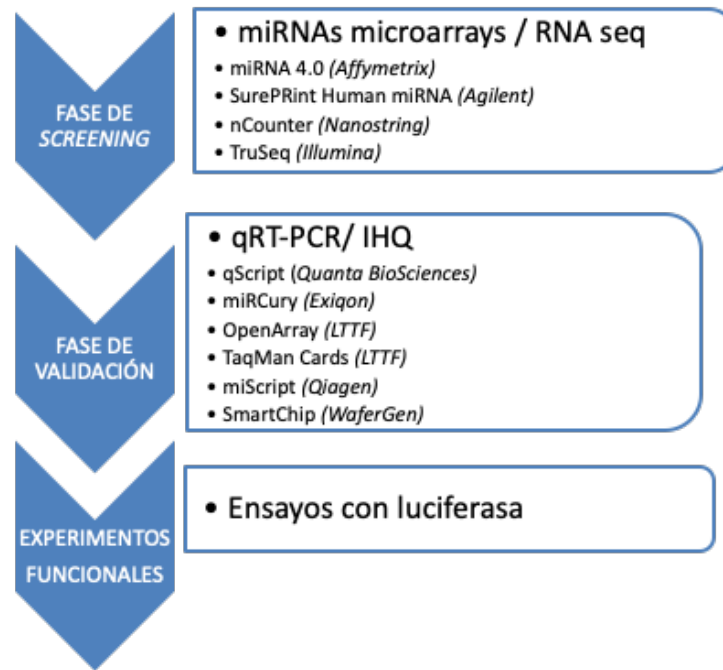


Figura 13. Diagrama de flujo del trabajo en un estudio clásico de miRNAs.[119]

#### A) Secuenciación de RNA

La secuenciación de próxima generación (*Next Generation Sequencing*) se desarrolló inicialmente con el objetivo de secuenciar de manera más rápida y barata genes. Esta capacidad para leer millones de fragmentos cortos de DNA pronto se utilizó como un nuevo método, conocido como RNAseq, que incluía tanto la secuenciación como la cuantificación del RNA.

Las muestras de RNA total son digeridas y retrotranscritas utilizando unos *primers* universales. A continuación, los DNAC se ligarán a *primers* para NGS, los cuales serán amplificados y aislados mediante reacciones de secuenciación sobre una superficie que contiene millones de reactores de secuenciación llamados nanoporos. Los secuenciadores de segunda generación son capaces de detectar millones de reacciones de secuenciación aisladas y generar datos relacionados con las secuencias de nucleótidos y el número de lecturas de cada secuencia. El software bioinformático asociado con el secuenciados NGS es capaz de alinear cada fragmento de RNA corto con su región genómica correspondiente, construyendo una lectura completa de la

transcripción. De manera análoga a la PCR cuantitativa, el número de lecturas obtenidas en los protocolos de RNAseq se correlaciona con la cantidad original de RNA celular.

Como limitaciones de esta técnica, destacaremos que la sensibilidad de NGS está relacionada con la cobertura y el rendimiento, por lo que la presencia de miRNAs sobre expresados puede reducir la capacidad para detectar miRNAs de muy baja expresión [120].

#### B) Microarrays de miRNA

Los microarrays han supuesto una revolución en los campos de la genómica y la proteómica, debido a su capacidad para detectar simultáneamente miles de moléculas. Desde su descubrimiento, la evaluación y estudio de la expresión genética pasó de genes concretos a perfiles genómicos completos en los que los perfiles de miRNAs ayudaron a decodificar la complejidad real de los modelos patológicos [121].

La tecnología de microarrays se basa en el enlace de millones de fragmentos genómicos en un soporte de vidrio que se utiliza para la hibridación de muestras (*Affymetrix, Agilent, Illumina, NanoString*). Las muestras se marcan con fluorescencia antes de la hibridación. Por lo tanto, la señal relativa en cada sonda refleja la cantidad original de miRNA en la muestra estudiada. Cientos de nuevos ncRNA se describen anualmente, por lo que es obligatorio actualizar y rediseñar las plataformas de microarrays de RNAs no codificantes.

Los perfiles de expresión de miRNAs obtenidos de plataformas de microarrays deben ser validados por qPCR en un número mayor de muestras. Ambas técnicas han puesto de manifiesto su elevada capacidad para poder medir una gran cantidad de miRNAs, proporcionándonos una gran cantidad de resultados.

Sin embargo, hoy en día el coste económico sigue siendo demasiado caro para utilizarlos en el paso de validación. Por lo tanto, se confirma que la PCR cuantitativa es la técnica más precisa para validar los resultados de RNAseq o microarrays[120].



### C) PCR en tiempo real o PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR) o la PCR en tiempo real (RT-PCR) es una técnica rápida, fácil y relativamente asequible para la cuantificación de los miRNAs.

La PCR nos permite trabajar con una cantidad de muestra muy pequeña, es decir, utilizar una cantidad pequeña de RNA inicial. El primer paso de la técnica consiste en la síntesis de un DNAc (DNA complementario) al miRNA utilizando un protocolo de retrotranscripción (RT-PCR).

El proceso de amplificación exponencial en RT-PCR (del inglés “*Polymerase chain reaction*”) es un método extremadamente sensible y preciso para detectar moléculas a muy baja concentración, convirtiéndose así en la técnica *gold standard* para la cuantificación de miRNAs en biofluidos como plasma, suero, o líquido peritoneal. Si bien es cierto que podemos encontrar algunas limitaciones de la técnica, como puede ser la limitación en el número de moléculas que se pueden detectar y que dependerá del diseño de la placa utilizado (placa de 96 o 384 pocillos) [120].

La pre-amplificación y la amplificación aumentan la cuantificación por lo que la sensibilidad de la técnica puede estar sesgada por lo que respecta a secuencias con bajo nivel de expresión, debido en este caso a dichos pasos previos en el protocolo experimental.

Por otro lado, la normalización puede ser compleja ya que las moléculas que habitualmente se utilizan como “normalizadoras” (en inglés “*housekeeping*”) no pueden expresarse de manera estable en algunos modelos experimentales o patologías. En cualquier caso, hasta el momento, la qPCR es el método de referencia para la validación de la expresión de otras técnicas en la investigación con miRNAs [122].

Hoy en día algunas placas diseñadas para PCR de alto rendimiento denominadas matrices (*Applied, Qiagen, Exiqon*) incluyen una selección personalizada de sondas listas para usar, cuya finalidad es cuantificar un número elevado de miRNAs a partir de una sola muestra, permitiéndonos así reducir las variaciones propias de la técnica [120].

### D) Hibridación in situ (ISH) y detección de miRNA de células vivas

Existen empresas que ya se han especializado en la detección de miRNAs y han desarrollado sondas acopladas con colores fluorescentes o sondas conjugadas con anticuerpos para la detección de miRNAs *in situ* (*Exiqon, Merk-Millipore*).

Estas metodologías permiten localizar moléculas de miRNAs en células o tejidos, permitiendo una mejor caracterización de su biogénesis, vías y actividad. Las sondas marcadas con fluorescencia muestran la localización de miRNAs en células fijadas o vivas y permiten en algunos casos, realizar una clasificación de flujo de células que expresan reguladores concretos [123]. Durante la ISH, una sonda de ácido nucleico bloqueado (LNA del inglés *locked nucleic acid*) se hibrida con la secuencia diana a una temperatura elevada y luego se elimina el exceso de sonda.

Las sondas de LNA son muy sensibles y se han ensayado terapéuticamente para terapias con miRNAs ant-isentido [124].

#### 1.5.11 miRNAs COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD

El término biomarcador fue revisado en el 2001 por el *Biomarker Definitions Working Group* definiéndose como “una característica que se puede medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas en una intervención terapéutica”. En la era “ómica” los biomarcadores incluyen escalas de puntuación y valoración clínica, proteínas, diferentes medidas de la expresión génica como los niveles de mRNA, miRNA, variantes genéticas de DNA o metabolitos [122].

Con el objetivo de comprender mejor los procesos fisiopatológicos de diferentes patologías, muchos autores han trabajado para caracterizar el perfil de expresión de miRNAs de algunas patologías de diferentes especialidades como patologías cardíacas, cáncer, diabetes, sepsis y patologías ginecológicas [65,125–128].

Para definir los miRNAs como biomarcadores de una patología la primera aproximación que se debe hacer para su caracterización es centrarse en la definición del patrón de expresión de miRNAs en el tejido patológico, con el fin de clarificar los mecanismos moleculares subyacentes en la patología. En este contexto, los miRNAs se han detectado

en diferentes fluidos corporales como orina, suero, plasma, líquido peritoneal incluso hasta en líquido cefalorraquídeo [129,130].

Existen tres aspectos fundamentales que hacen que los miRNAs se hayan convertido en biomarcadores de ausencia o presencia, así como de pronóstico de diversas patologías. La primera de estas características es su baja complejidad estructural, la segunda es el poco procesamiento que llevan a cabo después de su génesis y la tercera es su detección en diversos fluidos corporales. Por dichas propiedades se les ha llegado a proponer como candidatos ideales a biomarcadores no invasivos.

Cabe destacar, que los miRNAs no sólo han sido analizados en fluidos biológicos como puede ser plasma, suero, sangre o líquido peritoneal, sino que también se han detectado y estudiado miRNAs procedentes de tejidos frescos congelados, tejidos fijados con formaldehído e incluidos en parafina. La ventaja que se presenta con estos nuevos biomarcadores es que se precisan cantidades pequeñas de tejido o de biofluido para llevar a cabo los estudios de miRNAs [49,120,129–132].

Se han descritos perfiles alterados o anómalos de miRNAs en diversas patologías humanas, incluyendo cáncer, patologías cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y patología benignas o malignas del aparato reproductor femenino[119,127,131,133–135].

Si centramos la importancia de los miRNAs en los biofluidos la presencia de los mismos en estos líquidos corporales puede ser explicada por diversos mecanismos:

- a) La liberación pasiva de miRNAs como consecuencia de un daño tisular, inflamación crónica, apoptosis celular o necrosis o de células con corta vida media como las plaquetas [122,136,137].
- b) Secreción activa de microvesículas derivadas de células, como los exosomas, las micropartículas o los cuerpos apoptóticos [138–140].
- c) Secreción activa por células en forma de complejo miRNA-proteína como la HDL (lipoproteína de alta densidad) o LDL (lipoproteína de baja densidad) [141,142] Ago2 (complejo argonauta 2) [143].

Arroyo y sus colaboradores sugirieron que los miRNAs que se encontraban asociados a Ago2 podrían estar listos para regular la expresión génica en las células receptoras de Ago2. Así mismo los mecanismos b y c descritos anteriormente explicarían porque la vida media de los miRNAs sería tan estable ya que el medio interno (biofluidos) es rico en RNAasas. Esto se explicaría porque si los miRNA se encuentran encapsulados en microvesículas de diferente tipo o bien viajan formando un complejo miRNA-proteína no podrían ser atacados por la acción de las RNAasas

En vista a estos hallazgos, diferentes autores propusieron que el mecanismo de acción de los miRNAs debía ser similar al que lleva a cabo una hormona en el proceso de comunicación célula a célula [122,144,145].

Uno de estos ejemplos lo podemos encontrar en los miRNAs circulantes liberados por células cancerosas que tienen la capacidad de unirse a los receptores *Toll-like* (TLR) de las células inmunes como el TLR7 en ratones o el TLR8 en humanos y estos miRNAs serían capaces de activar  $KF_{\kappa}B$  [146]. Con este mecanismo se podría explicar parcialmente los procesos inflamatorios relacionados con el cáncer.

Los estudios de Michell y colaboradores [147] demostraron el potencial regulador que poseen los miRNAs en sangre para el cáncer de próstata, abriendo una vía común de investigación para otras patologías.

En conclusión, una gran cantidad de autores demostraron que gracias a los mecanismos anteriores los miRNAs jugarían importantes roles reguladores en patologías muy diversas.

#### 1.5.12 miRNAs Y SU ROL EN PATOLOGÍAS GINECOLÓGICAS

Los miRNAs gracias a su baja complejidad, la ausencia de post-procesamiento y lo ampliamente distribuidos que se encuentran en diversos fluidos corporales, convierten a estas pequeñas moléculas en biomarcadores no invasivos muy importante en patología ginecológica. De esta manera, el estudio de estos nos permitirá evaluar la presencia o ausencia, así como el pronóstico de una enfermedad [65,66,119,120,125,129].

Los miRNAs se pueden utilizar como biomarcadores de patología ginecológica tanto en fluidos biológicos (plasma, suero, líquido peritoneal...) como también en tejidos frescos congelados o bien en tejidos incluidos en parafina fijados con formalina. Dado que los estudios con miRNAs requieren bajas cantidades de tejidos o fluidos biológicos, estas moléculas proporcionan nuevas herramientas para el diagnóstico y seguimiento molecular no invasivo [49,126,128,132].

Se ha visto que un perfil alterado de miRNAs se puede asociar con multitud de patologías humanas, incluyendo cáncer, trastornos cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y trastornos benignos o malignos del tracto reproductivo femenino humano [65,131,148,149].

El patrón alterado de miRNAs en mujeres con endometriosis puede promover el cáncer al potenciar o inactivar diferentes oncogenes diana o genes supresores de tumores. Por lo tanto, esta desregulación de los miRNAs podría explicar el por qué las mujeres que padecen endometriosis tienen hasta el doble de probabilidades de padecer cáncer de ovario [150,151].

Con estudios como los anteriores, entre otros, ponemos de evidencia la necesidad de conocer el papel que los miRNAs poseen en las enfermedades ginecológicas, y en particular el rol que juegan los miRNAs en la transformación maligna de la endometriosis.

A continuación, realizaremos un breve repaso de estudios donde evidencia la importancia de los miRNAs en patología ginecológica centrándonos en la endometriosis.

#### A) miRNAs Y CÁNCER ENDOMETRIAL

El cáncer de endometrio es una de las neoplasias malignas más frecuentes en los países desarrollados [152] y la mayoría de las pacientes se diagnostican en etapas iniciales de la patología donde aún no se han producido metástasis y la terapia quirúrgica suele ser altamente efectiva. Por el contrario, las pacientes con cáncer de endometrio en un estado más avanzado o recidivante no responden tan bien al tratamiento y tienen un pronóstico más complejo [65,153,154].

Los mecanismos patológicos responsables de la progresión del cáncer y el proceso metastático en este tipo de cáncer es uno de los menos estudiados y de los que se conocen más deficientemente de todas las neoplasias malignas [155].

La mala respuesta a la terapia rutinaria para las pacientes con enfermedad recurrente o avanzada puede deberse a una falta de comprensión de las bases moleculares de la carcinogénesis endometrial [153].

Los estudios del perfil genético en cáncer endometrial han demostrado que muchos genes están desregulados en todos los tipos de cáncer. Se ha encontrado un perfil de expresión de miRNAs anómalo que está involucrado en el inicio, progresión y metastatización del cáncer humano, a través de la regulación a la baja de diferentes proteínas con actividad oncogénica, actuando como supresores de tumores [156].

También hay numerosos estudios que relacionan la implicación de los miRNA en el proceso de adhesión celular y remodelación de la matriz extracelular y por lo tanto podrían ser una pieza clave del proceso metastático y la progresión del cáncer[157].

Durante los últimos años se ha descrito una alteración en el perfil de expresión de miRNAs en el adenocarcinoma de endometrio. Son varios los estudios que han tratado de describir los perfiles de miRNAs en cánceres de endometrio [158–160].

Los puntos convergentes de estos estudios indican una regulación positiva de la familia miR-200 en el tejido de cáncer de endometrio comparado con los controles normales [161]. Además, también se ha reportado una sobreexpresión significativa de miR-205 y miR-210 en el cáncer de endometrio [153,155,162]. Tanto el miR-205 como la familia de miR-200 se han visto implicados en la transición del epitelio mesenquimal, la invasión tumoral y el crecimiento metastático [163].

De manera similar, se encontró que el miR-203 estaba significativamente sobreexpresado en cáncer de endometrio y que dicha sobreexpresión era debida a la hipometilación en el cáncer de ovario [164].

Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-205, miR-210 y la familia miR-200 los hace unos buenos candidatos como biomarcadores para el pronóstico y el diagnóstico precoz del cáncer de endometrio, entre otros.

## A) miRNAs Y CÁNCER DE CUELLO UTERINO

El Cáncer de cuello uterino es la segunda causa más común de muerte relacionada con el cáncer en mujeres en todo el mundo. Sin embargo, la incidencia y la mortalidad están disminuyendo debido a la implementación de programas de detección de cuello uterino [165,166].

El cáncer de cuello uterino es el resultado de la transformación del epitelio cervical normal en una neoplasia intraepitelial cervical en primer lugar y un cáncer cervical invasivo después [167].

Se han descrito perfiles de miRNAs alterados en los carcinomas de cuello uterino si los comparamos con el cuello uterino normal. De hecho, miR-143 y miR-145 están regulados a la baja en el cáncer de cuello uterino en comparación con los tejidos cervicales normales [168,169]. Además, se observó que miR-143 y miR-145 están sobre expresados tanto en tejidos de cáncer de cuello uterino como en tejidos infectados por VPH (Virus del papiloma humano) con lesiones preneoplásicas [68,170]. Se ha observado también una regulación a la baja de miR-143 y miR-145 en otros cánceres, incluido el cáncer de endometrio [170,171].

Por otro lado, la regulación positiva de miR-146a en tejidos de cáncer de cuello uterino, pero no en lesiones preneoplásicas inducidas por VPH o en líneas celulares derivadas de cáncer, indica que la expresión de miR-146 es específica del cáncer de cuello uterino. Así mismo los estudios llevados a cabo por Wang et al indicaron que la regulación negativa de miR-143 y miR-145 y la regulación positiva de miR-146<sup>a</sup> desempeñan un papel en la carcinogénesis cervical [171].

Del mismo modo, los estudios llevados a cabo por Lee y colaboradores caracterizaron un perfil de miRNAs alterado en los tejidos del cáncer de cuello uterino en estadio temprano en comparación con los tejidos epiteliales del cuello uterino normales y también describieron que el miR-127 está asociado con metástasis en los ganglios linfáticos [172].

Así mismo se ha demostrado que el anti-miR-199a inhibe el crecimiento celular y potencia la respuesta quimioterapéutica *in vitro*, lo que apunta que el miR-199a puede

ser una diana terapéutica potencial para el tratamiento de cáncer de cuello uterino [172].

Estudios llevados a cabo por Hu y colaboradores [173,174] demostró que el miR-200a podría predecir la supervivencia del paciente con cáncer de cuello uterino y los estudios funcionales sugirieron, que puede afectar al potencial metastásico de las células del cáncer de cuello uterino.

Por consiguiente, se puede concluir que los patrones de expresión de miRNAs pueden servir como potenciales biomarcadores de enfermedad cervical y actuar como posibles dianas terapéuticas [168].

#### B) miRNAs Y CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es la quinta causa de todas las muertes relacionadas con cáncer que se producen entre las mujeres. Cerca del 80% de las pacientes se encontraban en un estadio bastante avanzado de la patología en el momento del diagnóstico y la mayoría tubo una tasa de supervivencia inferior a los 5 años desde el momento de diagnóstico. Además, también se observó en diversos estudios que un alto número de pacientes podían sufrir recidivas [126,175–177].

El perfil de expresión de miRNAs también se ha postulado en esta patología como un buen indicador de metástasis, así como de recidiva en los diferentes tipos de cáncer [177].

Por lo tanto, la caracterización de biomarcadores específicos para una detección temprana del cáncer de ovario, pudiendo llegar a describir un perfil de miRNAs tumoral podría repercutir en un aumento de la tasa de supervivencia de las pacientes con esta patología.

Diversos estudios comparativos ente el cáncer de ovario y el tejido normal de ovario puso de manifiesto un perfil de expresión de miRNAs diferente entre el tejido normal y el patológico. Varios de estos estudios han caracterizado al alza algunos miRNAs como el miR-200a/b/c el miR-141, miR-429, miR-16, miR-21 o a la baja como los miR-125b, miR-143, miR-145, miR-199a y el miR-214 en el cáncer de ovario comparándole con el tejido ovárico normal [178–180].



Además, es importante resaltar la regulación positiva de los miR-29a y miR-29b paralelamente con una regulación negativa de miR-34, miR-143 y miR-145 hallada en paciente que también presentaron anomalías en BRCA1/2 [181–183].

### C) miRNAs Y ENDOMETRIOSIS

Como ya se ha explicado en el apartado de la etiopatogenia de la patología, hoy en día sigue sin conocerse con exactitud el mecanismo patogénico de la endometriosis pese a la alta prevalencia y síntomas incapacitantes que conlleva dicha patología.

Se piensa que es una enfermedad multifactorial y poligénica donde existen claras evidencias que la desregulación del perfil de miRNAs puede ser un factor determinante [49,62,64,119,120,126,128,132,149,184–188].

A pesar de lo estudiada que está siendo la enfermedad la técnica *gold standard* para su diagnóstico sigue siendo la exploración laparoscópica para la posterior confirmación histológica de glándulas o estroma en las lesiones biopsiadas. Por ello se han emprendido varias líneas diagnósticas, unas basadas en los síntomas [189,190] y otras en analíticas de sangre [191].

Hasta la fecha, no se ha conseguido establecer una prueba o conjunto de pruebas no invasivas o mínimamente invasivas para el diagnóstico precoz de la endometriosis. Por lo tanto, se necesita una prueba ideal para el diagnóstico de la endometriosis que permita detectar la enfermedad en etapas iniciales, que sea muy sensible y, además, específica.

Aprovechando la localización anatómica de esta afección, se han propuesto diversos biofluidos estrechamente relacionados como fuente de biomarcadores no invasivos de la endometriosis, por ejemplo, la orina, plasma, suero, sangre menstrual o líquido peritoneal.

También se ha tenido en cuenta la casuística de que, pese a que el 90% de las mujeres presentan menstruación retrógrada, no todas desarrollan una endometriosis para pensar que pueden existir pequeñas diferencias moleculares entre el endometrio

eutópico de mujeres con y sin endometriosis que en un porcentaje de ellas conduce al desarrollo de la endometriosis [7,21]. Por lo tanto, si fuéramos capaces de caracterizar estas moléculas diferenciales podríamos establecerlas como diferencias moleculares patognomónicas de la patología y poderlas utilizar como biomarcadores en los tejidos biopsiados mediante procedimientos mínimamente invasivos.

Burney y colaboradores publicaron uno de los primeros estudios sobre el perfil de expresión de miRNAs en el endometrio de mujeres con y sin endometriosis [36,192]. En dicho estudio, se realizaron matrices de miRNAs y su posterior validación por qRT-PCR, y los autores reportaron que existía una regulación a la baja de 4 miRNAs (miR-34c-5p, miR-9, miR-9\* y miR-34b\*) en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis si se comparaban los niveles de dichos miRNAs con los niveles que presentaba el endometrio control. De acuerdo con los mecanismos moleculares de acción de los miRNAs, los niveles de miRNAs regulados a la baja conllevan una regulación al alza de la traducción de su RNA mensajero diana.

Laudansky y su equipo realizaron otro estudio en el que participaron 25 mujeres sin endometriosis y 21 pacientes que padecían endometriosis ovárica en el que se analizaron 667 miRNAs mediante matrices por PCR. Dicha validación sirvió para de afirmar que, el miR-483-5p que regula a IGF2 (Factor de crecimiento similar a la insulina Tipo-2) y el miR-629-3p, que se ha visto que está involucrado con procesos inflamatorios estaban regulados negativamente en el endometrio eutópico de las pacientes en comparación con los controles. Los autores propusieron la idea que dicha desregulación podría contribuir al crecimiento excesivo del tejido endometrial extrauterino. [193]

Cabe destacar que la complejidad de los mecanismos moleculares que subyacen a la enfermedad debemos tener en consideración que el endometrio humano es un tejido único, que sufre cambios moleculares, celulares y funcionales complejos de una manera periódica originados por la regulación de las hormonas ováricas [194]. Estos cambios son esenciales para la receptividad uterina y pueden agruparse en tres fases distintas; proliferativa, secretora y menstrual [195]. Por lo tanto, hay algunos autores que han

llegado a describir cambios en el perfil de expresión de los miRNAs en función de la fase del ciclo de la menstruación [62].

Concretamente, los miRNAs que cuyas dianas son reguladores del ciclo menstrual se sobreexpresaron en la fase secretora del ciclo [63].

La angiogénesis también juega un papel muy importante en la endometriosis, ya que las nuevas lesiones ectópicas requieren de nueva vascularización para poder proliferar, invadir y remodelar la matriz extracelular [28,66,128]. Tanto el factor de crecimiento endotelial A (VEGF-A) como la trombospondina-1 (TSP-1) representan los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos más potentes implicados en la patología de la endometriosis.

Nuestro equipo de investigación ha observado un aumento en la expresión de factores angiogénicos y proteolíticos en los tejidos endometriales de las pacientes con endometriosis [196,197] y hemos propuesto que este aumento pudiera contribuir al potencial invasivo de las células endometriales. Dos equipos de investigación diferentes han propuesto que los miR-17-5p y miR-20a siendo ambos reguladores del proceso de angiogénesis, se encuentran regulados a la baja en el endometrioma ovárico cuando son comparados sus niveles con el endometrio eutópico [62,193].

El *clúster* miR-17-92, también conocido oncomir-1, codifica para seis miRNAs maduros (Mir-17-miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a y miR-92a) y nuestro grupo ha descrito que el *clúster* miR-17-92 incrementa la neovascularización en el tumor disminuyendo la expresión de TSP-1 (trombospondina-1) [66]. Por lo tanto, debido al mecanismo de acción del miRNA, un descenso en los niveles del miR-17-5p comprendería una regulación post-transcripcional al alza de los niveles de TSP-1. Este mecanismo podría reducir la actividad angiogénica en el endometrioma ovárico; por lo tanto, con estos hallazgos se podría dar explicación a la baja capacidad de invasión de la matriz extracelular de este tejido observadas en dichas lesiones ectópicas donde frecuentemente el tejido ovárico permanece preservado.

## 1.6 miRNAs CIRCULANTES PROPUESTOS COMO BIOMARCADORES DE ENDOMETRIOSIS.

El estudio de los miRNAs circulantes como biomarcadores de endometriosis es un campo de investigación emergente y son ya varios los estudios publicados sobre los perfiles de miRNAs en distintos biofluidos como suero, plasma, líquido peritoneal.[119,186,187]

Wang y colaboradores fueron los pioneros en realizar el estudio del perfil de miRNAs circulantes en suero, donde se utilizó el suero de 10 pacientes con endometriosis y 10 mujeres control. Después de la validación de resultados por qRT-PCR en el suero de 60 pacientes y 25 controles, los autores reportaron que los niveles de miR-199a y miR-122 estaban regulados al alza y que miR-145\*, miR-141\*, miR-542-3p y miR-9 se regulaban a la baja en las muestras de suero de las pacientes si las comparábamos con las de los controles y que por lo dichos miRNAs podrían servir como biomarcadores de enfermedad.

Poco tiempo después, Jia y colaboradores [191] llevaron a cabo un estudio en plasma. Utilizaron en dicho estudio el plasma de 23 pacientes con endometriosis diagnosticadas mediante técnicas histológicas y 23 controles sin la patología. Realizaron una caracterización del perfil de miRNAs mediante microarrays de miRNAs. Demostraron que tres de los seis miRNAs seleccionados para su posterior validación por qRT-PCR (miR-17-5p, miR-20a y miR-22) estaban significativamente regulados a la baja en las pacientes y que podrían ser útiles para poder diferenciar a las mujeres que no padecían la endometriosis de las pacientes.

En el 2015 fueron publicados un par de estudios que reforzaban y ampliaban la idea de la utilización de los miRNAs como biomarcadores para la endometriosis utilizando biofluidos no invasivos. En uno de estos estudios se cuantificaron los niveles de miRNAs de los miRNAs miR-135a y let-7a-f de los que ya se sabía su role en la endometriosis. En dicho estudio utilizaron 24 sueros de pacientes con endometriosis y 24 de mujeres

control. Los autores encontraron que una combinación de los miRNAs let-7b, let-7d y let-7f durante la fase proliferativa permitía discriminar entre pacientes y controles [198].

Otro estudio llevado a cabo por Rekker y colaboradores en el 2013 puso de manifiesto que diversos miRNAs se expresaban de manera diferente en función de la fase del ciclo menstrual en las pacientes, pero no en los controles [199]. Rekker y colaboradores publicaron un segundo estudio sobre miRNAs circulantes como biomarcadores de endometriosis. Basándose en la literatura publicada hasta el momento, los autores seleccionaron tres miRNAs de la familia de miR-200 (miR-200a-3p, miR-200b-3p y miR-141-3p) cuya expresión se cuantificó en muestras de plasma de 61 pacientes y 65 mujeres control. La expresión de estos tres miRNAs, se observó que tenía una expresión a la baja en los pacientes y miR-200a-3p y miR-141-3p mostraron el mayor potencial como biomarcadores no invasivos para esta patología benigna. Los autores también analizaron las variaciones de los niveles de los tres miRNAs según el tiempo de muestreo, es decir, mañana y noche y encontraron niveles más bajos en las muestras vespertinas, esto podría explicarse por las variaciones circadianas en su expresión. Este nuevo enfoque, que tenía en cuenta el tiempo de muestreo evidenció entonces que el momento de muestreo pasaría a ser una nueva variable a tener en cuenta a la hora de realizar estudios de miRNAs circulantes [199].

Entre todos los mecanismos de regulación epigenética, los miRNAs se han posicionado como unos reguladores postraduccionales fundamentales. Como mecanismo general de acción todos ellos se unen a su diferentes mRNAs diana e inhiben el proceso de traducción.

La implicación de los miRNAs en distintas condiciones patológicas está bien determinada y se han realizado perfiles de expresión de miRNAs en distintas biopsias de diferentes enfermedades, incluidas como hemos descrito las patologías ginecológicas como la endometriosis.

A pesar de ser una patología ginecológica benigna, la endometriosis reduce profundamente la calidad de vida de las mujeres afectadas en términos de dolor e infertilidad. Con estos estudios previos incluidos los de nuestro grupo, se puede

proponer que los miRNAs de algunos biofluidos podrían suponer un nuevo hito en el diagnóstico de la endometriosis ya que podrían utilizarse como biomarcadores no invasivos o semi-invasivos en el diagnóstico de la endometriosis en estadios iniciales pudiendo prescindir así de la técnica actual que es la laparoscopia.

Durante los últimos años los miRNAs circulantes han surgido como unas moléculas atractivas para poder ser utilizadas como biomarcadores[122] aunque todavía se requieren estudios más profundos para caracterizar y/o validar una buena herramienta de diagnóstico de la endometriosis basada en miRNAs.

Cabe destacar que los diferentes planteamientos y protocolos de los estudios realizados hasta el momento sobre la endometriosis, son bastante heterogéneos, por lo que extrapolar resultados y comparar los diferentes estudios es un poco complicado[122].

Por dichos motivos la *World Endometriosis Research Foundation* ha publicado una serie de recomendaciones con el fin de estandarizar la recolección, procesamiento y almacenamiento de datos y muestras, con el fin de reducir la heterogeneidad y mejorar la reproducibilidad entre estudios [150,200,201].

## 1.7 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE PERITONEAL EN LA ENDOMETRIOSIS

El entorno y microambiente que rodea al implante endometriósico en la cavidad peritoneal es cambiante y dinámico. El peritoneo es la membrana serosa más extensa del cuerpo y se considera que la superficie del peritoneo es igual al de la piel. El peritoneo está compuesto anatómicamente por dos capas: una capa de tejido conectivo laxo que contiene colágeno, fibras elásticas, células grasas y macrófagos y otra capa llamada mesotelial compuesta por células de tipo escamoso [202].

Por su parte el líquido peritoneal tiene su procedencia de dos fuentes distintas, por un lado, del trasudado plasmático y el exudado ovárico y por otro lado de fuentes diversas que contribuyen a su contenido de manera diferencial como son el líquido tubárico, la menstruación retrógrada y las secreciones de los macrófagos.

Las trompas de Falopio, así como los ovarios se encuentran embebidos en el LP. Del mismo modo, cabe destacar que los ovocitos también se encuentran en contacto con el ambiente peritoneal incluso una vez han sido capturados por las fimbrias de las trompas de Falopio, ya que estas tienen un lateral con abertura libre a la cavidad peritoneal. Y no sólo los óvulos entran en contacto con el fluido peritoneal, también lo hacen los espermatozoides que consiguen llegar a las trompas de Falopio, así como el embrión que comienza su desarrollo inicial en el interior de las trompas donde también puede sufrir una exposición potencial a los componentes celulares y solubles del líquido peritoneal [203].

De hecho, existen estudios que ponen de manifiesto que una parte del líquido uterino podría tener un origen peritoneal [204].

El ambiente peritoneal siempre ha sido objeto de estudio en el marco de la endometriosis, y cada vez está recibiendo una mayor atención por su rol potencial en la patología, ya que los cambios en el volumen de líquido peritoneal, así como las modificaciones en la concentración de una variedad de tipos celulares diferentes, y componentes inmunológicos.

Hoy en día se continúa con esta línea de investigación y el equipo de Giudice y colaboradores han llevado a cabo un estudio que permite caracterizar el componente inmunológico del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, en los que se han caracterizado las poblaciones celulares diferentes encontradas, así como sus concentraciones [192]

De hecho, se ha visto que tanto el sistema inmunológico periférico, como el estado inmunológico del endometrio dentro del útero se han visto alterados en mujeres con endometriosis y probablemente estas alteraciones contribuyan a la infertilidad y fracaso temprano del embarazo y la homeostasis tisular en mujeres afectadas por la patología [192]

Desde los inicios de las investigaciones en el campo de la endometriosis se había sugerido que los componentes celulares y bioquímicos que contiene el líquido peritoneal desempeña un papel crucial en la patogénesis de la endometriosis [205].

El ambiente peritoneal, como ya se ha descrito, representa un entorno inmunológicamente dinámico que relaciona el sistema inmunológico con el reproductivo. Por lo tanto, las anomalías en el contenido del líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis se pueden relacionar con la infertilidad[119]. Esto es debido a que los distintos componentes del LP podrían interactuar adversamente con distintas etapas del proceso reproductivo como la función ovulatoria, el transporte o supervivencia de gametos, la interacción espermatozoide óvulo entre otros [203,206].

#### 1.7.1 COMPOSICIÓN DEL LIQUIDO PERITONEAL

La composición del líquido peritoneal se ha descrito desde dos vertientes; por un lado, su contenido celular y del otro la composición de distintas sustancias solubles que en él se encuentran.

El contenido celular peritoneal está compuesto por una gran variedad de células libres como macrófagos, células mesoteliales, linfocitos, eosinófilos, mastocitos ... Se ha descrito que el 85% del contenido celular del LP corresponde a macrófagos y el 15% restante a los otros tipos celulares [207]. Estudios ultraestructurales y de funcionalidad han puesto de manifiesto que las células mesoteliales que forman parte de la estructura



de la envoltura peritoneal no sólo secretan componentes surfactantes y glucosaminoglicanos cuya función es evitar la fricción y posibles adherencias entre la pared del peritoneo y el resto de las superficies viscerales, si no que se ha visto que tienen un papel muy relevante con la defensa inmunitaria peritoneal. Así, dichas células en presencia de sustancias como TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) o el INF- $\gamma$  (Interferon - $\gamma$ ) secretadas por los leucocitos activados, producen que las células mesoteliales secreten una amplia variedad de moléculas como prostaglandinas, citocinas, factores de crecimiento [207] y moléculas de adhesión. Dichas células mesoteliales también secretaran otras sustancias relacionadas con la matriz extracelular como fibronectina, elastina, colágeno y prostaglandinas.

Los macrófagos son el tipo celular más abundantes en el líquido peritoneal, y las funciones que llevan a cabo son el reconocimiento, fagocitosis y destrucción de microorganismos y otras partículas ajenas a su composición normal.

Los linfocitos también son células que se encuentran presentes en el líquido peritoneal [207] se ha visto que en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis se encuentran aumentados en concreto los linfocitos T- "helper" y los T-"supresores", sugiriendo un aumento de la actividad inmunológica en el ambiente peritoneal de las pacientes con endometriosis. Del mismo modo, también se han descrito incrementados significativamente los niveles de células NK (Natural Killer) en las pacientes. Por el contrario, no se ha observado incrementos de linfocitos B o células plasmáticas en las pacientes [208]. Es importante destacar que la función de las células NK es la de proteger el ambiente frente a la invasión de "antígenos". Por lo tanto, la presencia de células NK en el fluido peritoneal estaría indicando que el sistema inmune está protegiendo a la cavidad peritoneal de posibles invasiones de células endometriales ectópicas. Hay estudios que evidencian que una vez producida la invasión den distintas zonas del peritoneo por parte de las células endometriales que llegan a la cavidad peritoneal, concretamente en los estadios III-IV de la patología o incluso cuando se producen recidivas. se ven reducidos los niveles de NK comparados con controles sin endometriosis [203].

Un componente celular del líquido peritoneal a destacar serían las células endometriales, que como ya se ha descrito formarían parte del contenido celular del líquido peritoneal mediante el proceso descrito por Sampson en 1927, la menstruación retrógrada.

Los mastocitos también son un tipo de célula que podemos encontrar formando parte del contenido celular del líquido peritoneal. Los mastocitos tienen funciones relacionadas con el proceso menstrual. Actúan facilitando la descamación y atrayendo otras poblaciones de células inmunitarias. Por el contrario, el número de mastocitos en las pacientes con endometriosis (según algunos estudios) no experimenta grandes fluctuaciones. Sin embargo, sí que se ha visto incrementado notablemente el número de estas en las lesiones endometriósicas, llevando a cabo un procedimiento aumentado de inflamación por medio de la secreción de factores pro-inflamatorios [207].

Los eosinófilos cuando llevan a cabo el proceso de desgranulación promueven la adhesión que junto con la activación de los mastocitos favorecerán el proceso de invasión llevado a cabo por las células endometriales ectópicas [209].

Los neutrófilos presentes en el líquido peritoneal junto con el VEGF se relacionan con los procesos de neoangiogénesis en las lesiones endometriósicas.

Por lo que se refiere a la presencia de linfocitos B en líquido peritoneal y su papel en la endometriosis, hay bastante controversia en la literatura. Algunos estudios proponen que hay una cantidad aberrante de anticuerpos en la endometriosis. Se ha sugerido que los anticuerpos-anti-endometriales podrían ser parcialmente responsables del fallo en la implantación afectando al estado de fertilidad y recepción embrionaria de la paciente [207,210].

Los linfocitos T, en sus diferentes variedades (CD4-CD8) parecen desempeñar un papel pro-inflamatorio en la endometriosis, dando así soporte al componente inflamatorio de la patología. Así mismo también se ha visto que estas células parecen contribuir al grado-estadio de severidad de la patología [207].

Otro conjunto de componentes del líquido peritoneal sería las sustancias solubles que encontramos en el líquido peritoneal serían las prostaglandinas, cuyo aumento se ha

relacionado con posibles efectos sobre la implantación embrionaria. El aumento de la concentración de dichas sustancias podría favorecer las contracciones uterinas y por lo tanto la expulsión del embrión. También existen diversos estudios que relacionan el aumento de la cantidad de prostaglandinas en el líquido peritoneal con la posible interferencia en el proceso de ovulación ya que estarían aumentando la motilidad tubárica, lo que retrasaría la llegada del embrión aumentando así el tiempo de implantación [211]

También encontramos una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento (IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, EGF...). Las citoquinas presentan una gran variedad de funciones biológicas tales como la proliferación y diferenciación de células inmunológicas, estimulación del crecimiento del tejido conectivo y proliferación de células endoteliales, quimiotaxis... La IL-6 lleva a cabo funciones relacionadas como la reparación tisular y la angiogénesis [212], mientras que la IL-8 se considera un potente quimioatrayente de neutrófilos y un potente factor angiogénico [213,214].

El factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) se encarga del proceso de adhesión de las células estromales endometriales a las células mesoteliales. Otro efecto negativo de la presencia del TNF $\alpha$  es la reducción de la movilidad espermática, estos resultados se han hallado por medio de experimentos in vitro y a altas concentraciones de este [215,216]. Dicho factor junto con el interferón- $\lambda$  se han descrito como potenciales sustancias embriotóxicas. Así mismo el interferón- $\lambda$  es un disruptores del crecimiento celular alterando el proceso normal de la formación de la membrana plasmática y el citoesqueleto.

El MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) es un potente quimioatrayente y activador de diversos factores específicos de los monocitos. Este factor aumentado en el LP de las pacientes con endometriosis se traduce en una mayor activación de los macrófagos [217,218].

RANTES (del inglés "*Regulated upon Activation Normally T-Expressed and presumably Secreted*") también presente en el líquido peritoneal se ha descrito como un quimioatrayente de monocitos y linfocitos T [219–221].

PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) es producido por los macrófagos activados jugando un papel determinante en el proceso de respuesta inflamatoria actuando como un importante mitógeno de fibroblastos y precursor angiogénico [222,223]

### 1.7.2 VOLUMEN DEL LÍQUIDO PERITONEAL

El líquido peritoneal es un ultrafiltrado de plasma cuyo volumen suele oscilar entre 5 a 20 ml de líquido seroso de color pajizo y que varía según el estado fisiológico. En el caso de la mujer este volumen cambia durante el ciclo menstrual, alcanzando su nivel máximo después de la ovulación. Son varios los factores que determinan el volumen de líquido peritoneal como la actividad folicular, la vascularidad del cuerpo lúteo y la producción de hormonas [224,225].

Se han realizado diversos estudios como los llevados a cabo por Oral [203] y colaboradores en los que se ha puesto de manifiesto que la endometriosis puede alterar el volumen del líquido peritoneal, concretamente aumentando su volumen. Esto ocurre, porque la endometriosis altera la permeabilidad mesotelial o bien aumenta la presión osmótica como resultado de la alteración del contenido en proteínas[203].

Los estudios llevados a cabo por Syrop intentaron determinar qué relación existía entre el volumen del líquido peritoneal y la condición de infertilidad asociada con la endometriosis. Llegaron a la conclusión que las mujeres que lograron llevar a término un embarazo presentaban un volumen de líquido peritoneal significativamente menor que aquellas que no lograron el embarazo. Por lo tanto, el volumen de líquido peritoneal se relacionó con la tasa de embarazo [224,226].



## 2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La hipótesis de partida de este trabajo es la siguiente:

Que existe un perfil de miRNAs diferentemente expresado en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis que se puede utilizar como herramienta diagnóstica de la enfermedad, pudiendo estar relacionado a su vez con estatus de fertilidad de las pacientes.

El objetivo principal de este trabajo fue:

Determinar la existencia de un perfil de miRNA en líquido peritoneal y su posible relación con el estatus de fertilidad en las pacientes con endometriosis.

Los objetivos específicos que se han desarrollado en este trabajo han sido los siguientes:

1) Caracterización del perfil de miRNAs característico del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis.

1.1) Identificación de las dianas y las vías afectadas por los miRNAs desregulados en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis y su potencial implicación en el desarrollo de la enfermedad mediante estudios *in silico* sirviéndonos de bases de datos disponibles *on line*.

1.2) Validar por qRT-PCR los resultados obtenidos de los arrays de expresión de miRNAs en una cohorte mayor de muestras.

1.3) Determinar la influencia de la fase del ciclo y el estatus de fertilidad en el perfil de miRNAs del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis

2) Valoración de los niveles proteicos (VEGF-A, TSP-1, uPA, PAI-1, MMP3, TIMP-1, IL-6, IL-8, IL-17a, MIP1beta en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis de los principales factores angiogénicos, mediadores inflamatorios y proteolíticos.

2.1) Determinar la influencia de la fase del ciclo y el estatus de fertilidad en el contenido proteico del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis.





## 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1 GRUPOS CLÍNICOS

Se ha llevado a cabo estudio retrospectivo en el que se incluyeron una cohorte de 126 pacientes con endometriosis y 45 controles, ambos grupos formados por mujeres caucásicas intervenidas por cirugía laparoscópica. Se trata de un estudio retrospectivo de casos y controles. El protocolo de recogida de muestras se llevó a cabo entre los años 2003 a 2016.

Los criterios de inclusión como pacientes fueron que las pacientes estuvieran afectas de endometriosis en los diferentes estadios (I-II y III-IV). En todas las pacientes se realizó un abordaje laparoscópico con extirpación de lesiones endometriósicas y confirmación anatomopatológica del diagnóstico.

La clasificación que se utilizó para diferenciar los distintos estadios de la enfermedad corresponde a los propuestos por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) que se llevó a cabo teniendo en cuenta la ubicación de las lesiones, su diámetro, profundidad y densidad de las adherencias determinadas mediante laparoscopia, adjudicando una serie de puntos en función de los parámetros anteriores. De manera abreviada la enfermedad se caracteriza en los siguientes estadios:

- Estadio I (mínima): implantes aislados y sin adherencias.
- Estadio II (leve): implantes superficiales menores de 5 cm. Adheridos o diseminados sobre la superficie del peritoneo y ovarios.
- Estadio III (moderada): implantes múltiples superficiales o invasivos. Adherencias alrededor de las trompas o periováricas, que pueden ser evidentes.
- Estadio IV (severa): implantes múltiples, superficiales y profundos que incluyen grandes endometriomas ováricos. Usualmente se observan adherencias membranosas extensas.

Dicha clasificación se realizó en base a los hallazgos laparoscópicos por un cirujano experto siguiendo las directrices marcadas por la ASMR.

Para determinar la fase del ciclo tanto de las pacientes como de las controles se hizo mediante la correspondiente analítica hormonal.

Quedaron excluidas del estudio aquellas pacientes afectadas por menorragia o hipermenorrea, pacientes que en el momento de la intervención quirúrgica se encontraban bajo tratamiento hormonal o habían recibido dicho tratamiento en los tres meses previos al estudio, embarazadas o mujeres que se encontraban en el periodo de lactancia en los 6 meses previos.

Todas las pacientes incluidas en el estudio, así como las controles firmaron libremente el consentimiento informado (**Anexo 2**). Los procedimientos llevados a cabo en este estudio se hallan sujetos a los principios éticos de la Declaración de Helsinki (1964). Así mismo, este estudio ha sido aprobado por los Comités Éticos de Investigación Biomédica del Hospital Universitario la Fe y el Hospital Universitario General de Valencia.

Para el estudio del perfil de expresión de miRNAs en líquido peritoneal, se incluyeron un total de 126 pacientes con una media de edad de 32,4 años (rango 20-47 años) (**Tabla 3**).

Como controles se incluyeron en el estudio un total de 45 mujeres sin endometriosis, (edad media: 36,1 años con un rango 28-47 años), las cuales se sometieron a diferentes procesos quirúrgicos como esterilizaciones tubáricas. La ausencia de endometriosis se confirmó mediante un examen minucioso del peritoneo pélvico y extrapélvico, los ovarios, el intestino y el diafragma con el fin de detectar lesiones endometriósicas.

La ausencia de enfermedad en dichas mujeres se realizó en el momento de la intervención quirúrgica (**Tabla 2**).

GRUPO CLÍNICO	Nº	MEDIA EDAD	FÉRTILES	ESTÉRILES
Pacientes	126	32,4 años (rango 20-47 años)	58	68
Controles	45	36,1 años (rango 28-47 años)	23	22

Tabla 2. Número de pacientes y controles, edad media y estatus de fertilidad.

El 54% de las pacientes tenían antecedente de esterilidad, definida por la ausencia de embarazo tras un año de relaciones sexuales no protegidas (n=68 de 126).

La determinación de la fase del ciclo menstrual se realizó mediante analítica hormonal el mismo día de la cirugía y antes de la administración de la anestesia. El 46,82 % (n= 59) de las pacientes se encontraban en fase proliferativa, el 43,65% (n=55) en fase secretora, y el 9,53% (n=12) en menstrual (**Tabla 4**). En dicha analítica hormonal se valoraron los niveles de estradiol y progesterona para poder determinar la fase del ciclo (**Tabla 3**). Siendo los valores los siguientes:

FASE	PROGESTERONA	ESTRADIOL
Folicular	0,31 -1,52 ng /mL	22.4 - 115 pg/mL
Lútea	5,16 -18, 56 ng / m	32.1 - 517 pg/mL
Preovulatoria		36.5 -246 pg/mL

Tabla 3. Valores de progesterona y estradiol por fase del ciclo.

En el caso de las controles el 48,9% (n=22) se encontrarían en fase proliferativa, el 42,2% (n=19) estarían en fase secretora, y el 8,9% restante (n=4) estaban en fase menstrual (**Tabla 4**).

FASE DEL CICLO	PACIENTES	%	CONTROLES	%
Proliferativa	59	46,82	22	48,9
Secretora	55	43,65	19	42,2
Menstrual	12	9,52	4	8,9

Tabla 4. Número de pacientes según fase del ciclo menstrual.

### 3.2 LUGARES DE EJECUCIÓN

El estudio que se llevó a cabo fue multicéntrico en cuanto al proceso de reclutamiento de pacientes. Las pacientes y las controles han sido reclutadas tanto del Servicio de Ginecología del Hospital General Universitario de Valencia, así como del Hospital Casa de Salud de Valencia en los cuales se han llevado a cabo el diagnóstico de pacientes,

seguimiento clínico, y las diferentes pruebas de imagen, así como la recogida de las muestras durante la cirugía.

Por otra parte, todos los estudios de biomarcadores y las técnicas de biología molecular necesarias se han realizado en el Hospital la Fe de Valencia en el grupo de Investigación en Cardiopatías Familiares, Muerte Súbita y Mecanismos de Enfermedad (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe) (**Figura 14**).



Figura 14. Lugares de realización.

### 3.3 MUESTRAS DE LÍQUIDO PERITONEAL

Las muestras de líquido peritoneal se recogieron cuidadosamente tal y como se ha descrito previamente [196] del fondo del saco de Douglas y del espacio vesico-uterino. Este protocolo consiste en la aspiración del líquido peritoneal a través de la cánula laparoscópica colocando a la paciente en posición quirúrgica de anti-Trendelenburg en decúbito supino de 20º [227]. Las muestras de líquido peritoneal fueron recogidas en tubos cónicos estériles graduados de 50 ml (**Figura 15**).

Posteriormente en el laboratorio se centrifugó el líquido peritoneal a 1.500 x g durante 30 minutos a 4º con el fin de eliminar el componente celular. Seguidamente y en

condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar, se hicieron alícuotas y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo. Para el estudio se han incluido pacientes y controles en las diferentes fases del ciclo menstrual, con el fin de poder determinar posteriormente diferencias entre fases.

Los líquidos peritoneales que tras la centrifugación presentaron hemólisis fueron eliminados.

La hemólisis se determinó en primer lugar visualmente tras la centrifugación y posteriormente se corroboró midiendo la absorbancia a 414 [228] con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000b (Nanodrop Productos, Wilmington, DE, USA). El NanoDrop® ND-1000 es un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) que mide concentraciones con  $1\ \mu\text{l}$  de muestra, con gran exactitud y reproducibilidad. Utiliza una nueva tecnología que usa la tensión superficial para mantener la muestra en su sitio y se eliminan las cubetas de medida.

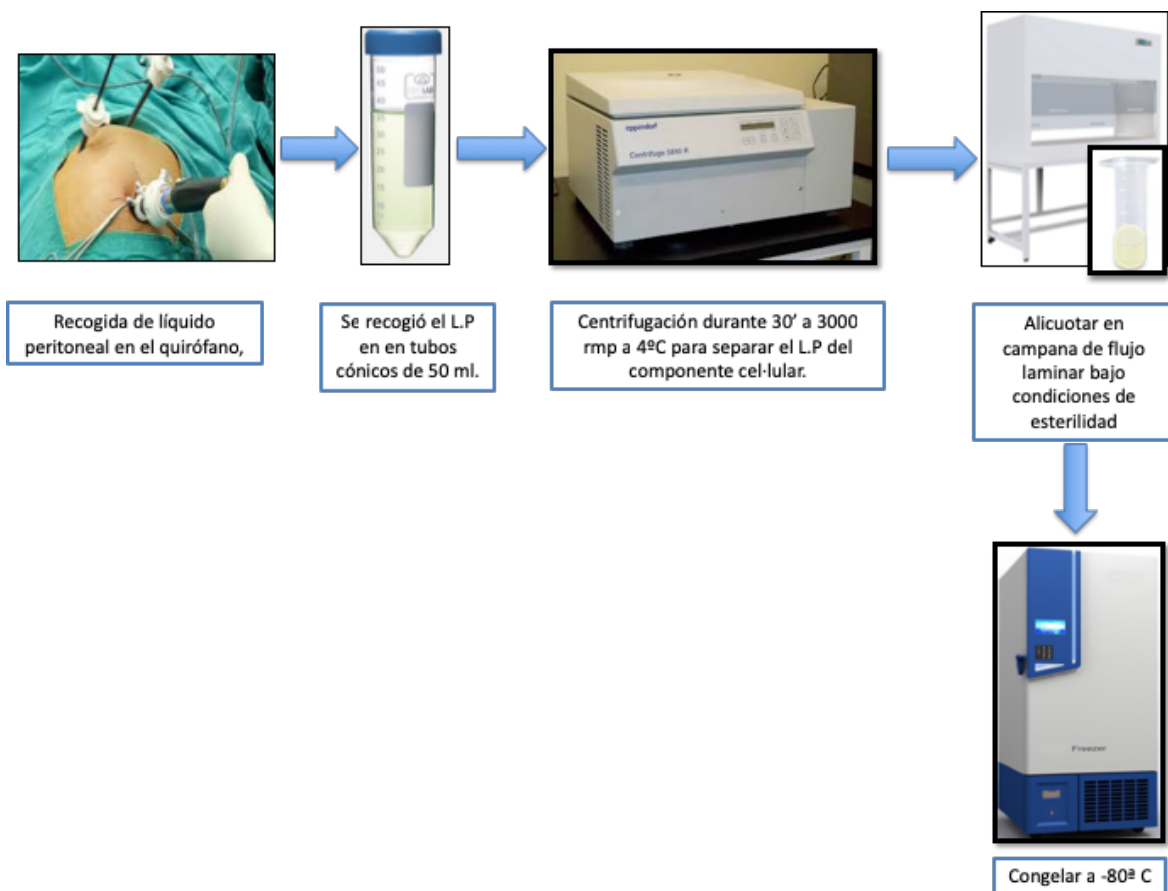


Figura 15. Protocolo de recogida de muestras de líquido peritoneal.



Al tratarse de un estudio retrospectivo, nos encontramos que teníamos una limitación a la hora de la cantidad peritoneal recogida de cada paciente. Esto se traduce en que de todas las pacientes no disponíamos la cantidad suficiente para poder llevar a cabo las valoraciones de todos los miRNAs, así como de todas las proteínas. Por lo tanto, en las **Tabla 5 y 6** se recogen el número total de controles, así como de pacientes distinguiendo de estas últimas entre los 4 estadios de la enfermedad.

miRNA	Nº de controles (CPF)	Nº Pacientes Estadio I-II	Nº Pacientes Estadio III-IV
miR-29c-3p	(n=27)	(n=16)	(n=60)
miR-106b-3p	(n=43)	(n=23)	(n=97)
miR-130a-3p	(n=27)	(n=16)	(n=60)
miR-150-5p	(n=36)	(n=21)	(n=90)
miR-185-5p	(n=40)	(n=22)	(n=91)
miR-195-5p	(n=38)	(n=16)	(n=80)
miR-451a	(n=34)	(n=24)	(n=98)
miR-486- 5p	(n=41)	(n=22)	(n=96)
miR-1343-5p	(n=22)	(n=13)	(n=63)

Tabla 5. Número total de pacientes y controles incluidas en el estudio de miRNAs en el líquido peritoneal, así como la clasificación por estadios de estos.

proteínas	Nº Controles	Nº Pacientes Estadio I-II	Nº Pacientes Estadio III-IV
VEGF-A	(n=42)	(n=25)	(n=96)
TSP-1	(n=33)	(n=11)	(n=42)
uPA	(n=30)	(n=10)	(n=46)
PAI-1	(n=34)	(n=16)	(n=69)
MMP-3	(n=32)	(n=11)	(n=43)
TIMP-1	(n=31)	(n=4)	(n=46)
IL-6	(n=32)	(n=15)	(n=55)
IL-8	(n=32)	(n=15)	(n=56)
IL-17a	(n=32)	(n=15)	(n=56)
MIP1b	(n=31)	(n=15)	(n=55)
PDGF-AA	(n=32)	(n=15)	(n=55)
RANTES	(n=30)	(n=14)	(n=55)

Tabla 6. Número total de pacientes incluidas en el estudio de los niveles de proteínas en el líquido peritoneal, así como la clasificación por estadios de los mismos.

### 3.4 METODOLOGÍA

#### 3.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DEL LÍQUIDO PERITONEAL

La extracción de RNA total, incluyendo la fracción de miRNAs a partir de líquido peritoneal y plasma se realizó con el Kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen cat. No 217004).

Este protocolo se modifica en función de si vamos a destinar el RNA para la realización de arrays de expresión de miRNAs o bien si este RNA total se va a emplear para la cuantificación de miRNAs por RT-qPCR (**Figura 16**).

En este último caso si el RNA extraído se va a destinar para su validación por RT-qPCR añadiremos MS2 (Ref. 10165948001-RNA, MS2 Sigma-Aldrich) como *carrier* que incrementará la unión del ARNt a la membrana de purificación. Además, en este protocolo también se usa un RNA exógeno procedente de *C. elegans* (cel-miR-39-3p) como control externo para monitorizar los procesos de amplificación y detección.

Los ácidos nucleicos purificados con este Kit siempre que hayamos incluido MS2 i cel-miR-39 -3 p no podrán ser cuantificados por espectrofotometría o fluorimetría ya que contendrán una mezcla de ácidos nucleicos virales y *carrier*, por lo que para su cuantificación utilizaremos RT-PCR cuantitativas.

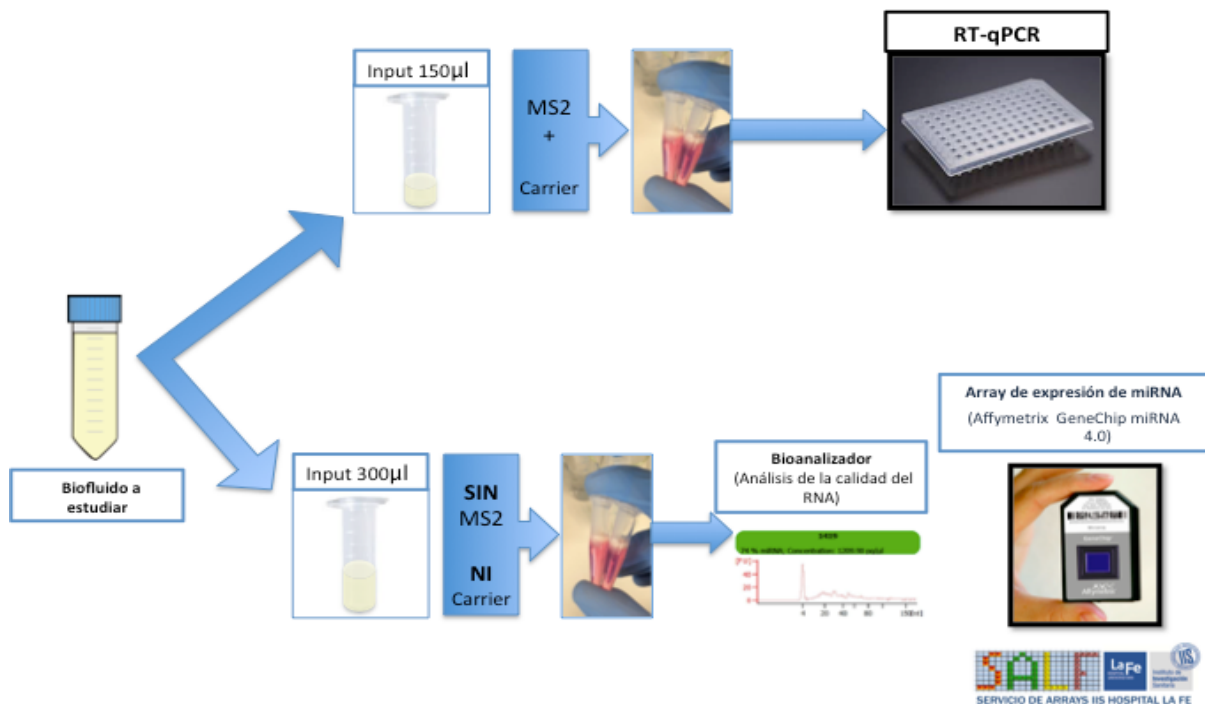


Figura 16. Protocolo de extracción del RNA.

### 3.4.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES Y LA CALIDAD DEL RNA

Una vez extraído el RNA procedimos a evaluar su integridad y pureza con el fin de elegir las mejores muestras para los arrays. Para ello se utilizó por una parte el bioanalizador Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®) que es un sistema empleado para determinar la calidad del RNA y la cantidad de una forma más fiable y precisa que otros sistemas más tradicionales. La tecnología de este aparato está basada en un sistema de microelectroforesis que utilizan nanocapilares. Es por este motivo por el cual se requiere menos cantidad de RNA, así como menos tiempo empleado para la determinación. En la actualidad, este tipo de tecnologías se ha convertido en un paso ineludible en la determinación de la calidad en muestras de RNA, dada su mayor sensibilidad y fiabilidad, si se compara con otros procedimientos como los geles de poliacrilamida y agarosa.

Con estos análisis podemos obtener un algoritmo llamado RIN (*RNA Integrity Number*) que nos va a permitir conocer la calidad de las muestras del RNA total en base a un rango numérico del 1 al 10. De manera que un valor de 1 nos estaría indicando que la muestra de RNA se encuentra totalmente degradada y 10 sería aquellas muestras que presentan su RNA intacto [229].

Para las aplicaciones de RT-PCR y microarrays se recomienda un RIN mínimo de 7, aunque depende del tipo de muestra. En nuestro caso, fijamos un valor RIN igual o superior a 7,0 para ensayos con microarrays, basándonos en la definición de buena calidad de RNA de Ibberson [230]. Gracias a esta tecnología se estandariza el proceso de interpretación de la integridad del ARN y se eliminan los sesgos asociados a la interpretación individual, utilizando mínimas cantidades de muestra.

Este sistema nos permitió comparar cuantitativamente la integridad de todas las muestras de RNA del experimento, ya que para que los resultados de microarrays sean comparables todas las muestras deben tener una calidad similar. Por otro lado, permite analizar el grado de contaminación de DNA genómico de las muestras de RNA.

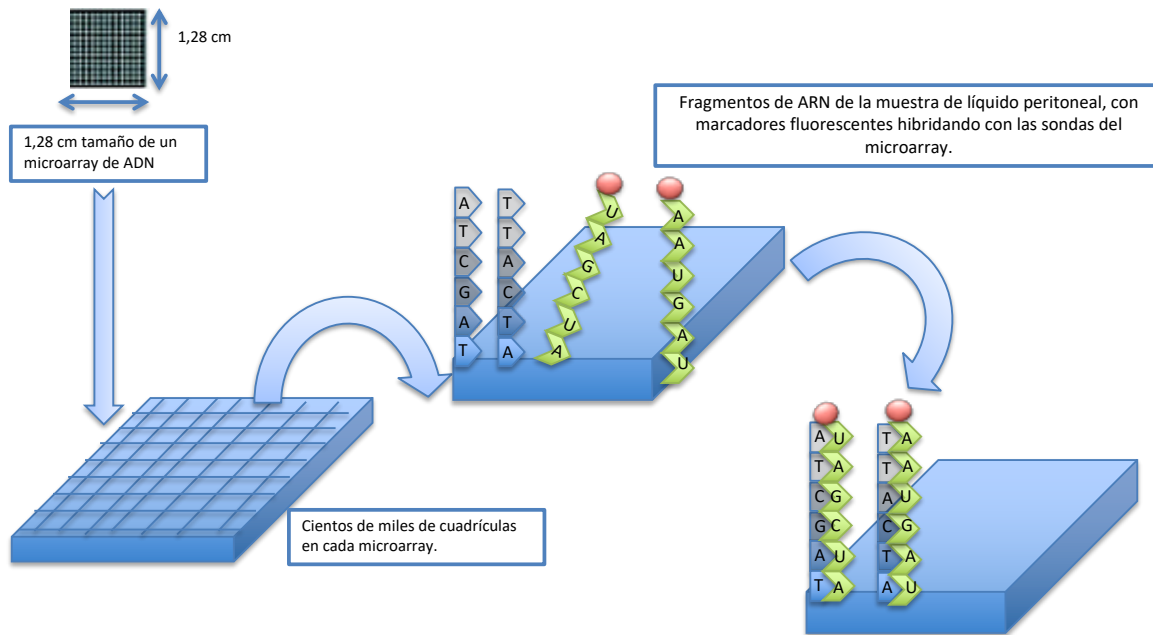
La calidad del DNA también fue evaluada con NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Products, Wilmington, De, USA).

### 3.4.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA LOS ARRAYS. ARRAY DE EXPRESIÓN DE miRNA (Affymetrix GeneChip miRNA 4.0).

Las muestras que se seleccionaron para el array fueron pareadas por estadio de la enfermedad, así como por día y fase del ciclo (menstrual, proliferativa y secretora). La fase del ciclo fue comprobada mediante analítica hormonal. Se seleccionaron aquellas muestras que cumplieran con los estándares de calidad mencionados en el apartado anterior.

Se analizaron un total de 8 muestras (4 controles y 4 pacientes). Se seleccionaron aquellas que presentaron mejores estándares de calidad y eran representativas de los grupos clínicos, tanto de controles como de pacientes pareadas por fase del ciclo.

El microarray es una tecnología basada en la hibridación molecular en la que, sobre una matriz de vidrio, silicona, nylon... se sitúan o “anclan” sondas (“spots”) de oligonucleótidos (fragmentos de DNA, DNA complementarios, DNA sintetizado a partir de mRNA, producto de PCR...) conocidos, y en una ubicación precisa. Sobre ellos se sitúan o “hibridan” fragmentos de DNA mono-hebra desconocido, procedentes de tejidos o muestras de pacientes. Los ácidos nucleicos de muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes...) y se incuban sobre el panel con las sondas fijadas. Las bases complementarias se reconocen y se visualiza su hibridación mediante el uso de sustancias fluorescentes, aunque también se puede utilizar quimioluminiscencia o radiactividad. La miniaturización de todo este proceso permite el anclaje, en unos pocos centímetros, de cientos de “spots” de oligonucleótidos, alineados en filas y columnas, cada uno de los cuales se corresponde a una secuencia específica del DNA (**Figura 17**) .



**Figura 17. Fundamentos experimentales de un Microarray de oligonucleótidos de ADN.**

Actualmente existen en el mercado una gran diversidad de chips en función de los objetivos del experimento, siendo los más frecuentes de proteínas, tejidos ADN de cDNA... En nuestro caso hemos utilizado los chips de expresión GeneChip miRNA 4.0® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

GeneChip miRNA 4.0® utiliza como base de datos la miRBase versión número 20. Este chip en cuestión cuenta con 2.578 miRNAs maduros de humanos y con 2.025 pre-miRNAs humanos. Además, también nos permite valorar otros tipos de RNA humanos como los snoRNA, CDBox RNA, o scaRNA entre otro. Este chip también contiene RNAs para más de 203 organismos diferentes entre los cuales destacamos rata y ratón como ejemplos. Este chip es de gran especificidad ya que como cantidad de RNA de partida se necesitarían una cantidad total de entre 130-500 ng.

El objetivo de la utilización de este tipo de chips es detectar genes que se expresan en un tejido, un biofluido....

Desde la aparición de esta novedosa tecnología los estudios que se han realizado con los microarrays han crecido exponencialmente según refleja el número de publicaciones

anuales. Son múltiples las aplicaciones que permite esta tecnología desde estudiar los genes que se expresan diferencialmente en varias condiciones (sanos/enfermos, tratados/no tratados, mutantes/salvajes), clasificación molecular de diversas enfermedades complejas, predicción de respuesta a un tratamiento...

#### 3.4.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS (Partek Genomic Suite®)

Una vez obtenidos los datos procedentes de los microarrays se usó el software informático Partek Genomic Suite® (Partek, Inc., St Louis, MO, USA) con el que podemos procesar todos los datos. Es un software específicamente diseñado para llevar a cabo alineamientos front-end, controles de calidad, cuantificación de RNA, y análisis de datos en secuenciación de nueva generación.

Se importaron los archivos *cel.data* proporcionados por el servicio de arrays del IIS La Fe a PARTEK Genomic Suite® (PARTEK, Inc., St Louis, MO, USA). Se llevó a cabo un proceso de normalización de los datos mediante un algoritmo bioinformático del programa. Después de estos análisis se creó con PARTEK una lista de miRNA con un p-valor de 0,05 (controles frente pacientes).

Con PARTEK también llevamos a cabo:

##### 1) Clústers jerárquicos

Los clústers jerárquicos nos permiten agrupar “objetos” similares, en nuestro caso muestras. Cada fila o cada columna se considera un grupo. En el agrupamiento jerárquico, los dos clústers más similares se combinan y continúan combinándose hasta que todos los objetos están en el mismo grupo. El producto de este agrupamiento es un “árbol” llamado dendrograma, que muestra la jerarquía de los conglomerados. Esto nos da la posibilidad de llevar a cabo un primer análisis exploratorio para ver como los microarrays se agrupan en base a la similitud de características. El agrupamiento jerárquico se considera un método de agrupación no supervisado, es decir, que no toma en cuenta ninguna de las variables experimentales como el tratamiento, el fenotipo, el tejido etc... mientras que los grupos supervisados si consideran las variables experimentales cuando se agrupan.

## II) Componentes principales del análisis (PCA)

Siguiendo con las herramientas bioinformáticas que nos ha proporcionado el PARTEK<sup>®</sup> hemos podido construir los gráficos de los componentes principales del análisis (PCA). El análisis de los componentes principales es una técnica exploratoria que se utiliza para describir la estructura de los datos al reducir su dimensionalidad. El PCA es una transformación lineal que convierte las variables originales en nuevas variables que reciben el nombre de PC (*principal components*). Estas nuevas variables tienen 3 características:

- a) Que los PCs están ordenados por la varianza.
- b) Que los PCs no están correlacionados
- c) Que los PCs pueden explicar la variación en los datos.

Podemos obtener de las variables PC lo que se conoce como PCA (*principal component of analysis*) que consiste en una rotación del eje principal de las variables originales que conserva la variación en los datos. Por lo cual, la varianza total de las variables originales es igual a la varianza total de los PCA.

Los resultados de estos análisis se presentan en forma de un diagrama de dispersión, donde cada punto en el gráfico es una muestra, mientras que los ejes representan los valores de PC originales. Este tipo de análisis se ha utilizado como herramienta exploratoria. Con los diagramas de dispersión de los PCA podemos ver cualquier agrupación en el conjunto de los datos y emitir hipótesis basadas en sus resultados, o bien podemos detectar valores atípicos.

## III) Vulcano plots

Las gráficas de vulcano plots son unas gráficas de dispersión en dos dimensiones utilizadas para visualizar la significación y la magnitud de los cambios en las características (niveles de expresión de un gen) dentro de una comparación predeterminada. Por convención en el eje X se representan las veces de cambio entre dos grupos y está en una escala  $\log_2$ . Por otro lado, en el eje Y encontramos una escala en  $\log_{10}$  con los p-valor de la prueba estadística de la comparación.

Cada punto en la gráfica representa el resultado estadístico de una sola característica (por ejemplo, gen, transcripción, miRNA...). La línea vertical y horizontales negras representan el umbral de las veces de cambio y el valor de  $p$ . Por norma general las líneas verticales representan veces de cambio de  $-2/+2$ . LA línea horizontal representa un valor de  $p$  significativo de 0,05. El número de características (en nuestro caso cada punto represente un miRNA distinto) están arriba o abajo por al menos de 2 veces y tienen un valor de  $p$  inferior a 0,05.

#### IV) ANOVA

El análisis de la varianza (ANOVA) parte de los conceptos de regresión lineal. Un análisis de la varianza permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren. El análisis de la varianza permite superar las limitaciones de hacer contrastes bilaterales por parejas que son un mal método para determinar si un conjunto de variables con  $n > 2$  difieren entre sí. Llevamos a cabo este tipo de análisis para ver si había diferencias entre los diferentes “tratamientos” (control/paciente combinado con las fases del ciclo menstrual y información sobre fertilidad). El ANOVA nos permitió la elaboración de una lista con los miRNAs diferentemente expresado con una significación de  $p$ -valor  $< 0.05$  (utilizamos el paquete estadístico SPSS).

#### V) PCA (*Principal Component Analysis*)

El análisis de Componentes principales (siglas del inglés PCA) es una herramienta estadística que nos ofrece la posibilidad de reducir la dimensionalidad de las bases de datos que estamos manejando. Esta técnica se emplea cuando nuestro objetivo es hacer más sencilla la base de datos y seleccionar un número de predictores menor o bien porque queremos que la comprensión de la base de datos sea más sencilla.



## 3.4.5 ANÁLISIS IN SÍLICO PARA VALIDACIÓN Y SELECCIÓN DE MIRNAS MADUROS

El análisis in sílico tiene la finalidad de predecir posibles genes diana sobre los que pueden actuar los miRNAs diferentemente expresados en el líquido peritoneal de las pacientes frente al perfil de miRNAs de los controles.

Posteriormente, se seleccionarán aquellos miRNAs para su validación que presenten las mayores diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión se refiere entre pacientes y controles. Mediante algoritmos bioinformáticos de libre acceso que se detallan en la **Tabla 7** seleccionamos aquellos miRNAs diferentemente expresados cuyas dianas estuvieran implicadas en procesos de angiogénesis, proteólisis o inflamación en la endometriosis.

Bases de datos para dianas validadas	Bases de datos para dianas predichas
MIRTARBASE	DIANA-MICROT ( <a href="http://diana.imis.athena-innovation.org">http://diana.imis.athena-innovation.org</a> )
TARBASE	MICRORNA.ORG
	MIRRDDB
	RNA22-HSA
	TARGETMINER
	TARGETSCAN-VERT

Tabla 7. Bases de datos para dianas de miRNAs validadas/ predichas.

En este proyecto se utilizaron dos tipos de algoritmos bioinformáticos de libre acceso, por una parte, algoritmos que nos permitían conocer los miRNAs validados y por otra otras que nos proporcionaban información sobre potenciales dianas de acción de estos miRNAs.

En nuestra investigación hemos utilizado varias de estas bases de datos de las que detallaremos alguna a continuación.

I) miRDB

Esta base de datos es una de las más utilizadas, por varias razones, en primer lugar, porque nos da información muy fiable sobre la nomenclatura de los miRNAs, ya que en los últimos años ha habido bastantes modificaciones respecto a la manera de nombrar

los miRNAs [118,231,232]. En esta base de datos podemos encontrar información sobre dianas de miRNAs de cinco especies: humanos, rata, ratón, perro y pollo.

Como resultado de la búsqueda se nos generaran unas tablas, con diversos ítems. Uno de especial importancia es el *target score*. Todas las dianas predichas (targets) tienen un valor de predicción entre 50-100. Este score es asignado por un algoritmo informático de predicción. Los scores más elevados nos estarán indicando una mayor probabilidad de predicción. Por lo tanto, la base de datos nos devolverá las dianas predichas ordenadas de mayor a menor por lo que a *target score* se refiere. Desde la base de datos se recomienda que para una buena fiabilidad en la predicción tengamos en cuenta solo los *score* > 80. Si estamos interesados en alguna diana predicha con un *score* <60 recomiendan buscar alguna otra evidencia que permita predecir esa diana.

Como hemos comentado anteriormente, también encontraremos el nombre completo del miRNA normativizado, así como una descripción del gen que se predice que puede estar regulando.

#### II) TargetScan

Otra de las bases de datos que hemos consultado con el fin de contrastar los datos de miRDB ha sido TargetScan [233]. TargetScan puede predecir las dianas de miRNA basándose en la búsqueda de regiones conservadas de 8mer, 7mer, 6mer que hacen referencia a los nucleótidos complementarios en los que se basan las predicciones.

Estos tres sitio 8mer, 7mer, y 6mer (**Figura 18**) son las *seed región* que predice con mayor probabilidad. Aunque TargetScan también nos da la posibilidad de identificar sitios menos conservados.



miRNA	Secuencia miRNA 5'-3'	Dianas Validadas (miRTarbase)	Dianas Predichas (TargetScan)
hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	VEGFA, PDGFB-C, THSD4 (TSP-1D4), SERBP1, ADAMTS2	COL3A1, VEGFA, DNMT3A, TMEM183A, COL5A3, COL11A1, DNMT3B, TNFRSF1A, COL15A1, COL19A1, COL4A2, TMEM169, COL4A1, COL22A1, COL5A2, TMEM65, TET2, STX16,
hsa-miR-106b-3p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	GAPDH, TET3, macrófagos	No hay
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUACUGAGUU	MIF, IL6R, MMP2, MMP9, BCL2, MYC, ABCB1, TMED7	MIF, IL6R, FGF5,
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	TMED1 (vesicular trafficking, innate immunity), SERPINE-1 (PAI-1), IGF1, CADM1	FGF7, FOXO1 (vía Notch), CADM1
hsa-miR-1343-5p	UGGGGAGCGGCCCGGGUGGG	IL21R, COL1A2, AGO2,	VEGF-A, CLDN9, TNF, IL2RB, WNT7A, IL17C, VAMP2, NGFR, WNT4,

**Tabla 8. Recopilación de las dianas predichas y validadas de los miRNAs.** Dichas dianas presentan diferencias significativas en los niveles de expresión entre controles y pacientes.

Además de los anteriores miRNAs seleccionados, y no habiéndose observado diferencias significativas en los arrays, se decidió medir el miR-130a-3p, -150-5p, -185-5p y 195-5p basándonos en resultados previos de nuestro grupo teniendo en cuenta que dichos miRNAs también tenían diana de relevancia para la etiopatogenia de la enfermedad (Tabla 9).

miRNA	Secuencia miRNA 5'-3'	Dianas Validadas
hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	SERPINE1, COL4A1, IL6R, COL4A5, VEGFA, COL1A2, SERPINB7, FAS (TNFR superfamilia)
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	No posee* ADAM12
hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA	VEGFA, THSD7A, CLDN11, IL17R, HIF3a, EDA2R
hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC	COL12A1, CDCA4, BCL2L2, VEGFA, CLDN12, CCND1, SERBP1, DICER1, ADAMTS5, GHR, CLDN2, ESRRA, ESRRG, ADAMTS1

Tabla 9. Dianas validadas de los miRNAs que no presentan diferencias significativas en los niveles de expresión entre controles y pacientes.

#### 3.4.6 VALIDACIÓN POR qRT-PCR

Para validar los resultados obtenidos a partir del array se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa de manera reversa en tiempo real. Esta fase de validación se centró en los 9 miRNAs cuyas dianas se centraban en procesos de angiogénesis, proteólisis, inflamación o relacionados con la endometriosis en base a los resultados de estudios anteriores de nuestro grupo. Se utilizó como normalizador externo para verificar el correcto desarrollo del proceso el cel-miR-39-3p.

La cuantificación se llevó a cabo en muestras de RNA total usando el ensayo RT-PCR Exiqon. El miRCURY LNA™ Universal RT (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) es un sistema diseñado para detectar de manera muy sensible miRNA por medio de una PCR cuantitativa a tiempo real usando SYBR® Green. Este método está basado en una retrotranscripción inversa (RT) seguida de una PCR cuantitativa a tiempo real con *primers* LNATM.

El primer paso una vez extraído el RNA de las muestras del biofluido (s líquido peritoneal) era obtener el cDNA para ello utilizamos el *Universal cDNA Synthesis Kit II* (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). Esto nos permite hacer una única RT que vamos a poder

utilizar para llevar a cabo todas las PCRs específicas que consideremos, evitándonos protocolos más largos como los más clásicos en los que se tenía que realizar una RT específica por cada miRNA que se quería medir.

Posteriormente las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Entonces, se aplicó la técnica de PCR para amplificar el cDNA de las diferentes muestras usando el ensayo ExiLENT SYBR® Green, que es un máster mix de PCR específicamente diseñado por Exiqon miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR system. (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Este protocolo utiliza cebadores químicamente modificados (LNA™).

El protocolo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante en un termociclador Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) y se consideraron válidos ciclos  $\leq 35$  (Figura 19).

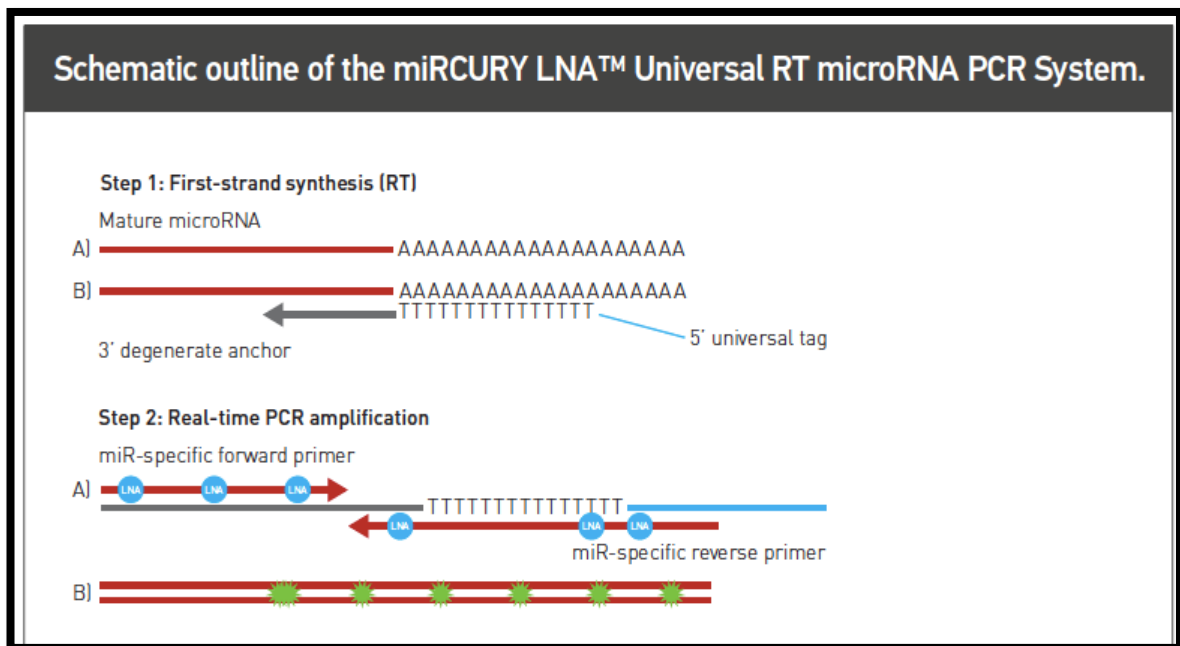


Figura 19. Esquema de miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR System (Fuente: Instruction manual v 6.2 miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR)

Por último, la cuantificación relativa de la expresión de los miRNAs se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , usando el cel-miR-39-3p como normalizador exógeno, habiéndolo añadido a la muestra antes de la extracción de RNA. Los resultados obtenidos se representan como veces de cambio relativas a la media de los valores de controles.

#### 3.4.7 CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS

VEGF, MIP-1 $\beta$ , PDGF-1 $\beta$ , RANTES, IL-6, IL-8 e IL-17 considerados como metabolitos de interés en la patología, se cuantificaron usando el Kit MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Kit Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Luminex<sup>®</sup> Corporation, Austin, Texas, USA).

Esta tecnología es multiparamétrica y posibilita el análisis simultáneo de hasta 100 analitos distintos de una misma muestra en un solo pocillo. El protocolo consiste en un inmunoensayo en la que se utilizan esferas magnéticas marcadas con anticuerpos contra los metabolitos de interés a medir. Este protocolo se realizó según las recomendaciones del fabricante y las placas se leyeron en el citómetro de placas Luminex 200 (Luminex<sup>®</sup> Corporation, Austin, Texas, USA).

Posteriormente los data.file se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 20 para Windows (SPSS Inc.).

#### 3.4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todas las variables estudiadas mostraron una distribución normal tras aplicar el test Kolmogorov-Smirnov. Los datos se han expresado como media  $\pm$  error típico de la media (ETM). Las diferencias entre las medias se analizaron mediante el test ANOVA.

Cuando se detectaron valores de  $p$  significativos, se realizaron los análisis post-hoc mediante el test de Bonferroni. Las diferencias entre las variables estudiadas en líquidos peritoneales de mujeres con endometriosis vs. mujeres sin endometriosis para el mismo tratamiento se analizaron mediante un test t-Student para muestras no pareadas.

Las diferencias entre los dos grupos en las variables estudiadas fueron analizadas usando el test *t Student* y el *U test* de Mann-Whitney. Las diferencias entre las variables de estudio entre varios grupos se calcularon mediante el test ANOVA o Kruskal-Wallis.

Las correlaciones entre las variables se calcularon mediante el test de correlación bivariante de Pearson. Se consideraron significativos *p valores*  $< 0.05$  (test de dos colas).

Los test estadísticos se realizaron usando el software SPSS versión 20 para Windows (SPSS Inc.).





## 4.RESULTADOS



#### 4.1 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE miRNAs EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS.

Se ha demostrado que el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis tiene potencial regulador sobre las células endometriales y endometriósicas tanto de pacientes como de controles. Por ello nos propusimos como objetivo caracterizar el perfil de miRNAs en líquido peritoneal que tenían las pacientes con endometriosis.

Se ha caracterizado el perfil de miRNAs mediante arrays de expresión en seis muestras de líquido peritoneal de pacientes y en seis muestras de líquido peritoneal de mujeres control, teniendo en cuenta seleccionar dos muestras por cada fase del ciclo menstrual (secretora, proliferativa y menstrual).

Se seleccionaron 6 pacientes y 6 controles pareados por fase del ciclo. Seleccionamos aquellas muestras que eran más representativas y cumplían los mejores parámetros de calidad.

El hecho de seleccionar 12 muestras únicamente para los arrays (**Tabla 10**), se debe a que dicha metodología técnica supone un método exploratorio que nos permitió tener una imagen global de todos los miRNAs diferentemente expresados en ambos grupos clínicos. De todos los miRNAs que se mostraron con diferencias entre controles y pacientes seleccionamos concretamente aquellos que realmente mostraban diferencias estadísticas significativas y por lo tanto posibles biomarcadores de enfermedad.

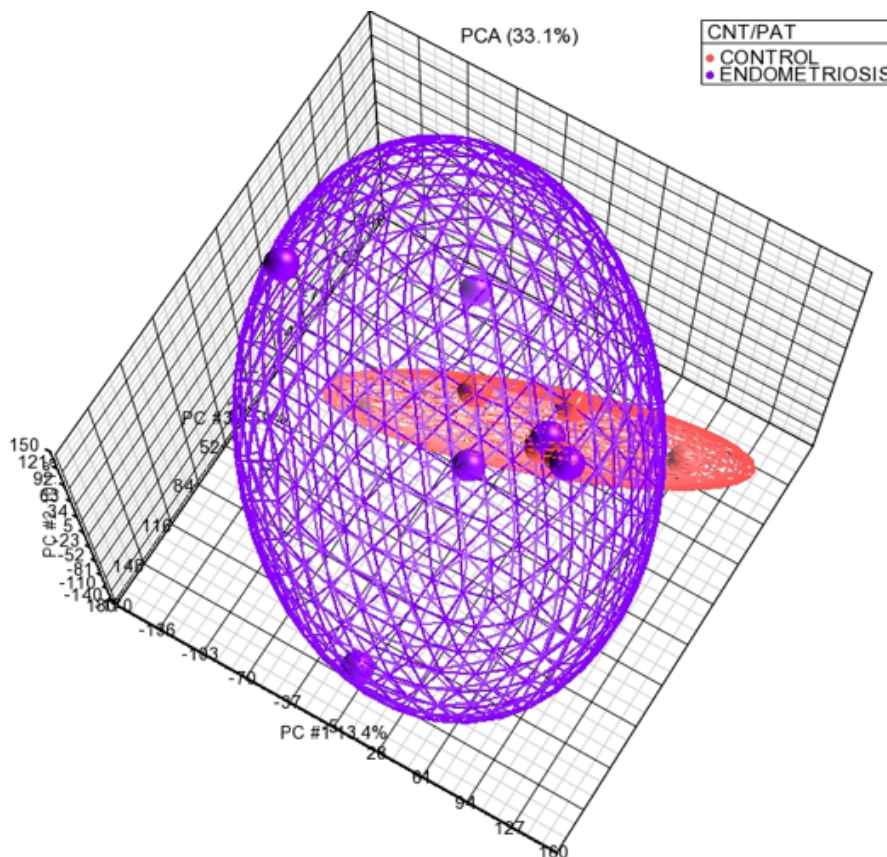
Una vez seleccionados estos, procederíamos a su validación en una cohorte mucho mayor de pacientes y controles (126 pacientes y 25 controles)

<b>Presencia de endometriosis</b>	<b>Nº</b>	<b>Edad media (años)</b>
<b>Pacientes</b>	6	35,67
<b>Controles</b>	6	35,17

Tabla 10. Número de muestras seleccionadas para el array con medias de edad.

Se ha observado, mediante un análisis de los componentes principales, teniendo en cuenta el factor “paciente”, diferencias significativas entre muestras. Este análisis nos permite una primera aproximación exploratoria de los datos mostrándonos que el grupo de pacientes presentan una mayor dispersión por lo que se refiere al contenido de miRNA.

En la **Figura 20** observamos que la esfera de color morado (pacientes) es mucho más grande que la de color rojo (controles). Este fenómeno nos indica que los pacientes tienen una mayor dispersión en cuanto a la variedad de miRNAs diferentemente expresados si lo comparamos con los controles.



**Figura 20.** Analisis de los componentes principales (PCA del inglés Principal Component Analysis). Se compara los patrones de expresión de los miRNA entre las pacientes con endometriosis y las mujeres control.

Mediante el array se ha detectado que existen 126 miRNAs maduros que están diferentemente expresados ( $p < 0,05$  y  $> 1,2$  veces de cambio) en las 6 muestras de líquido peritoneal de pacientes con endometriosis (48 *up-regulated* y 78 *down-*

*regulated*) comparado con los 6 controles (**Tabla 1 y Anexo 2**).

De la tabla que figura en el anexo 1 se seleccionaron los siguientes miRNAs (**Tabla 11**) para su posterior validación por qRT-PCR, puesto que se observaron dianas implicadas en diferentes mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad.

miRNA	P-valor	Fold-Change
hsa-miR-1343-5p	4.66E-02	-3.418
hsa-miR-29c-3p	4.36E-02	-1.295
hsa-miR-106b-3p	1.22E-02	1.689
hsa-miR-451a	3.49E-02	4.172
hsa-miR-486-5p	3.86E-02	8.235

**Tabla 11. miRNAs seleccionados para el array.** Muestra los 6 miRNAs que se han seleccionado por su relevancia en la patología y por su significación estadística del array ( $p < 0,05$  y  $> 1,2$  veces de cambio).

Además de los miRNAs anteriores, también se seleccionaron para su posterior validación por qRT-PCR 4 miRNAs extras (**Tabla 12**) debido a sus potenciales dianas que podían estar involucradas en procesos tales como angiogénesis, proteólisis y remodelación celular en la endometriosis, aunque estos no tuvieran una significación estadística en el array.

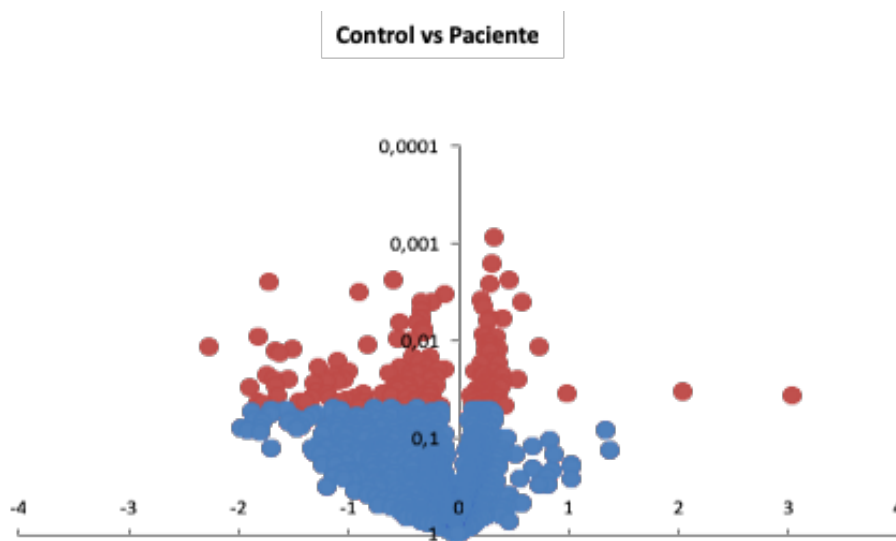
miRNA	P-valor	Fold-Change
hsa-miR-130a-3p	0.7838	-1.173
hsa-miR-150-5p	0.5394	1.146
hsa-miR-185-5p	0.1418	2.634
hsa-miR-195-5p	0.8291	1.094

**Tabla 12. miRNAs seleccionados por su importancia en la patología.** Muestra los 4 miRNAs que se han seleccionado por su relevancia en la patología, aunque no tuvieran diferencias significativas en el array.

Se observaron diferencias cualitativas representando los datos del ANOVA en diferentes diagramas tipo *vulcano plot*. Estos gráficos de dispersión nos permiten ver una primera aproximación a las diferencias entre grandes conjuntos de datos como son nuestros resultados de los arrays.

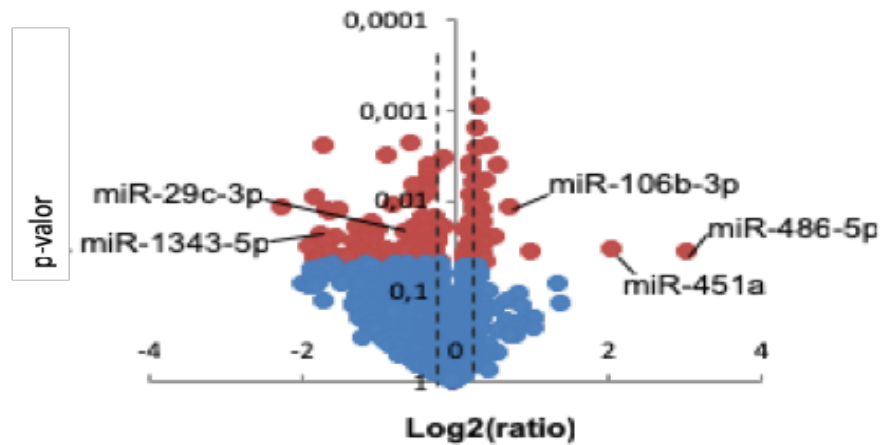
En primer lugar, si observamos la **Figura 21** nos muestra el contraste entre controles y pacientes. Lo que representan cada punto son los diferentes miRNAs estudiados. En la

**Figura 21** se muestran en color rojo los miRNAs que se encuentran diferentemente expresados en controles y pacientes con más de 1,2 veces de cambio y un *p*-valor < 0,05 y en azul aquellos miRNAs cuya expresión no presenta diferencias significativas entre el grupo de controles y pacientes. Del 0 hacia la derecha se representan aquellos miRNAs que están aumentados en las pacientes respecto de los controles y hacia la izquierda del 0 aquellos que se encuentran infra expresados en los pacientes con respecto a los controles.



**Figura 21. Vulcano plot del contraste controles vs pacientes.** Se encuentran representados los miRNAs en los cuales existe una diferencia entre controles y pacientes de más de 1,2 veces de cambio y un *p*-valor < 0,05. En rojo se representan los miRNAs con un *p* < 0,05, puntos azules *p* > 0,05.

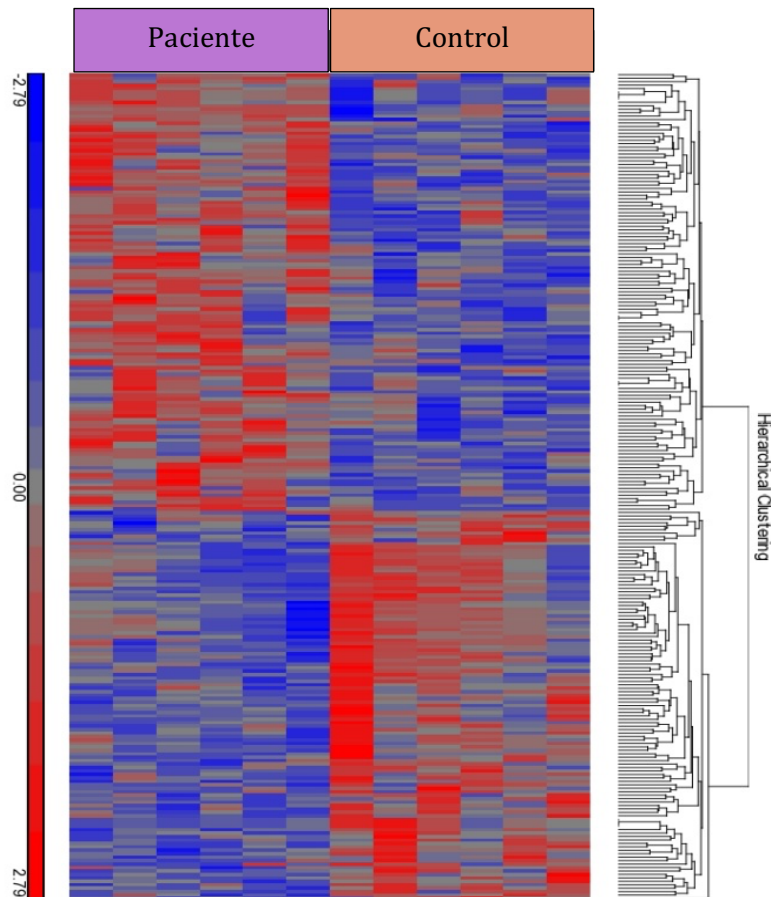
A continuación, con el fin de evaluar la magnitud de las diferencias entre controles y pacientes se representó mediante *vulcano plot* gráfico 2. las veces de cambio [ $\log_2$  (ratio endometriosis/control)] vs *p*-valor de cada miRNA maduro. Así mismo en el siguiente *vulcano plot* destacamos los miRNAs que hemos seleccionado con su posterior validación por RT-qPCR. De esta manera gráfica vemos que el miR-29c-3p y el miR-1343-5p se encuentra infra-expresado en los controles respecto a los pacientes. Por el otro lado serán los miR-106b-3p, miR-486-5p y miR-451a (**Figura 22**) los que se encuentren sobre-expresados en las pacientes comparado con los niveles que los mismos miRNAs presentan en las controles.



**Figura 22. Vulcano plot del contraste controles vs pacientes con miRNAs.** Se encuentran representados los miRNAs en los cuales existe una diferencia entre controles y pacientes de más de 1,2 veces de cambio y un p-valor  $< 0,05$  de aquellos miRNAs que se han encontrado que tienen dianas importantes en los fenómenos etiopatogénicos. Puntos rojos  $p < 0.05$ , puntos azules  $p > 0.05$ . Las líneas discontinuas representan  $\pm 1,2$  veces de cambio

Con el fin de evidenciar las diferencias en el perfil de expresión de los miRNAs en el líquido peritoneal de mujeres y controles los 126 miRNAs con diferencias significativas fueron representados de manera conjunta en un *clúster* jerárquico (**Figura 23**) evidenciando así un perfil de expresión claramente diferenciado entre controles y pacientes.





**Figura 23. Clúster jerárquico supervisado.** Se han representado los 126 miRNAs con valores significativos y +/- 1,2 veces de cambio y p valor < 0,05.

Posteriormente, una vez evidenciadas las diferencias entre controles y pacientes se hizo un estudio *in silico* de las dianas tanto predichas como validadas de los miRNAs que habían presentado diferencias significativas. Se seleccionaron aquellos miRNAs cuyas dianas según miRBase estaban relacionados con los procesos de angiogénesis, proteólisis y procesos inflamatorios que estuvieran implicados en la endometriosis.

Después del análisis *in silico* se determinaron que el miR-29c-3p, -106b-3p, -451a, -486-5p y 1343-5p se validarían por qRT-PCR basándonos en las dianas (**Tabla 13**) tanto validadas como predichas de los mismos. Así, de los miRNAs valorados en el array como posibles candidatos medimos 3 miRNAs que estaban sobre-expresados en el líquido peritoneal de las pacientes (miR-106b-3p, -451a y -486-5p) y 2 miRNAs que estaban infra-expresados en el líquido peritoneal de las pacientes (miR-29c-3p y -1343-5p).

Respecto al criterio de selección de los miRNAs escogidos para validar posteriormente por RT-qPCR, se priorizaron de entre los 126 miRNAs aquellos miRNAs cuyos targets estuvieran relacionados con la patología.

miRNA	Secuencia miRNA 5'-3'	Dianas Validadas (miRTarbase)	Dianas Predichas (TargetScan)
<b>hsa-miR-29c-3p</b>	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	VEGFA, PDGFB-C, THSD4 (TSP-1D4), SERBP1, ADAMTS2	COL3A1, <b>VEGFA</b> , DNMT3A, TMEM183A, COL5A3, COL11A1, DNMT3B, TNFRSF1A, COL15A1, COL19A1, COL4A2, TMEM169, COL4A1, COL22A1, COL5A2, TMEM65, TET2, STX16,
<b>hsa-miR-106b-3p</b>	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	GAPDH, TET3, macrófagos	No hay
<b>hsa-miR-451a</b>	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	MIF, IL6R, MMP2, MMP9, BCL2, MYC, ABCB1 TMED7	MIF, IL6R, FGF5,
<b>hsa-miR-486-5p</b>	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	TMED1 (vesicular trafficking, innate immunity), SERPINE-1 (PAI-1), IGF1, CADM1	FGF7, FOXO1 (vía Notch), CADM1
<b>hsa-miR-1343-5p</b>	UGGGGAGCGCCCCGGUGGG	IL21R, COL1A2, AGO2,	VEGF-A, CLDN9, TNF, IL2RB, WNT7A, IL17C, VAMP2, NGFR, WNT4,

**Tabla 13. miRNAs seleccionados para su validación por RT-qPCR.** Se muestran los miRNAs seleccionados a partir de los resultados del array para su posterior validación por RT-qPCR y su secuencia. Se muestra la secuencia del miRNA, así como los targets sobre los que actúa.

Además de los anteriores miRNAs seleccionados, y no habiéndose observado diferencias significativas en los arrays, se decidió medir el miR-130a-3p, -150-5p, -185-5p y 195-5p basándonos en resultados previos de nuestro grupo teniendo en cuenta que dichos miRNAs también tenían diana de relevancia para la etiopatogenia de la enfermedad (**Tabla 14**).

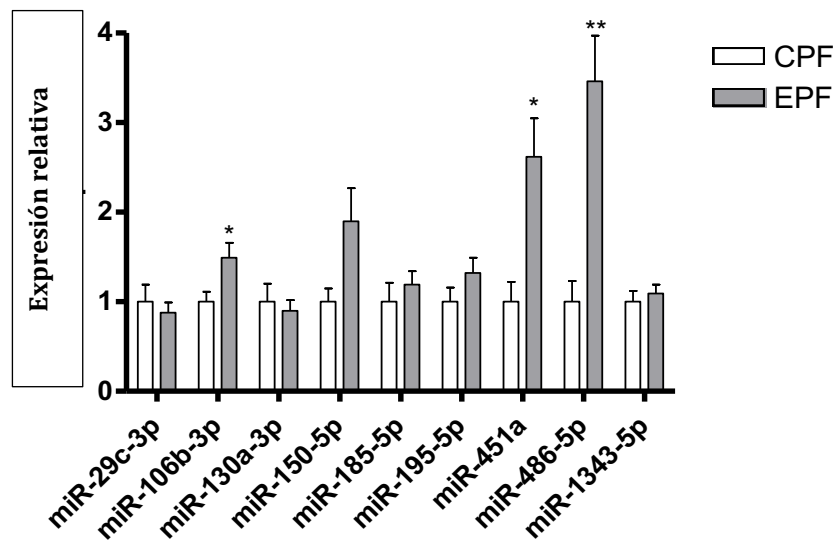
<b>miRNA</b>	<b>Secuencia miRNA 5'-3'</b>	<b>Dianas Validadas</b>
<b>hsa-miR-130a-3p</b>	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	SERPINE1, COL4A1, IL6R, COL4A5, VEGFA, COL1A2, SERPINB7, FAS (TNFR superfamilia)
<b>hsa-miR-150-5p</b>	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	
<b>hsa-miR-185-5p</b>	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	VEGFA, THSD7A, CLDN11, IL17R, HIF3a, EDA2R
<b>hsa-miR-195-5p</b>	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC	COL12A1, CDCA4, BCL2L2, VEGFA, CLDN12, CCND1, SERBP1, DICER1, ADAMTS5, GHR, CLDN2, ESRR, ESRRG, ADAMTS1

Tabla 14. miRNAs seleccionados a partir de la experiencia previa del grupo para su posterior validación por qRT-PCR.

Estos miRNAs se encuentran principalmente, regulando la expresión de VEGFA que es el principal factor regulador de la angiogénesis y el remodelado extracelular que contribuye a la formación de la lesión endometriósica [125]. Se demostró que estos miRNAs estaban infra-expresados en células estromales de endometrio de pacientes con endometriosis después de ser tratados con líquido peritoneal de pacientes con endometriosis [128].

#### 4.2 VALIDACIÓN DE LA SELECCIÓN DE MIRNAS POR qRT-PCR.

Una vez analizados los resultados de los arrays y sabiendo cuales eran los miRNAs que estaban diferentemente expresados nos propusimos validarlos mediante otra técnica como era la qRT-PCR. Como se muestra en la **Figura 24** se detectó una sobre expresión en pacientes de los miRNAs miR-106b-3p, miR-451a y miR-486-5p en el líquido peritoneal de pacientes respecto de los controles.



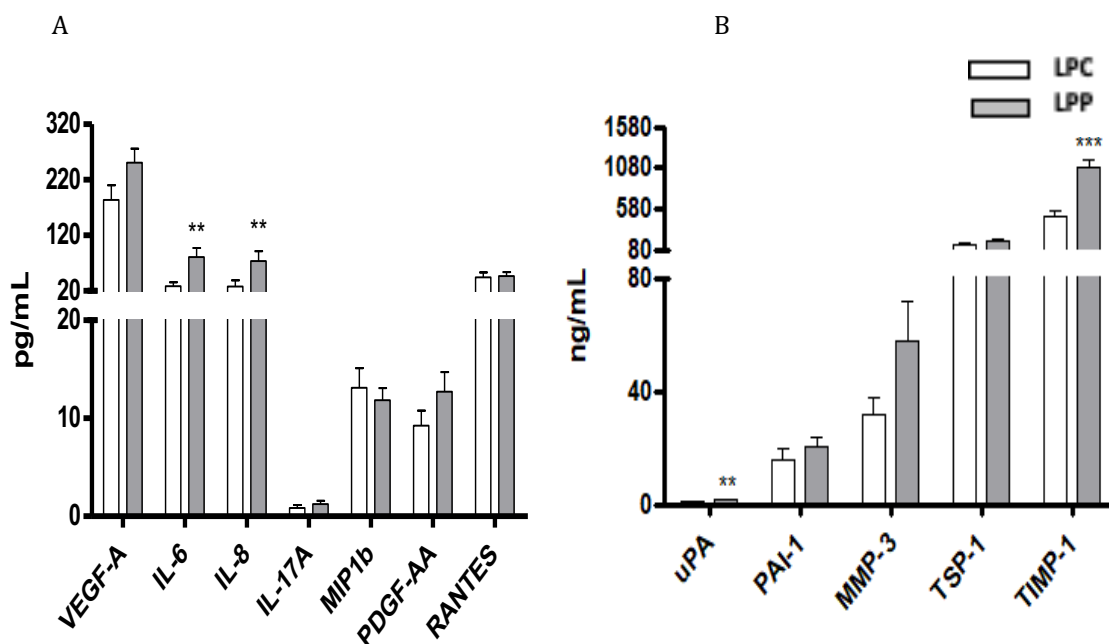
**Figura 24.** Niveles de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes (EPF) y controles (CPF). Los datos están presentados como veces de cambio (fold Change del inglés) otorgando el valor de 1 para las mujeres sin endometriosis (CPF=1). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 vs. CPF

Con esta técnica validamos que de los 5 miRNAs seleccionados por sus diferencias significativas en el array encontramos que al validarlos mediante RT-qPCR sólo miR-106b-3p, -486-5p y -451a presentaron una expresión relativa con diferencias significativas entre controles y pacientes. También se encontró que el miR-150-5p presentaba niveles más elevados en el líquido peritoneal de pacientes respecto a los controles, pero sin diferencias significativas. Y por último no encontramos diferencias en los otros miRNAs evaluados.

### 4.3 NIVELES PROTEICOS EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES COMPARADOS CON LOS NIVELES PRESENTES EN EL LÍQUIDO PERITONEAL DE LOS CONTROLES.

Con la finalidad de seguir profundizando en la caracterización del líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis, nos propusimos evaluar los niveles de una serie de metabolitos relacionados principalmente con los procesos inflamatorios y angiogénicos que subyacen a la patología. Estos metabolitos se seleccionaron para estudiarlos en el líquido peritoneal basándonos en la experiencia previa que tenía nuestro grupo en los mismos, los cuales ya habíamos determinado en estudios anteriores del grupo su implicación en la patología [18,132,234].

Se han medido los niveles de las proteínas pro-inflamatorias y angiogénicas más importantes (VEGF-A, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP1b, PDGF-AA, RANTES, uPA, PAI-1, MMP3, TSP-1 y TIMP-1) con el objetivo de conocer el estado inflamatorio y angiogénico del líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis. En la **Figura 25** se muestran los niveles de IL-6, IL-8, uPA y TMP-1 que estaban significativamente sobre-expresados (*up-regulated*) en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis. También se puede observar esta misma tendencia en los niveles de VEGF-A y MMP-3, sin embargo, en este caso no se observaron diferencias significativas.



**Figura 25. Niveles proteicos en líquido peritoneal de pacientes (EPF) y controles (CPF).** Los datos representados son la media  $\pm$  desviación típica (SEM).

#### 4.4 CONTENIDO DE miRNAs EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES Y CONTROLES SEGÚN LAS FASES DEL CICLO MENSTRUAL.

Con el fin de determinar si existían diferencias en el perfil de miRNAs del líquido peritoneal en las diferentes fases del ciclo menstrual se procedió a analizar los resultados de los arrays teniendo en cuenta como criterio diferenciador en este caso las diferentes fases del ciclo menstrual.

Se han analizado los resultados de los arrays teniendo en cuenta las fases del ciclo menstrual. En la **Figura 26** que corresponde al clúster jerárquico supervisado se representan los niveles de cada miRNA que tienen diferencias estadísticas significativas según la fase menstrual con un valor de  $p < 0.05$  y con unas veces de cambio (FC del inglés fold change) de  $\pm 1,2$ .

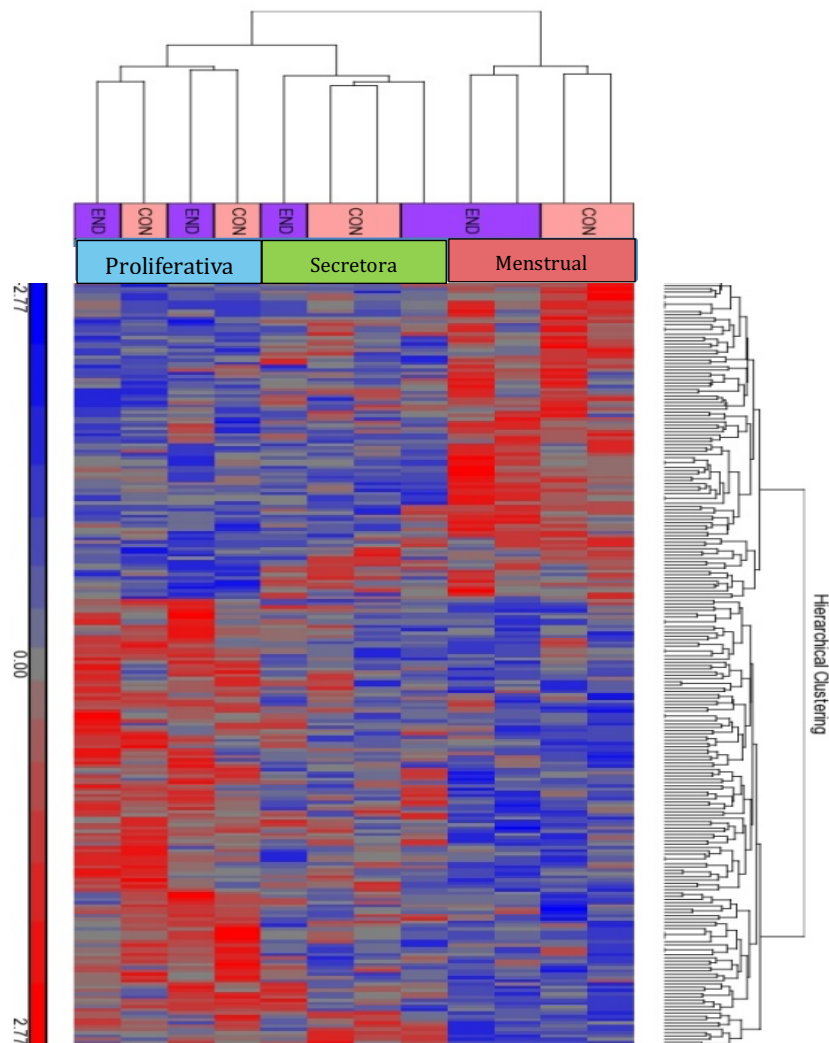
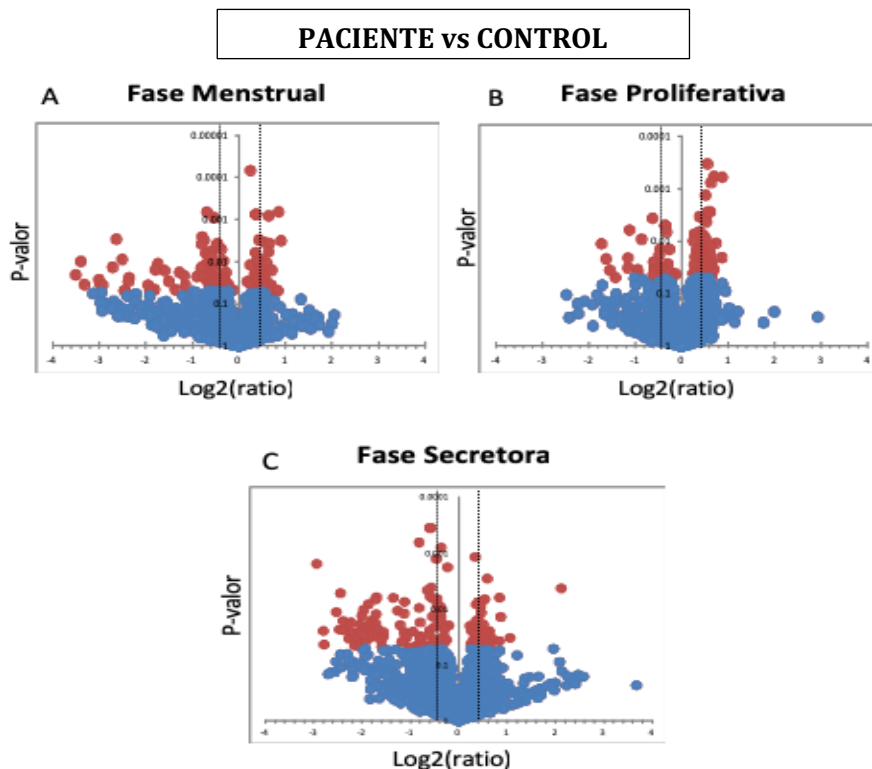


Figura 26. Clúster jerárquico supervisado de los niveles de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes y controles según la fase del ciclo menstrual.

En el algoritmo gráfico anterior (**Figura 26**), se muestran los niveles de expresión de las 12 muestras analizadas, y se puede observar la separación de las tres fases del ciclo como categorías independientes, siendo la fase menstrual aquella que presenta diferencias más evidentes entre controles y pacientes, separándose así también como categorías independientes. No obstante, estas diferencias no se observaron entre las muestras de líquido peritoneal de pacientes y controles en las fases proliferativas y secretoras.

Además de la comparativa anterior, se comparó por medio de *vulcano plots* los niveles de todos los miRNAs estudiados entre el líquido peritoneal de las mujeres control y de las pacientes donde se evidencia la gran cantidad de miRNAs desregulados que existen (**Figura 27**). En este caso al comparar las fases de manera independiente se pudo observar que en las fases menstrual y secretoras había una mayor diferencia en el perfil de expresión de los miRNAs entre controles y pacientes. Esta tendencia no se observaba en la comparativa entre controles y pacientes en la fase proliferativa.



**Figura 27. Vulcano plots de los arrays de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes y controles por fase del ciclo menstrual.** Las imágenes A-C representan los miRNAs que se encuentra diferencialmente expresados en el líquido peritoneal de pacientes y controles en cada fase del ciclo menstrual. Puntos rojos:  $P < 0.05$ , puntos azules  $P > 0.05$ . Las líneas discontinuas representan  $\pm 1,2$  veces de cambio.

#### 4.5 VALIDACIÓN DE LOS NIVELES DE miRNAs EN LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES Y CONTROLES DE ACUERDO CON LAS FASES DEL CICLO.

Al igual que anteriormente nos propusimos validar por RT-qPCR si existían diferencias significativas en los niveles de los miRNAs estudiados entre pacientes y controles, en este caso el objetivo es similar, pero ahora tendremos en cuenta que esta validación la realizaremos según la fase del ciclo menstrual.

Después de validar por qRT-PCR, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de los miRNAs estudiados en las diferentes fases del ciclo menstrual en el líquido peritoneal de los controles.

Sin embargo, se observaron niveles significativos más altos de los miRNAs miR-106b-3p, -130a-3p, 150-5p, -451a y -486-5p en la fase menstrual que en las fases secretora y proliferativa de los líquidos peritoneales de las pacientes (**Figura 28**).



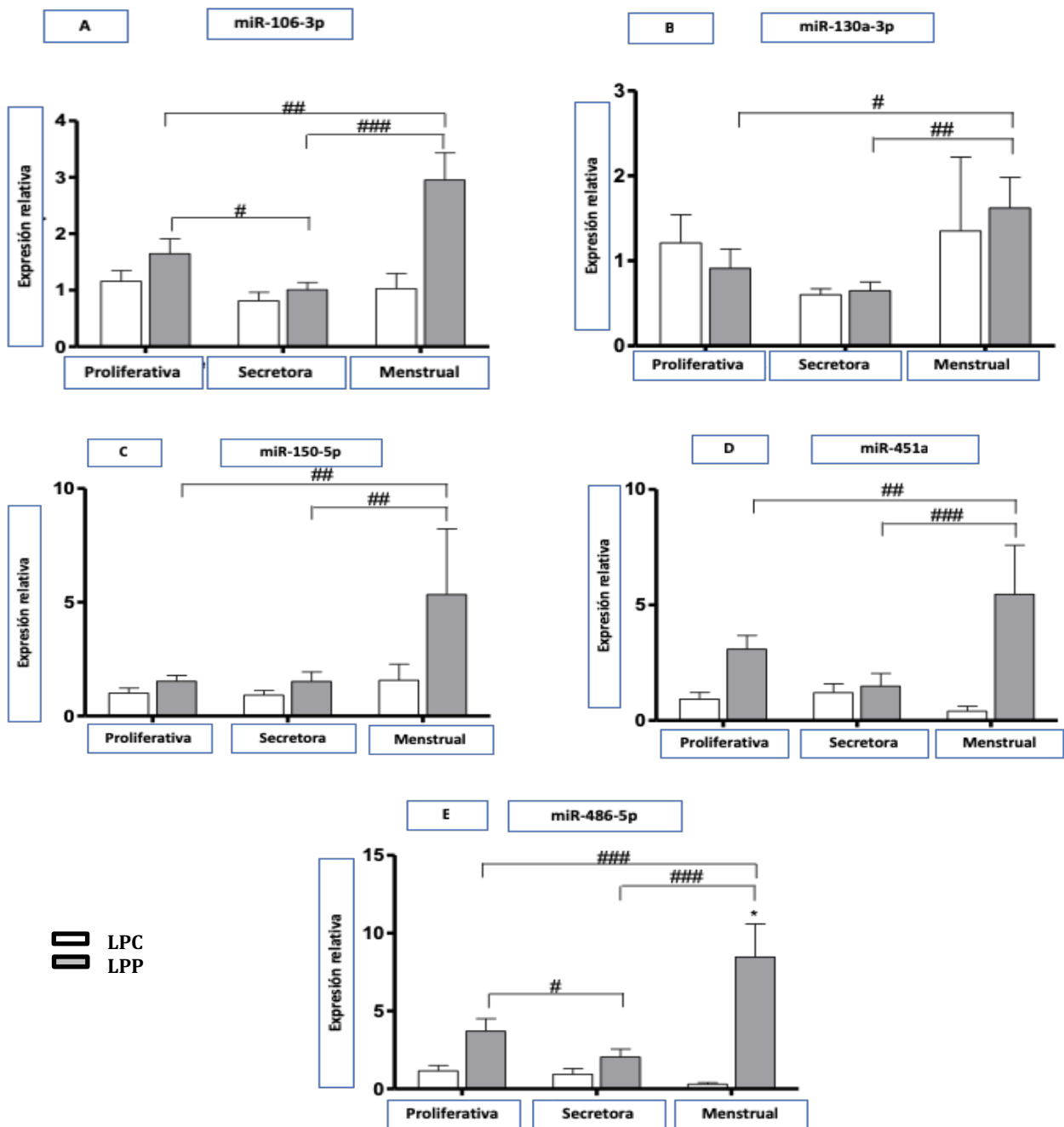
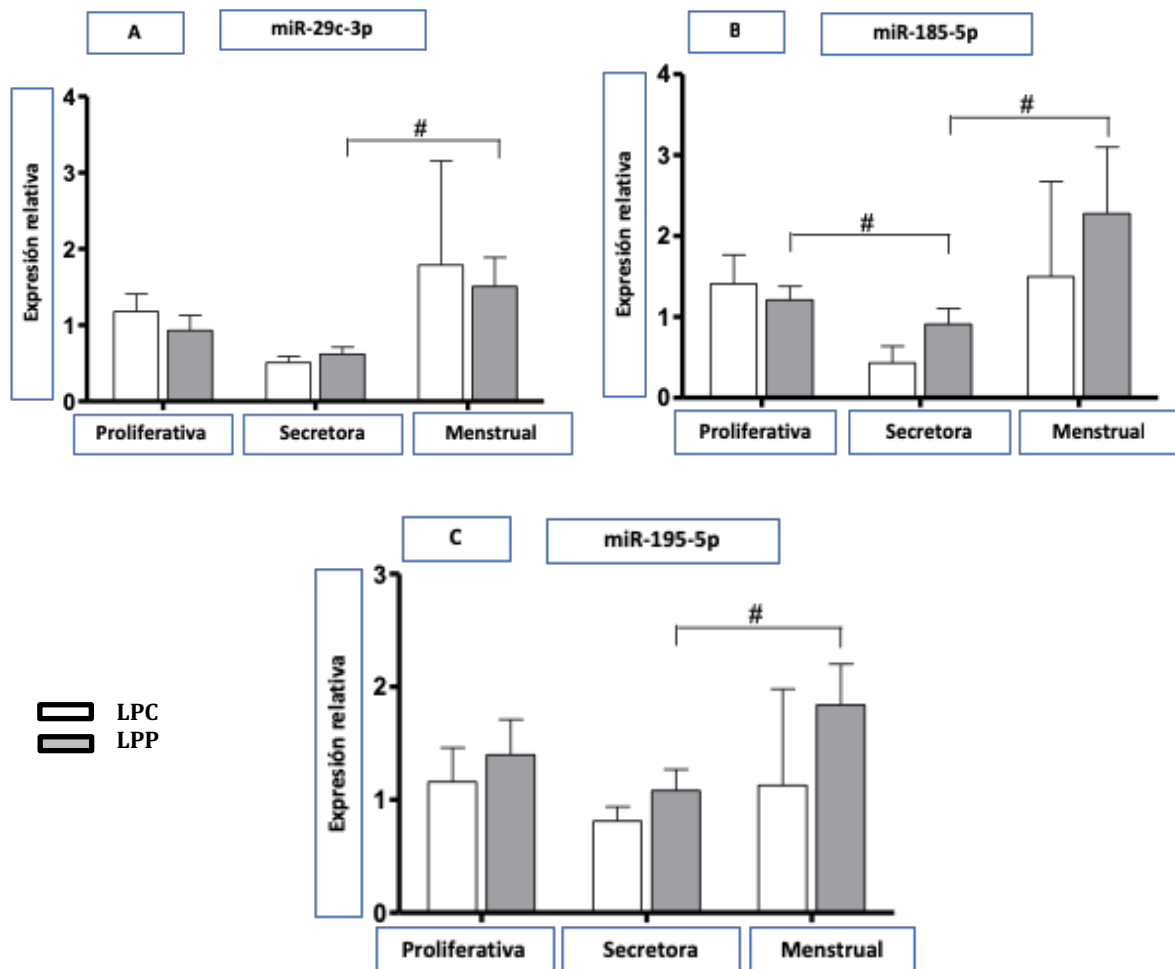


Figura 28. Niveles de miRNAs (A- miR-106-3p; B- miR-130a-3p; C- miR-150-5p; D- 451a; E- miR486-5p), en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. La expresión de los miRNA se presenta como las veces de cambio (del inglés fold change) relativizado a las mujeres sin endometriosis (CPF=1). \*P < 0.05 vs CPF de la misma fase del ciclo. # P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.001 vs, cualquier fase del ciclo.

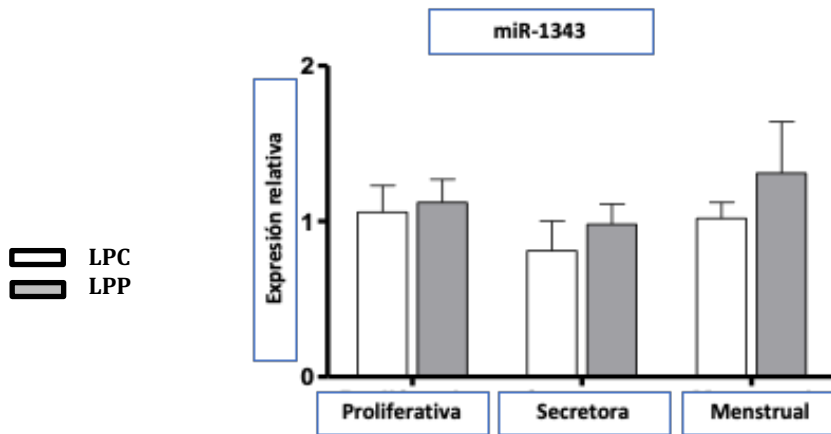
Se han observado niveles significativamente más elevados del miR-486-5p en la fase menstrual del líquido peritoneal de las pacientes comparado con los niveles del mismo miRNA de los controles (**Figura 28 E**).

También se encontró un segundo bloque de miRNAs que presentaban niveles significativamente más elevados en el líquido peritoneal de pacientes en la fase menstrual si lo comparáramos con la fase secretora de dichos pacientes. Los miRNAs miR-29c-3p, -185-5p y -195-5p presentaban niveles significativamente más elevados en el líquido peritoneal de pacientes en la fase menstrual si lo comparáramos con la fase secretora (**Figura 29**).



**Figura 29.** Niveles de miRNAs (A -miR-29c-3p; B -miR-185-5p; C -miR-195-5p) en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. La expresión de los miRNA se presenta como las veces de cambio (del inglés fold change) relativizado a las mujeres sin endometriosis (CPF=1). \*P < 0.05 vs CPF de la misma fase del ciclo. # P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.001 vs, cualquier fase del ciclo.

No se observaron ninguna diferencia significativa por lo que se refiere al miR-1343 entre las diferentes fases del ciclo menstrual cuando comparamos los líquidos peritoneales de pacientes y controles (**Figura 30**).



**Figura 30.** Niveles del miRNA miR-1343 en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. La expresión de los miRNA se presenta como las veces de cambio (del inglés fold change) relativizado a las mujeres sin endometriosis (CPF=1). \*P < 0.05 vs CPF de la misma fase del ciclo. # P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.001 vs, cualquier fase del ciclo.

#### 4.6 ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO EN EL LÍQUIDO PERITONEAL EN FUNCIÓN DEL LA FASE DEL CICLO MESNTRUAL.

Según habíamos visto en estudios previos del grupo quedaba patente el grado de influencia del líquido peritoneal en la expresión de factores angiogénicos y proteolíticos en cultivos celulares de células endometriales de mujeres con endometriosis[132,234]. Así mismo también dilucidamos en otro estudio del grupo el papel que los miRNAs podían ejercer como potenciales reguladores de los factores angiogénicos más importantes de la patología [18].

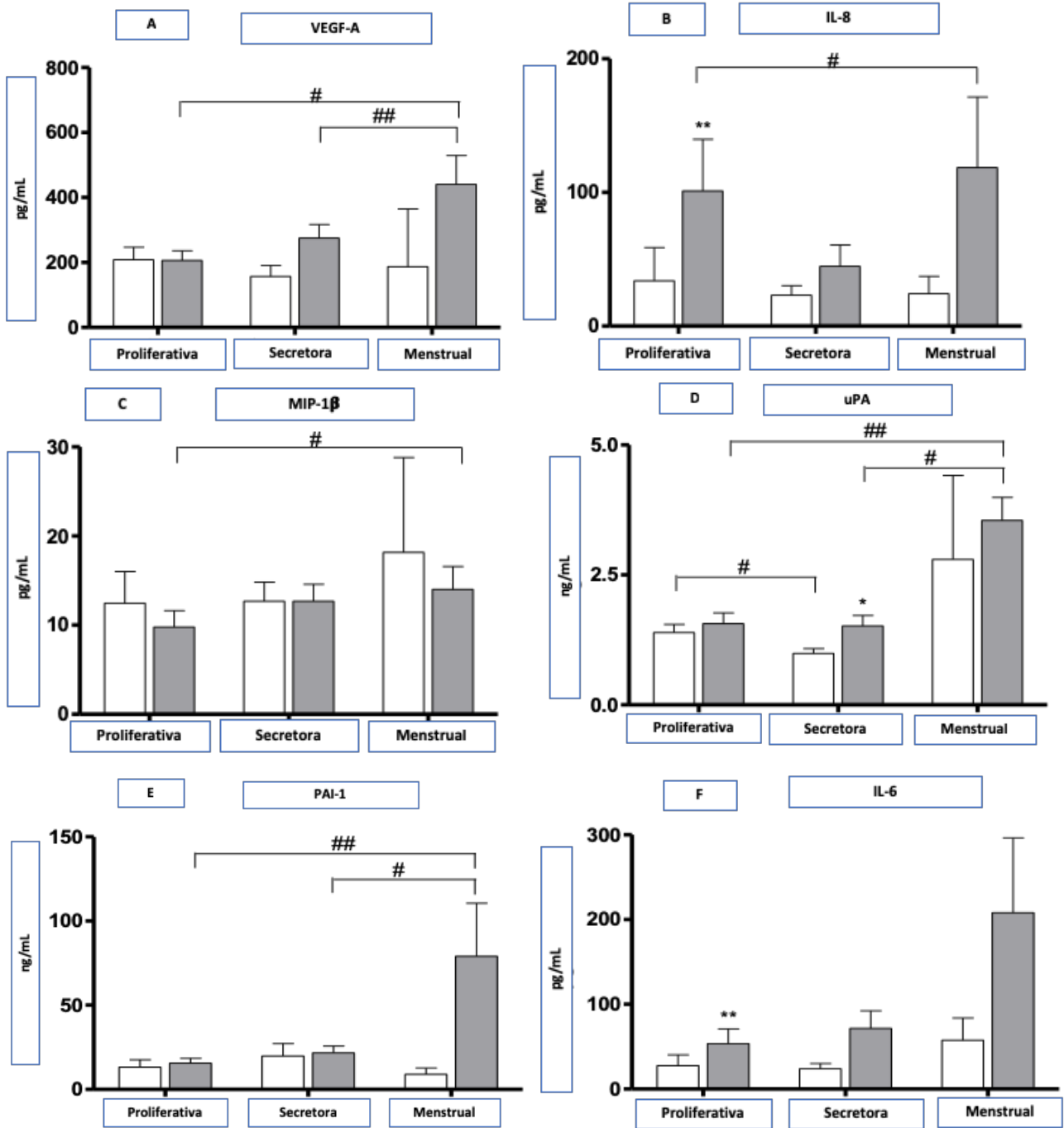
Por ello uno de los objetivos que nos planteamos fue caracterizar si el ambiente peritoneal difería en cuanto a factores angiogénicos y proteolíticos o estado proinflamatorio entre las distintas fases del ciclo, puesto que ya se habían observado diferencias del perfil de expresión de miRNAs entre las distintas fases del ciclo menstrual.

Los resultados obtenidos fueron que no encontramos diferencias significativas en los niveles de VEGF-A, IL-8, MIP1 $\beta$ , uPA y PAI-1 entre las distintas fases del ciclo menstrual en el líquido peritoneal de controles.

Sin embargo, en el líquido peritoneal de las pacientes se han visto que VEGF-A, IL-8, MIP1 $\beta$ , uPA y PAI-1 (**Figura 31A-B-C-D-E**) presentaban niveles más elevados durante la fase menstrual si lo comparábamos con la fase proliferativa. Además, en el líquido peritoneal de pacientes los niveles de VEGF-A, uPA, PAI-1 y MMP-3, en la fase menstrual eran significativamente más elevados en comparación con los niveles de dichas proteínas en la fase secretora.

Cabe destacar que el comportamiento de IL-17A (**Figura 31G**) era el opuesto. Es decir, IL-17A presentaba niveles más bajos en la fase menstrual que en la fase secretora.

También se comprobó que cuando se comparaban los niveles de las citoquinas IL-6, IL-8 y IL 17A en el líquido peritoneal de pacientes con el de los controles estos eran significativamente distintos en la fase proliferativa (**Figura 31**).



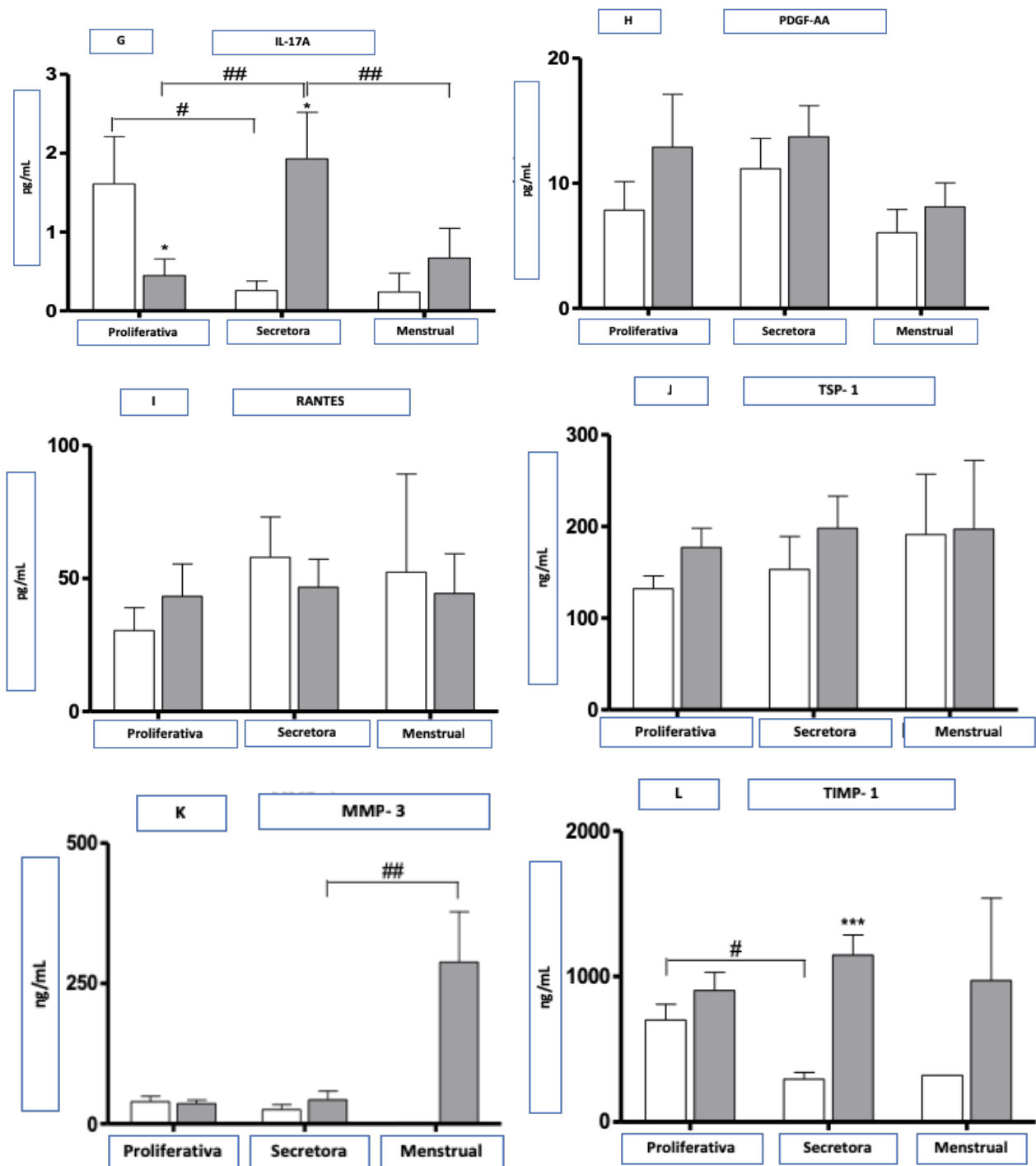


Figura 31. Niveles de proteínas en el líquido peritoneal de pacientes (EPF) y líquido peritoneal de controles (CPF) de acuerdo con las distintas fases del ciclo menstrual. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; P < 0.001 vs CPF en la misma fase del ciclo. # P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.001 vs cualquier fase del ciclo.

#### 4.7 ANÁLISIS SEGÚN EL ESTADO DE SEVERIDAD DE LA ENDOMETRIOSIS.

##### 4.7.1 VALORES DE LOS NIVELES DE MIRNAS SEGÚN EL ESTADIO DE LA PATOLOGÍA

Del mismo modo que en los análisis anteriores, nos planteamos el estudiar la composición en cuanto a contenido de miRNAs se refiere del líquido peritoneal en función del grado de severidad de la enfermedad.

En la **Tabla 15** se muestran los niveles de miRNAs en el líquido peritoneal de las pacientes (LPP) y de los controles (LPC). Podemos observar que los niveles de miR-106b-3p, -451a y -486-5p muestran niveles significativamente más elevados en el líquido peritoneal de las pacientes en fase moderada-severa de la patología (estadios III- IV) si los comparamos con los niveles de los mismos miRNAs en el líquido peritoneal de las mujeres control.

	LPC	LPP	
		(Estadios I-II)	(Estadios III-IV)
<b>miR-29c-3p</b>	1.00±0.19 (n=27)	0.78±0.17 (n=16)	0.91±0.13 (n=60)
<b>miR-106b-3p</b>	1.00±0.11 (n=43)	1.16±0.20 (n=23)	1.57±0.18* (n=97)
<b>miR-130a-3p</b>	1.00±0.20 (n=27)	0.75±0.14 (n=16)	0.94±0.15 (n=60)
<b>miR-150-5p</b>	1.00±0.15 (n=36)	1.90±0.93 (n=21)	1.91±0.40 (n=90)
<b>miR-185-5p</b>	1.00±0.21 (n=40)	1.21±0.28 (n=22)	1.18±0.17 (n=91)
<b>miR-195-5p</b>	1,00±0.16 (n=38)	1.71±0.40 (n=16)	1.24±0.19 (n=80)
<b>miR-451a</b>	1.00±0.22 (n=34)	1.67±0.70 (n=24)	2.78±0.50* (n=98)
<b>miR-486-5p</b>	1.00±0.23 (n=41)	3.22±1.19 (n=22)	3.51±0.56** (n=96)
<b>miR-1343-5p</b>	1.00±0.12 (n=22)	1.13±0.98 (n=13)	1.08±0.11 (n=63)

**Tabla 15. Niveles de miRNAs en LPP (estadios I-II y III- IV) y en LPC.** Los datos están expresados como la media ± EEM (error estándar de la media). Los miRNAs son expresados como veces de cambio relativizados a mujeres sin endometriosis (LPC = 1) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001: vs CPF

Sin embargo, todo y no presentar unos resultados estadísticos significativos, se ha observado una importante tendencia de sobre expresión de los miR-106b-3p y miR-451a, en el estado más avanzado de la patología.

#### 4.7.2 NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y PROTEOLÍTICOS EN LP EN FUNCIÓN DEL ESTADIO DE LA ENFERMEDAD

Los resultados que se presentan en **Tabla 16** nos muestran los distintos niveles de los factores angiogénicos y proteolíticos de interés en la patología. Según podemos observar uPA, PAI-1, TIMP-1, IL-6 e IL-8 presentan valores significativamente incrementados en el líquido peritoneal de pacientes con un estado de la patología moderado-severo si lo comparamos con los valores de los mismos metabolitos en el líquido peritoneal de pacientes.

También podemos observar que TIMP-1 se encontraba significativamente elevado en los estadios iniciales-leves (estadios I- II) de la patología en el líquido peritoneal de las pacientes si lo comparábamos con los controles.

	LPC	LPP	
		(Estadios I-II)	(Estadios III-IV)
VEGF-A (pg/mL)	184±26 (n=42)	168±29 (n=25)	273±30 (n=96)
TSP-1 (ng/mL)	145±18 (n=33)	197±86 (n=11)	187±19 (n=42)
uPA (ng/mL)	1.17±0.09 (n=30)	1.28±0.17 (n=10)	1.72±0.17** (n=46)
PAI-1 (ng/mL)	15.96±3.93 (n=34)	10.07±1.46 (n=16)	23.24±3.38* (n=69)
MMP-3 (ng/mL)	31.71±6.26 (n=32)	84.46 (n=1)	55.40 ±13.71 (n=43)
TIMP-1 (ng/mL)	492±67 (n=31)	1686±422** (n=4)	962 ±90*** (n=46)
IL6 (pg/mL)	28.60±6.77 (n=32)	51.79±33.32 (n=15)	88.83±19.14***# (n=55)
IL8 (pg/mL)	27.93±11.25 (n=32)	53.79±36.82 (n=15)	79.28±19.90***# (n=56)
IL17A (pg/mL)	0.85±0.29 (n=32)	1.01±0.41 (n=15)	1.31±0.40 (n=56)
MIP1b (pg/mL)	13.12±2.00 (n=31)	8.33±1.80 (n=15)	12.82±1.48 (n=55)
PDGF- AA (pg/mL)	9.24±1.53 (n=32)	10.98±3.99 (n=15)	13.19±2.28 (n=55)
RANTES (pg/mL)	44.56±8.48 (n=30)	31.69±13.81 (n=14)	50.87±8.18 (n=55)

**Tabla 16. Niveles de metabolitos en LPP (estadios I-II y III- IV) y en LPC.** Los datos están expresados como la media ± EEM (error estándar de la media). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001: cualquier grupo vs LPC. #p<0.05: estadios III-IV vs Estadios I-II.

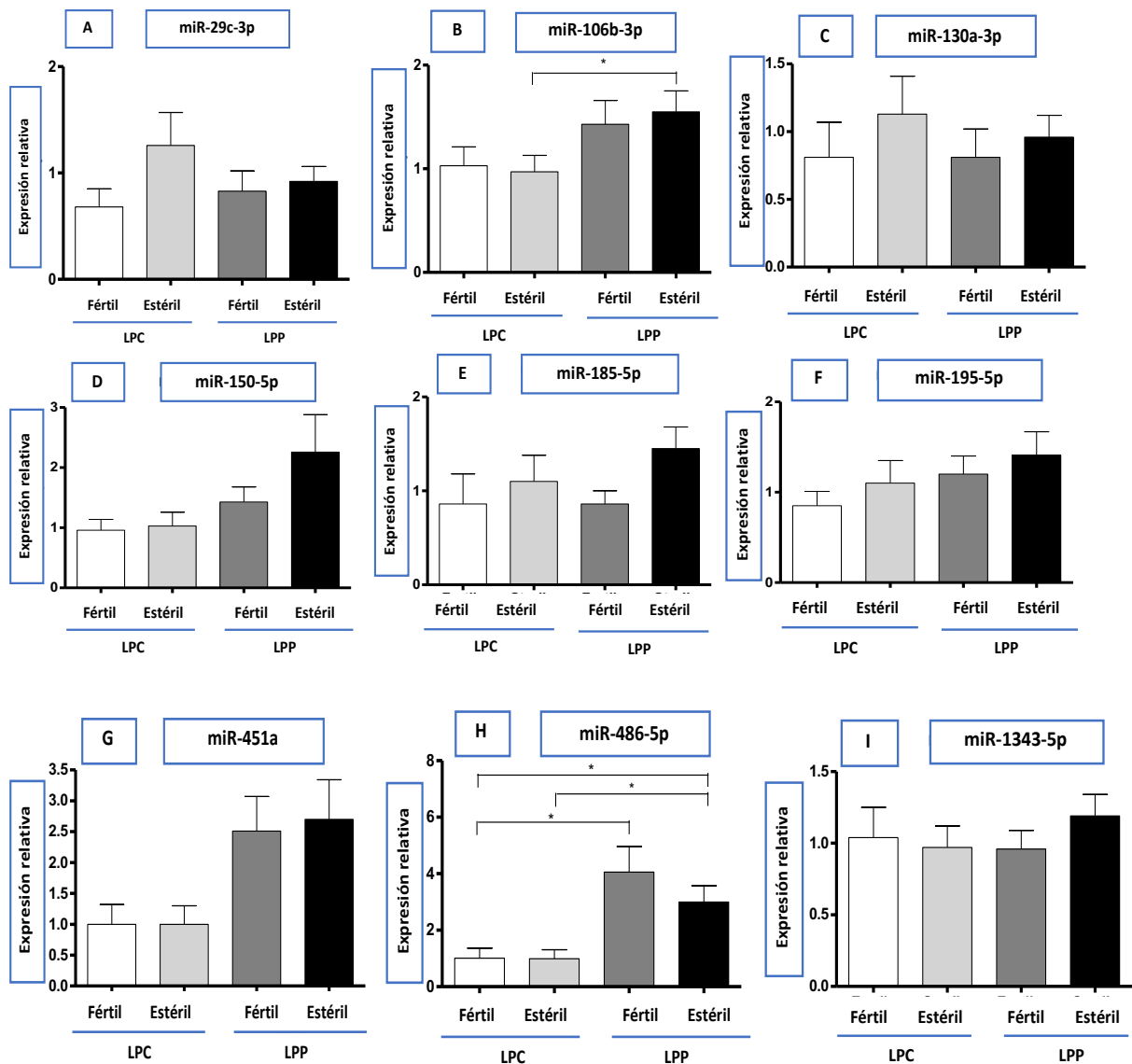


Además, como hemos observado IL6 e IL-8 poseían niveles más elevados en pacientes que en controles (**Figura 31**) ocurre de manera sinérgica en este caso que ambas interleuquinas presentan niveles más elevados en estados avanzados de la patología.

I) ANÁLISIS DE LOS miRNAs SEGÚN EL ESTATUS DE FERTILIDAD.

En este caso hemos establecido una relación entre todos los parámetros que hemos ido analizando en el líquido peritoneal con el estatus de esterilidad.

Nos hemos propuesto evaluar la influencia de los miRNAs del líquido peritoneal sobre el estatus de fertilidad de las pacientes, encontrando que los miR-106b-3p y el miR-486-5p (**Figura 32**) estaban significativamente elevados en el líquido peritoneal de pacientes estériles si las comparáramos con el líquido peritoneal de controles estériles. Es decir, era la condición de ser paciente o sano la que nos resultaba la causa del nivel elevado de estos dos miRNAs.



**Figura 32. Niveles de miRNAs en líquido peritoneal de pacientes y controles de acuerdo con el estatus de fertilidad.** Los datos representados son la media  $\pm$  desviación típica (SEM). La expresión de los miRNAs es en base a las veces de cambio (fold change) relativas a mujeres sin endometriosis (LPC= 1) \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  entre grupos.

También se observó que en caso del miR-486-5p (**Figura 32H**) los niveles eran significativamente más elevados en el caso del líquido peritoneal de las pacientes fértiles comparado con las mujeres controles fértiles. Por lo que refuerza la hipótesis de que el aumento de dicho miRNA vaya asociado a la condición de padecer la enfermedad.

En cambio, algunos miRNAs evaluados como los miRNAs miR-106b-3p, -150-5p, -451a o -486-5p sus niveles no diferían de los grupos control por lo que al estatus de fertilidad se referían. No obstante, podemos observar que los miRNAs miR-185-5p y miR-195-5p (**Figura 32**) presentan una tendencia a estar sobre-expresados en el líquido peritoneal

tanto de pacientes como controles estériles si los comparamos con los fértiles, si en es cierto que en este caso sólo podemos hablar de tendencias ya que no son datos con significación estadística. Es decir, el miR-185-5p y miR-195-5p podían estar más vinculados con el hecho de ser estériles que con la condición patológica.

De un modo parecido podemos observar que el miR-150-5p tiene una tendencia a estar sobre expresado en pacientes estériles.

#### 4.8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES PROTEICOS SEGÚN EL ESTATUS DE FERTILIDAD.

Igual que en el caso de la vinculación entre los miRNAs y el estatus de fertilidad de las pacientes resultaba de interés correlacionarlo, también resulta de especial interés vincular el estado proinflamatorio y angiogénico del peritoneo con la condición de fertilidad de las pacientes con endometriosis. Por dicho motivo se ha evaluado la influencia de los metabolitos del estudio con el estatus de fertilidad.

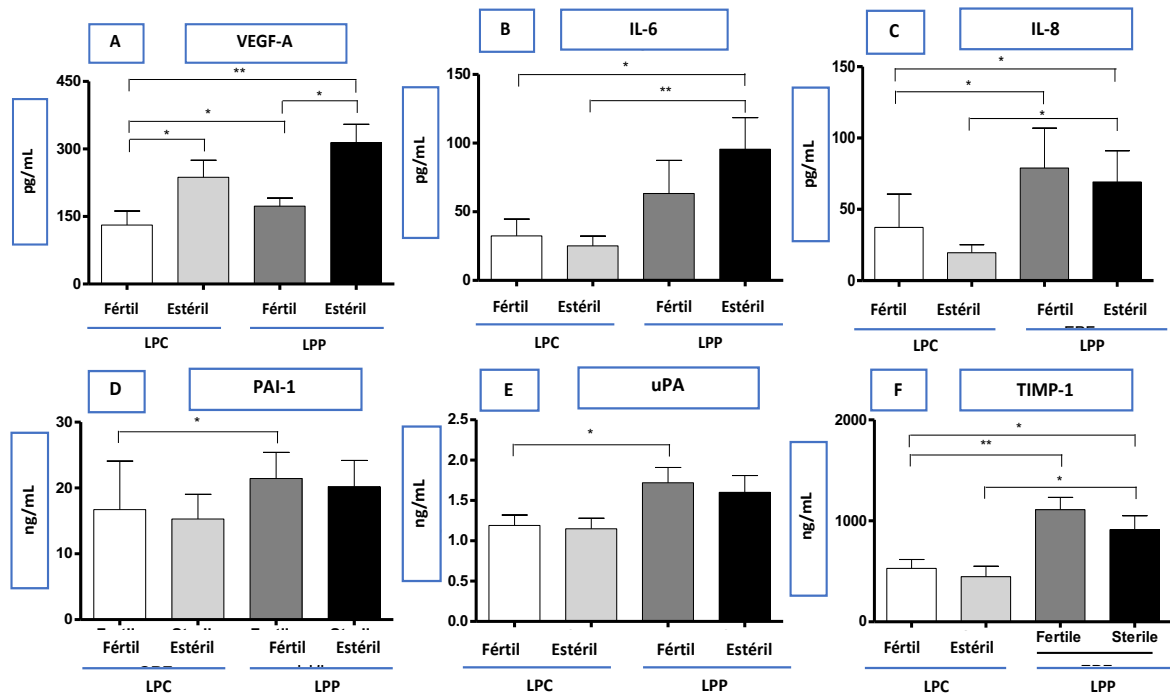
De dichas correlaciones hemos obtenido que los niveles de VEGF-A, IL-8 y TIMP-1 se encontraban incrementados en el líquido peritoneal de ambos grupos de pacientes (fértiles y estériles) comparándolos con los niveles de los mismos de las mujeres controles (**Figura 33A-B-F**). Por lo tanto, podemos vincular que estos metabolitos angiogénicos y pro-inflamatorios están vinculados al condicionante patológico.

Además, se ha visto que los niveles de VEGF-A (**Figura 33A**) también eran significativamente más elevados en los controles estériles si lo comparáramos con los controles fértiles.

Si nos centramos en comparar a las mujeres del estudio centrándonos en la condición de ser estériles o fértiles sin tener en cuenta el estado patológico o no de las mismas, IL-6, IL-8, y TIMP-1 (**Figura 33B-C-F**). mostraron niveles significativamente más elevados en las pacientes que en los controles.

Como dato destacable, todo y no poseer significación estadística se observó una sobreexpresión de PAI-1 el líquido peritoneal de las pacientes independientemente de

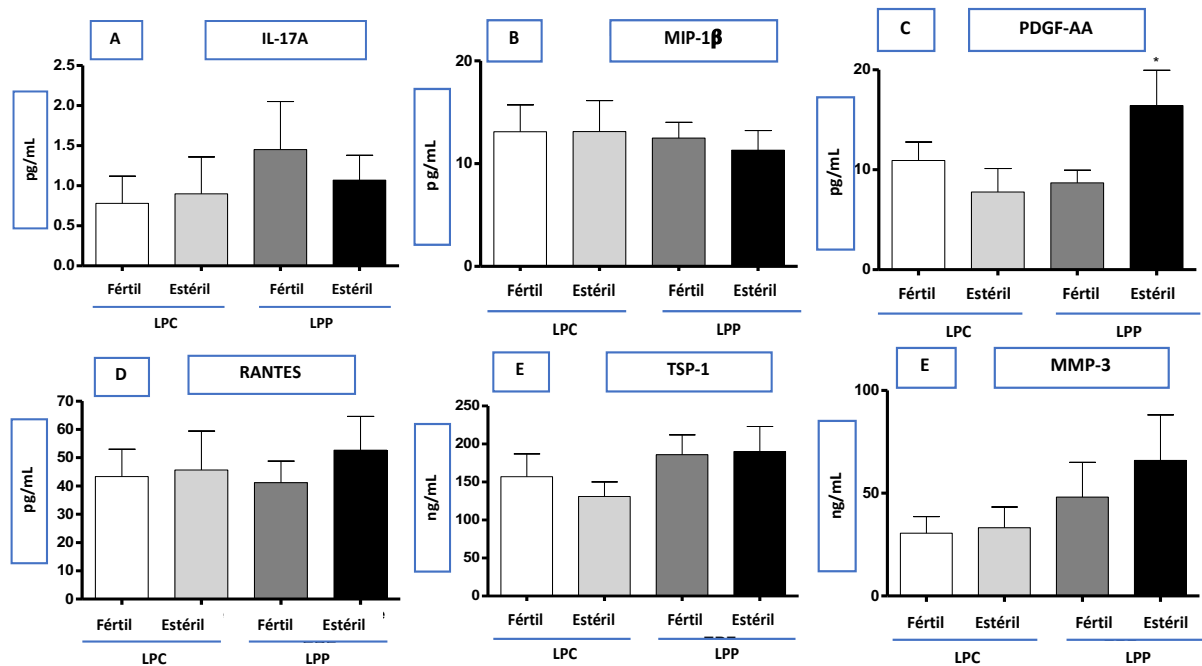
su estatus de fertilidad. PAI-1 presentaba diferencias significativas sólo entre el grupo fértil entre controles y pacientes.



**Figura 33. Niveles factores angiogénicos y proteolíticos en líquido peritoneal de pacientes y controles de acuerdo con el estatus de fertilidad.** Los datos representados son la media ± desviación típica (SEM). La expresión de los miRNAs es en base a las veces de cambio (fold change) relativas a mujeres sin endometriosis (LPC= 1) \*P< 0.05; \*\* P < 0.01 entre grupos.

Otro metabolito que resulto significativamente expresado fue el PDGF-AA (**Figura 34C**). en este caso se observó que presentaba niveles más elevados en el grupo de pacientes estériles.

Por último, podemos hablar también de una tendencia que se observa en los valores de MMP-3, que sin ser estadísticamente significativos observamos los niveles más altos en las pacientes estériles (**Figura 34E**).



**Figura 34. Niveles factores angiogénicos y proteolíticos en líquido peritoneal de pacientes y controles de acuerdo con el estatus de fertilidad.** Los datos representados son la media  $\pm$  desviación típica (SEM). La expresión de los miRNAs es en base a las veces de cambio (fold change) relativas a mujeres sin endometriosis (LPC = 1) \*P < 0.05;

#### I) CORRELACIONES ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS EVALUADOS.

No se han observado correlaciones significativas entre la edad de las mujeres y ningún parámetro de los estudiados (valores de miRNA y metabolitos) tanto en pacientes con endometriosis como en controles.

Las mayores diferencias entre el líquido peritoneal de pacientes y controles fueron observadas en los niveles de los miR-451a y miR-486-5p; además, estos miRNAs se correlacionaban significativamente con RANTES (CPF:  $r = 0,688$ ,  $P < 0.001$  y  $r = 0,581$ ,  $P = 0.001$ ; EPF:  $r = 0,281$ ,  $P = 0,019$  y  $r = 0,282$ ,  $P = 0.022$  respectivamente).

Sin embargo, los niveles de los miRNA-451a y el miR-486-5p sólo se correlacionaban significativamente con MMP-3 en el caso del líquido peritoneal de pacientes ( $r = 0.440$ ,  $P = 0.009$  y  $r = 0.550$ ,  $P = 0.001$ , respectivamente).

Finalmente, los niveles del miR-486-5p se correlacionaban significativamente con uPA en el líquido peritoneal de pacientes pero no en controles (  $r= 0.374$ ,  $P=0,15$  y  $r= -0.034$ ,  $P= 0.874$ ).

Cabe destacar, que, aunque sin una significación estadística el miR-150-5p mostraba una importante sobre expresión en el líquido peritoneal de pacientes en comparación con los niveles del mismo en los controles. Además, como ocurrió con el miR-451a y el miR-486-5p, los niveles del miR-150-5p se correlacionaban significativamente con RANTES tanto en pacientes como en controles (CPF:  $r= 0.354$ ,  $P=0.004$  y  $r= 0.550$ ,  $P= 0.001$ ; EPD:  $r= 0.440$ ,  $P= 0.009$  y  $r= 0.550$ ,  $P = 0.001$ ).



# 5.DISCUSIÓN



La endometriosis es una patología que se caracteriza en cuanto a síntomas por dolor y esterilidad, que llevan asociados una importante reducción de la calidad de vida que presentan dichas pacientes [35,49,192].

Dicha patología lleva asociados importantes costos tanto directos como indirectos a los distintos sistemas de salud [189].

Como ya se ha explicado en los diferentes apartados, sabemos que es una enfermedad multifactorial, con una regulación epigenética todavía hoy en día por terminar de discernir, y pese a que en los últimos años han aumentado notablemente tanto los recursos destinados al estudio de la endometriosis como a la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico precoz, todavía hoy continúan habiendo espacios en blanco en el conocimiento de esta patología.

Si bien es cierto que, actualmente todavía no se ha encontrado ningún método ni combinación de varios que permitan la detección precoz en estadios avanzados de la enfermedad, si que se han postulado como mejores candidatos para dicho objetivo los biomarcadores.

En este estudio hemos analizado una serie de biomarcadores, concretamente los miRNAs del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, ya que el líquido peritoneal supondría un biofluido mínimamente invasivo, que podría utilizarse como biomarcador de enfermedad.

El estudio comenzó con la realización de microarrays de 12 muestras, 6 de controles y 6 de pacientes que, además, se parearon por fase del ciclo. Estas muestras como ya hemos comentado fueron las más representativas de la cohorte a estudiar, así como aquellas que cumplían los mejores parámetros de calidad. El motivo de realización de dicha prueba a un número tan corto de muestras era por razones económicas. Dichos análisis resultaban muy costosos y por ello nos vimos limitados a realizarlo en estas doce muestras.

Analizando el perfil de expresión de miRNAs en el líquido peritoneal de las pacientes comparándolo con los controles, se encontraron 126 miRNAs diferentemente

expresados y de manera significativa. Concretamente 78 de estos miRNAs presentaban una sobreexpresión y 48 una regulación a la baja entre pacientes y controles.

De estos 126 miRNAs se seleccionaron, después de la realización de un estudio *“in silico”*, aquellos miRNAs que o bien de manera validada o predicha tenían algún mRNA diana relacionado con la angiogénesis, proteólisis o la inflamación, procesos muy característicos de la patología. El estudio *in silico* es de gran importancia puesto que nos permite centrar nuestro estudio posterior en aquellos miRNAs que realmente presenten niveles de expresión diferenciada entre pacientes y controles.

En este estudio se utilizaron para su posterior validación por qRT-PCR 3 miRNAs regulados al alza (miR-106b-3p, miR-451a y miR-486-5p) en el líquido peritoneal de pacientes y dos miRNAs regulados a la baja (miR-29c-3p y miR-1343-5p). El interés de evaluar las niveles de dichos miRNAs radicará en su importancia en la patología ya que todos ellos tienen que ver con aspectos importantes como el potencial pseudometastático de las células endometriales, nos darán información del estado inflamatorio y pro-angiogénico del ambiente peritoneal...

También se validaron por qRT-PCR una cohorte de miRNAs que, aunque no se apreciaban diferencias significativas en los datos aportados por los arrays, debido a estudios previos de nuestro grupo conocíamos su implicación en la patología, principalmente relacionados con aspectos angiogénicos e inflamatorios. Estos miRNAs fueron el miR-130-3p, miR-150-5p, miR-185-5p y el miR-195-5p [125,128,235].

En este estudio se ha descrito por primera vez el patrón de miRNAs que contiene el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, así como su relación con los principales factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios. La descripción de dicho patrón supone un elemento esencial en la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad. El conocimiento y descripción del perfil de miRNAs en el LP nos puede llevar a poderlas utilizar como potencial herramienta diagnóstica.

El análisis del líquido peritoneal demostró un aumento significativo de miR-106b-3p, miR-486-5p, miR-451a, TIMP-1, IL-6, IL-8 y uPA en el líquido peritoneal de las pacientes comparado con el de las controles.

Los niveles del miR-150-5p también se encontraban incrementados a pesar de no mostrar diferencias significativas en términos estadísticos. Se ha descrito que el miR-150-5p se encuentra localizado en el cromosoma 19q13 y actuaría como un oncomiR primario en una gran variedad de tipos de cáncer[236–238] como es el caso de las leucemias o el cáncer colorrectal [239–243]. Por lo que una expresión alterada de dicho miRNA podría estar relacionada con el desarrollo de diferentes cánceres, y en nuestro caso, se podría correlacionar con el comportamiento pseudometastático de las células endometriales ectópicas. Se ha descrito que una diana de miR-150-5p es el gen PDCD4 que a su vez es un supresor directo de NK-kB (p65) que forman parte de un grupo de proteínas con una amplia variedad de funciones a nivel celular relacionadas con el crecimiento y supervivencia, así como responsables de desencadenar distintas respuestas inmunitarias e inflamatorias. Paralelamente, PDCD4 es un supresor de la metalopeptidasa-9 (MMP-9), al presentar niveles más bajos de PDCD4 en los tejidos neoplásicos de cérvix de dicha proteína encontraríamos aumentados los niveles de MMP-9, lo que estaría facilitando la migración celular en el cáncer, así como la degradación de colágeno en la matriz celular. Por lo tanto, miR-150-5p jugaría un papel determinante en la migración e invasión de las células endometriales ectópicas[242,243]. La función de del miR-150-5p ha sido descrita principalmente en estudios de cáncer de cérvix, que postulaban a este micro como un regulador importante en el potencial invasivo y metastático de dichas células. Zhan et al [243] observaron que los niveles de miR-150-5p estaban significativamente aumentados en las pacientes con cáncer de cérvix si lo comparáramos con los niveles que presentaban los tejidos no neoplásicos de las controles. Así mismo para comprobar dicho efecto midieron la expresión de la proteína PDCD4 (diana del miR-150-5p) que se veía disminuida en los tejidos de las pacientes con cáncer de cérvix comparada con los niveles que dicha proteína presentaba en las controles.

Con respecto al miR-451a, el equipo de Graham ha publicado dos estudios que ponen de manifiesto que los niveles aumentados de dicho miRNA en endometriomas ováricos se correlacionan siempre con el tamaño de la lesión y con sus niveles séricos [244–246]

Según Koninckx, siempre que el líquido peritoneal se componga principalmente de componentes sanguíneos [247] y encontremos las proteínas reguladas al alza en el suero también se encontraran reguladas al alza en el líquido peritoneal, por lo que nuestros resultados están en consonancia con los de Graham, y esto nos indica que el miR-451a [248]

Además, el miR-451a se ha caracterizado como el miRNA más abundante en plasma y el miRNA principal dentro de los eritrocitos [249,250]. De acuerdo con la teoría de la menstruación retrógrada [20] los fragmentos de sangre y endometrio migran durante la menstruación y presentan deficiencias en el proceso de eliminación una vez dentro del microambiente peritoneal en pacientes con endometriosis, lo que conlleva que permanezcan en la cavidad peritoneal y proliferen, podría ser una explicación del aumento de la cantidad de dicho miRNA específico de eritrocitos en el líquido peritoneal de las pacientes. Por lo cual se ha correlacionado la presencia de miR-451a con funciones fisiológicas muy importantes en la progresión de la patología como la proliferación, diferenciación, migración e invasión celular [236,244,245] . Todos estos procesos fisiológicos tienen como resultado asegurar la implantación, progresión y supervivencia de los implantes endometriósicos en la cavidad peritoneal. También se ha observado que el miR-451a se encontraba elevado en el suero de mujeres con endometriosis, por lo que diversos estudios postularon que si dicho miRNA era responsable de procesos tan claves para la progresión de la enfermedad como la proliferación y supervivencia celular el miR-451a podría desempeñar un rol importante en el tratamiento de la endometriosis [235,236,248].

Además de los hallazgos del miR451a aumentado en líquido peritoneal y suero otros autores han descrito la presencia de dicho miRNA en tejido de lesiones endometriósicas[244]. Así mismo se ha caracterizado que el miR-451a se secreta en forma de *cluster* en los tejidos unido al miR-144-3p y por medio de estudios *in silico* se han propuesto como dianas de ambos micros el inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) [236] y 14-3-3 proteína zeta/delta (YWHAZ) que regula procesos de transducción de señales celulares, apoptosis y supervivencia celular en una gran variedad de tipos distintos de cáncer así como en diferentes en patologías neurodegenerativas [251] .

El segundo miRNA más abundante en plasma sanguíneo es el miR-486-5p [249], similar a nuestros hallazgos en el líquido peritoneal de las pacientes. En el 2013, Rekker y colaboradores reportaron que este miRNA no modificaba sus niveles a lo largo de las distintas etapas del ciclo menstrual en el plasma de las mujeres sanas. De manera similar, no hemos encontrado diferencias en los niveles de miR-486-5p en el líquido peritoneal de los controles a lo largo del ciclo menstrual [249].

Sin embargo, nuestros resultados indican que el miR-486-5p no sólo se regula al alza en el líquido peritoneal de las pacientes en las tres fases del ciclo menstrual en comparación con los niveles del mismo miRNA en el líquido peritoneal de los controles, sino que también presenta diferentes niveles en cada fase menstrual.

Además, el miR-486-5p se ha definido como un miRNA exosomal con un papel crucial en la comunicación intercelular en el cáncer colorrectal [252], que combinado con otros miRNAs podría utilizarse como biomarcador de enfermedad. Teniendo en cuenta estos estudios, nuestros resultados sugieren un papel interesante para el miR-486-5p como un comunicador intercelular en la endometriosis que debería ser estudiado más profundamente en futuros estudios.

Respecto al miR-486-5p se ha descrito en diferentes tipos de cáncer su función como supresor de tumores, y mediante análisis bioinformáticos se ha predicho como diana Dock-1, relacionado con procesos fagocitosis, apoptosis, facilita la invasión celular, metástasis... [253] También se ha utilizado a miR-486-5p como marcador tumoral ya que ejerce un papel de anti-oncogen en varios tipos de tumores. Su función radica en que miR-486-5p actúa reprimiendo a PIM-1 (gen que codifica para la serina/treonina quinasa) y PIM-1 es un supprime la proliferación celular [254].

En nuestro estudio hemos visto como el miR-106b-3p estaba sobreexpresado en el líquido peritoneal de las pacientes. También se ha visto que el miR-106-3p está desregulado en algunos tipos de cáncer como el incremento de este en el carcinoma de laringe [255], cáncer endometrial [256], cáncer de vejiga [257], carcinoma

hepatocelular[258], y carcinoma renal [259]. Se conoce que una de las principales funciones del miR-106b-3p es promover la proliferación celular [260]. Esta función en otros tipos de cáncer podría explicar el comportamiento pseudometastático de la endometriosis.

En nuestro estudio, a excepción de únicamente el miR-1343-5p, los otros 8 miRNAs evaluados y estudiados presentaron niveles aumentados en el líquido peritoneal de las pacientes en la fase menstrual en comparación con las otras fases del ciclo menstrual. Se observaron hallazgos similares por lo que se refiere a las proteínas VEGF-A, IL-8, MIP1b, uPA, PAI-1 y MMP-3. Estos hallazgos están en concordancia con la teoría de la menstruación retrógrada propuesta por Sampson[20] ya que los fragmentos endometriales migrados a la cavidad peritoneal requieren una mayor capacidad de implantación y vascularización.

Con respecto a las diferentes etapas de la enfermedad revisadas por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, la mayoría de los miRNAs (miR-106b-3p, miR-451a y miR-486-5p) y las proteínas (VEGF-A, uPA, PAI-1, IL-6, IL-8, IL17A, MIP1b, PDGF-AA y RANTES) presentaron niveles más altos cuanto más avanzada estaba la enfermedad, estos hallazgos sugieren que el líquido peritoneal podría ser una fuente potencial de biomarcadores [261] .

Por último, y teniendo en cuenta el factor fertilidad, mientras que la mejora de los niveles miR-106b-3p y miR-451a, parecía relacionarse con la endometriosis, el miR-185-5p tendió a estar regulado al alza en ambos grupos estériles (tanto en las pacientes como en los controles) lo que sugiere su papel potencial de la condición de esterilidad relacionada con la endometriosis. Para afirmar con rotundidad esta observación se requerirían validaciones adicionales.

Tenemos que añadir que encontramos niveles de VEGF-A significativamente más altos en ambos grupos estériles (pacientes y controles) en comparación con sus correspondientes grupos fértiles. Además, el líquido peritoneal de pacientes fértiles mostraba niveles significativamente más altos de VEGF-A que el de los controles fértiles.

Estos datos sugieren un nuevo papel de VEGF-A en el líquido peritoneal, ya no sólo en la patogénesis de la endometriosis sino también en el posible resultado del embarazo.

Además, la fase de validación puso de manifiesto la confirmación de un aumento significativo de miR-106b-3p, miR-451a, y miR-486-5p en el líquido peritoneal de las pacientes en comparación con el de los controles independientemente del estado de fertilidad. Curiosamente estos miRNAs presentaron sus niveles más altos en las etapas más avanzadas de la enfermedad, así como en la fase menstrual en comparación con otras fases del ciclo menstrual. Además, los niveles de VEGF-A, aunque significativamente más altos en el líquido peritoneal de las pacientes y que además eran mujeres estériles, se encontraban regulados significativamente al alza en ambos grupos estériles (pacientes y controles), lo que sugiere su papel como posible biomarcador para el resultado de la fertilidad [262].

En resumen, debido al papel de los miRNAs como moléculas de comunicación intercelular, estos hallazgos llevados a cabo por nuestro grupo pueden ser útiles para comprender mejor los mecanismos peritoneales que permiten la implantación y supervivencia de las lesiones endometriósicas, aunque se requerirán más experimentos adicionales con el fin de validar y ampliar estas hipótesis.

Esta tesis doctoral está basada en el artículo publicado en la revista *Fertility and Sterility* en abril del 2018 titulado *"Micro-RNA profile and proteins in peritoneal fluid from women with endometriosis: their relationship with sterility"* que cuenta con un factor de impacto de 7,49. Este estudio se realizó entre los años 2015 y 2018 suponiendo la utilización de una técnica revolucionaria y vanguardista como en su momento fueron los arrays de expresión. El grupo de la Dra. Amparo Estellés con la Dra. Braza-Boils como responsable de dicho estudio dedicó un esfuerzo económico y temporal para la realización de dichas técnicas. En su momento los resultados obtenidos resultaron punteros en el campo de la endometriosis teniendo un gran impacto y aportando importantes hallazgos a la etiopatogenia de la patología. Era la primera vez que se describía el perfil de miRNAs en líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis. Por ello el estudio, con sus resultados pronto fue publicado en la prestigiosa revista

Fertility and Sterility (abril 2018). Dicho trabajo también fue presentado en el congreso de la SEUD del 2018 celebrado en Barcelona en una comunicación oral titulada “Role of micrornas, angiogenic and fibrinolytic factors and cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis and their relation to sterility”. Una vez terminados estos trabajos y formalizados los resultados de los mismos, por motivos laborales me vi obligado a dejar el campo de la investigación biomédica y a comenzar en el de la docencia, al que me dedico actualmente, aunque siempre vinculado a la biología molecular y ciencias biomédicas.





## 6. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

El estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral ha demostrado:

1. El líquido peritoneal de pacientes con endometriosis presentó un perfil de miRNAs diferente al observado el biofluido de mujeres control. Concretamente se identificaron 126 miRNAs diferentemente expresados; 78 de ellos presentaron niveles elevados en líquido peritoneal de pacientes mientras que 48 miRNAs se encontraron infrarrepresentados en las pacientes con endometriosis.
2. La validación de los resultados obtenidos mediante arrays demostró que los miRNAs 106b-3p, miR-451a y miR-486-5p se encontraban sobre-expresados en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis respecto de las mujeres control independientemente de la fase del ciclo menstrual en la que se encontraban.
3. Cuando se compararon los perfiles de miRNAs en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis con los observados en mujeres control atendiendo a la fase del ciclo menstrual en la que se encontraban se observó que la fase del ciclo donde mayores diferencias se observaban era en la fase menstrual. Siendo los miRNAs miR-106b-3p, -130a-3p, 150-5p, -451a, -29c-3p, -185-5p, -195-5p y -486-5p lo que mostraron un aumento significativo en pacientes en fase menstrual.
4. Cuando se evaluó el perfil de miRNAs presente en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis valorando su estado de fertilidad observamos que existían niveles aumentados de los miR-106b-3p y miR-486-5p en el líquido peritoneal de pacientes estériles en comparación con controles estériles. Además, el miR-486-5p
5. Que los niveles de IL-6, IL-8, uPA y TMP-1 eran significativamente más elevados en el líquido peritoneal de las pacientes que en el de las controles. Este

incremento se correlaciona con el ambiente pro-inflamatorio que se observa en las pacientes.

6. El estado inflamatorio y angiogénico del ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis evaluado mediante la cuantificación de los niveles de las proteínas VEGF-A, IL-8, IL-6, IL17A, MIP1b, PDGF-AA, RANTES, TSP-1, uPA, PAI-1, MMP-3, y TIMP-1, demostró que el líquido peritoneal de pacientes presentaba niveles incrementados de VEGF-A, IL-8 y TIMP-1 ;y, que este incremento era independiente del estado de fertilidad de las mujeres incluidas en el estudio.





## 7. BIBLIOGRAFIA





## 7.BIBLIOGRAFIA

- [1] Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, et al. Endometriosis. *Endocr Rev* 2019;40:1048–79. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00242>.
- [2] Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98:511–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>.
- [3] Huang H, Li C, Zarogoulidis P, Darwiche K, Machairiotis N, Yang L, et al. *bulun* 2010. 2013.
- [4] Fluegen G, Jankowiak F, Zacarias Foehrding L, Kroepil F, Knoefel WT, Topp SA. Intrahepatic endometriosis as differential diagnosis: Case report and literature review. *World J Gastroenterol* 2013;19:4818–22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i29.4818>.
- [5] Altmäe S, Esteban FJ, Stavreus-Evers A, Simón C, Giudice L, Lessey B a, et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of “omics” data: focus on human endometrium. *Hum Reprod Update* 2014;20:12–28. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt048>.
- [6] Bulun SE. Endometriosis. *New England Journal of Medicine* 2009;360:268–79. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804690>.
- [7] Giudice LC, Ph D. Endometriosis 2010.
- [8] Wallach EE, Editor A, Nisolle M, Donnez J. Modern trends Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. vol. 68. American Society for Reproductive Medicine; 1997.
- [9] Chapron C. Management of ovarian endometriomas. *Hum Reprod Update* 2002;8:591–7. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.6.591>.
- [10] Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* 2012;98:564–71. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1061>.
- [11] Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:177–200. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007>.

- [12] Kinkel K, Frei KA, Balleyguier C, Chapron C. Diagnosis of endometriosis with imaging: a review. *Eur Radiol* 2006;16:285–98. <https://doi.org/10.1007/s00330-005-2882-y>.
- [13] Clement PB. The Pathology of Endometriosis. *Adv Anat Pathol* 2007;14:241–60. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3180ca7d7b>.
- [14] Falcone T, Flyckt R. Clinical Management of Endometriosis. *Obstetrics & Gynecology* 2018;131:557–71. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002469>.
- [15] Stratton P, Winkel CA, Sinaii N, Merino MJ, Zimmer C, Nieman LK. Location, color, size, depth, and volume may predict endometriosis in lesions resected at surgery. *Fertil Steril* 2002;78:743–9. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03337-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03337-X).
- [16] Juan Gilabert- Estellés, Juan Gilabert-Aguilar. Nuevas perspectivas en la endometriosis: Tratamiento quirúrgico en las pacientes con esterilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2011;28:119–31.
- [17] Jacques Donnez, Céline Pirard, Mireille Smets, Pascale Jadoul, Jean Squifflet. Pre- and Post-Surgical Management of Endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:235–42. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41329>.
- [18] Ramon LA, Braza-Boils A, Gilabert-Estelles J, Gilabert J, Espana F, Chirivella M, et al. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Human Reproduction* 2011;26:1082–90. <https://doi.org/10.1093/humrep/der025>.
- [19] Signorile PG, Viceconte R, Baldi A. New Insights in Pathogenesis of Endometriosis. *Front Med (Lausanne)* 2022;9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.879015>.
- [20] Yovich JL, Rowlands PK, Lingham S, Sillender M, Srinivasan S. Pathogenesis of endometriosis: Look no further than John Sampson. *Reprod Biomed Online* 2020;40:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.10.007>.
- [21] Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and Gynecology* 1984;64:151–4.
- [22] LEYENDECKER G, KUNZ G, HERBERTZ M, BEIL D, HUPPERT P, MALL G, et al. Uterine Peristaltic Activity and the Development of Endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:338–55. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.036>.

- [23] Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Reproduction* 1992;7:876–82. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137753>.
- [24] Groothuis PG, Koks CAM, de Goeij AFPM, Dunselman GAJ, Arends JW, Evers JLH. Adhesion of human endometrial fragments to peritoneum in vitro. *Fertil Steril* 1999;71:1119–24. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00122-3).
- [25] Dechaud H, Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Degraffenreid LA, Schenken RS. Mesothelial cell-associated hyaluronic acid promotes adhesion of endometrial cells to mesothelium. *Fertil Steril* 2001;76:1012–8. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02839-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02839-4).
- [26] Koks CAM, Groothuis PG, Slaats P, Dunselman GAJ, de Goeij AFPM, Evers JLH. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. *Fertil Steril* 2000;73:604–12. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00566-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00566-X).
- [27] Taylor RN, Hummelshoj L, Stratton P, Vercellini P. Pain and endometriosis: Etiology, impact, and therapeutics. *Middle East Fertil Soc J* 2012;17:221–5. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2012.09.002>.
- [28] Rocha ALL, Reis FM, Taylor RN. Angiogenesis and Endometriosis. *Obstet Gynecol Int* 2013;2013:1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/859619>.
- [29] McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000;6:45–55. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.1.45>.
- [30] Bulun SE. review article 2010.
- [31] Jerman LF, Hey-Cunningham AJ. The Role of the Lymphatic System in Endometriosis: A Comprehensive Review of the Literature1. *Biol Reprod* 2015;92. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124313>.
- [32] Possover M. Laparoscopic Management of Endopelvic Etiologies of Pudendal Pain in 134 Consecutive Patients. *Journal of Urology* 2009;181:1732–6. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.11.096>.
- [33] Huang H, Li C, Zarogoulidis P, Darwiche K, Machairiotis N, Yang L, et al. Endometriosis of the lung: report of a case and literature review. *Eur J Med Res* 2013;18:13. <https://doi.org/10.1186/2047-783X-18-13>.

- [34] Arafah M, Rashid S, Akhtar M. Endometriosis: A Comprehensive Review. *Adv Anat Pathol* 2021;28:30–43. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000288>.
- [35] Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:261–75. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>.
- [36] Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98:511–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>.
- [37] Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 1966;94:780–90.
- [38] Zubrzycka A, Zubrzycki M, Janecka A, Zubrzycka M. New Horizons in the Etiopathogenesis and Non-Invasive Diagnosis of Endometriosis. *Curr Mol Med* 2015;15:697–713. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150921105218>.
- [39] Signorile PG, Baldi A. Endometriosis: New concepts in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:778–80. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.008>.
- [40] Czyzyk A, Podfigurna A, Szeliga A, Meczekalski B. Update on endometriosis pathogenesis. *Minerva Obstetrics and Gynecology* 2017;69. <https://doi.org/10.23736/S0026-4784.17.04048-5>.
- [41] Sasson IE, Taylor HS. *Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis*. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:106–15. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.014>.
- [42] Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update* 2015;dmv051. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051>.
- [43] Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, et al. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci* 2019;20:5615. <https://doi.org/10.3390/ijms20225615>.
- [44] Fujii S. Secondary m&#x00FC;llerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:219–25. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90255-P](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90255-P).
- [45] Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, et al. Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* (1979) 1965;147:1462–5. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>.

- [46] van Bakel H, Nislow C, Blencowe BJ, Hughes TR. Most “Dark Matter” Transcripts Are Associated With Known Genes. *PLoS Biol* 2010;8:e1000371. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000371>.
- [47] Tafrihi M, Hasheminasab E. MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. *MicroRNA* 2018;8:4–27. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180827111633>.
- [48] Piquer-Gil M, Domenech-Dauder S, Sepúlveda-Gómez M, Machí-Camacho C, Braza-Boïls A, Zorio E. Non Coding RNAs as Regulators of Wnt/ $\beta$ -Catenin and Hippo Pathways in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Biomedicines* 2022;10:2619. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102619>.
- [49] Marí-alexandre J, Barceló-molina M, Olcina-guillem M, García-oms J, Braza-boïls A, Gilabert-estellés J, et al. *World Journal of Obstetrics and Gynecology* © 2016 2016;5:28–39. <https://doi.org/10.5317/wjog.v5.i1.28>.
- [50] Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, Mcandrews MS, et al. miRNA Nomenclature : A View Incorporating Genetic Origins , Biosynthetic Pathways , and Sequence Variants. *Trends in Genetics* 2015;xx:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.002>.
- [51] Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007;447:799–816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>.
- [52] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
- [53] Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes* 2004;116:281–97.
- [54] An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>.
- [55] Nardone J, Lee DU, Ansel KM, Rao A. Bioinformatics for the “bench biologist”: how to find regulatory regions in genomic DNA. *Nat Immunol* 2004;5:768–74. <https://doi.org/10.1038/ni0804-768>.

- [56] Noonan JP, McCallion AS. Genomics of Long-Range Regulatory Elements. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010;11:1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141651>.
- [57] Christov CP, Gardiner TJ, Szüts D, Krude T. Functional Requirement of Noncoding Y RNAs for Human Chromosomal DNA Replication. *Mol Cell Biol* 2006;26:6993–7004. <https://doi.org/10.1128/MCB.01060-06>.
- [58] Carrington JC, Ambros V. Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science (1979)* 2003;301:336–8. <https://doi.org/10.1126/science.1085242>.
- [59] Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 2009;15:625–31. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap068>.
- [60] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 2008;132:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.024>.
- [61] Bartel DP. Review MicroRNAs : Target Recognition and Regulatory Functions 2009;215–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- [62] Ohlsson Teague EMC, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2009;16:142–65. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp034>.
- [63] 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 Endometrium1. *Biol Reprod* 2010;82:791–801. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081059>.
- [64] Ohlsson Teague EMC, van der Hoek KH, van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. *Molecular Endocrinology* 2009;23:265–75. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0387>.
- [65] Ramón L a, Braza-Boïls A, Gilabert J, Chirivella M, España F, Estellés A, et al. microRNAs related to angiogenesis are dysregulated in endometrioid endometrial cancer. *Hum Reprod* 2012;27:3036–45. <https://doi.org/10.1093/humrep/des292>.

- [66] Braza-boi A, Gilabert J, Mari J, Espan F, Estelle A, Gilabert-estelle J. MicroRNA expression profile in endometriosis : its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors 2014;29:978–88. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu019>.
- [67] Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 2009;15:625–31. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap068>.
- [68] Budhu A, Ji J, Wang XW. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol* 2010;3:37. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-37>.
- [69] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75:855–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4).
- [70] Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview, 2017, p. 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1).
- [71] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.
- [72] Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231–5. <https://doi.org/10.1038/nature03049>.
- [73] Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* (1979) 2004;303:95–8. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>.
- [74] Meijer H a, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans* 2014;42:1135–40. <https://doi.org/10.1042/BST20140142>.
- [75] Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:3193–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012464108>.



- [76] Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs – the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in Genetics* 2012;28:544–9. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.005>.
- [77] Stavast C, Erkeland S. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells* 2019;8:1465. <https://doi.org/10.3390/cells8111465>.
- [78] Patterson DG, Kania AK, Zuo Z, Scharer CD, Boss JM. Epigenetic gene regulation in plasma cells. *Immunol Rev* 2021;303:8–22. <https://doi.org/10.1111/imr.12975>.
- [79] Patterson DG, Roberts JT, King VM, Houserova D, Barnhill EC, Crucello A, et al. Human snoRNA-93 is processed into a microRNA-like RNA that promotes breast cancer cell invasion. *NPJ Breast Cancer* 2017;3:25. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0032-8>.
- [80] Mo D, Li X, Raabe CA, Cui D, Vollmar J-F, Rozhdestvensky TS, et al. A universal approach to investigate circRNA protein coding function. *Sci Rep* 2019;9:11684. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48224-y>.
- [81] Chan S-P, Slack FJ. And Now Introducing Mammalian Mirtrons. *Dev Cell* 2007;13:605–7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.010>.
- [82] Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 2011;93:1897–904. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.017>.
- [83] Salim U, Kumar A, Kulshreshtha R, Vivekanandan P. Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *WIREs RNA* 2022;13. <https://doi.org/10.1002/wrna.1680>.
- [84] Rorbach G, Unold O, Konopka BM. Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods. *Sci Rep* 2018;8:7560. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25578-3>.
- [85] Stavast C, Erkeland S. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells* 2019;8:1465. <https://doi.org/10.3390/cells8111465>.
- [86] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [87] Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning, 2016, p. 3–17. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1).

- [88] Zhang J, Eteleeb AM, Rozycki EB, Inkman MJ, Ly A, Scharf RE, et al. DANSR: A Tool for the Detection of Annotated and Novel Small RNAs. *Noncoding RNA* 2022;8:9. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010009>.
- [89] Hüttenhofer A, Brosius J, Bachellerie J-P. RNomics: identification and function of small, non-messenger RNAs. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:835–43. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00397-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00397-6).
- [90] Wajahat M, Bracken CP, Orang A. Emerging Functions for snoRNAs and snoRNA-Derived Fragments. *Int J Mol Sci* 2021;22:10193. <https://doi.org/10.3390/ijms221910193>.
- [91] Li W, Saraiya AA, Wang CC. Gene Regulation in *Giardia lamblia* Involves a Putative MicroRNA Derived from a Small Nucleolar RNA. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1338. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001338>.
- [92] Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, et al. A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Mol Cell* 2008;32:519–28. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.017>.
- [93] Abdelfattah AM, Park C, Choi MY. Update on non-canonical microRNAs. *Biomol Concepts* 2014;5:275–87. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0012>.
- [94] Hasler D, Meister G. From tRNA to miRNA: RNA-folding contributes to correct entry into noncoding RNA pathways. *FEBS Lett* 2016;590:2354–63. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12294>.
- [95] Reinsborough CW, Ipas H, Abell NS, Nottingham RM, Yao J, Devanathan SK, et al. BCDIN3D regulates tRNA<sup>His</sup> 3' fragment processing. *PLoS Genet* 2019;15:e1008273. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008273>.
- [96] Liu W, Niu Z, Li Q, Pang RTK, Chiu PCN, Yeung WS-B. MicroRNA and Embryo Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology* 2016;75:263–71. <https://doi.org/10.1111/aji.12470>.
- [97] Cole J, McGuffin P, Farmer AE. The classification of depression: are we still confused? *Br J Psychiatry* 2008;192:83–5. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.039826>.
- [98] Kozak M. Faulty old ideas about translational regulation paved the way for current confusion about how microRNAs function. *Gene* 2008;423:108–15. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.07.013>.

- [99] Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two Genetic Circuits Repress the *Caenorhabditis elegans* Heterochronic Gene *lin-28* after Translation Initiation. *Dev Biol* 2002;243:215–25. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0563>.
- [100] MARONEY PA, YU Y, NILSEN TW. MicroRNAs, mRNAs, and Translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006;71:531–5. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.043>.
- [101] Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1108–14. <https://doi.org/10.1038/nsmb1173>.
- [102] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15:331–41. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.05.006>.
- [103] Clancy JL, Nousch M, Humphreys DT, Westman BJ, Beilharz TH, Preiss T. Methods to Analyze MicroRNA-Mediated Control of mRNA Translation, 2007, p. 83–111. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)31006-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)31006-9).
- [104] Meister G. miRNAs Get an Early Start on Translational Silencing. *Cell* 2007;131:25–8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.021>.
- [105] Wakiyama M, Yokoyama S. MicroRNA-Mediated mRNA Deadenylation and Repression of Protein Synthesis in a Mammalian Cell-Free System, 2010, p. 85–97. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03103-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03103-8_6).
- [106] Tan GS, Garchow BG, Liu X, Yeung J, Morris JP, Cuellar TL, et al. Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Res* 2009;37:7533–45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp812>.
- [107] Lone SN, Bhat AA, Wani NA, Karedath T, Hashem S, Nisar S, et al. miRNAs as novel immunoregulators in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2022;124:3–14. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.04.013>.
- [108] Bagga S, Pasquinelli AE. Identification and Analysis of Micrnas. *Genet Eng (N Y)*, Boston: Kluwer Academic Publishers; n.d., p. 1–20. [https://doi.org/10.1007/0-387-25856-6\\_1](https://doi.org/10.1007/0-387-25856-6_1).
- [109] Wu Q, Yang Z, Shi Y, Fan D. MiRNAs in Human Cancers: The Diagnostic and Therapeutic Implications. *Curr Pharm Des* 2014;20:5336–47. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140128204914>.

- [110] BEHM-ANSMANT I, REHWINKEL J, IZAURRALDE E. MicroRNAs Silence Gene Expression by Repressing Protein Expression and/or by Promoting mRNA Decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006;71:523–30. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.013>.
- [111] SCHIER AF, GIRALDEZ AJ. MicroRNA Function and Mechanism: Insights from Zebra Fish. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006;71:195–203. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.055>.
- [112] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350–5. <https://doi.org/10.1038/nature02871>.
- [113] Tafrihi M, Hasheminasab E. MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. *MicroRNA* 2018;8:4–27. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180827111633>.
- [114] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [115] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (1979)* 2001;294:853–8. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>.
- [116] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (1979)* 2001;294:858–62. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>.
- [117] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res* 2004;14:1902–10. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>.
- [118] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D155–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- [119] Marí-Alexandre J, Barceló-Molina M, Belmonte-López E, García-Oms J, Estellés A, Braza-Boïls A, et al. Micro-RNA profile and proteins in peritoneal fluid from women with endometriosis: their relationship with sterility. *Fertil Steril* 2018;109:675–684.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.036>.

- [120] Marí-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boíls A, Sandoval J. miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis. *Int J Mol Sci* 2016;17:93. <https://doi.org/10.3390/ijms17010093>.
- [121] Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 1999;21:42–7. <https://doi.org/10.1038/4469>.
- [122] Zampetaki A, Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb Haemost* 2012;108:592–8. <https://doi.org/10.1160/TH12-02-0097>.
- [123] Urbanek M, Nawrocka A, Krzyzosiak W. Small RNA Detection by in Situ Hybridization Methods. *Int J Mol Sci* 2015;16:13259–86. <https://doi.org/10.3390/ijms160613259>.
- [124] Hagedorn PH, Persson R, Funder ED, Albæk N, Diemer SL, Hansen DJ, et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov Today* 2018;23:101–14. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.018>.
- [125] Marí-Alexandre J, García-Oms J, Barceló-Molina M, Gilabert-Aguilar J, Estellés A, Braza-Boíls A, et al. microRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thromb Res* 2015;135 Suppl:S38-40. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(15\)50439-8](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(15)50439-8).
- [126] J. Gilabert-Estelles, A. Braza-Boils, L. A. Ramon, E. Zorio, P. Medina, F. Espana, et al. Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Curr Med Chem* 2012;19:2406–13. <https://doi.org/10.2174/092986712800269362>.
- [127] Marí-Alexandre J, Barceló-Molina M, Sanz-Sánchez J, Molina P, Sancho J, Abellán Y, et al. Thickness and an Altered miRNA Expression in the Epicardial Adipose Tissue Is Associated With Coronary Heart Disease in Sudden Death Victims. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 2019;72:30–9. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.12.007>.
- [128] Braza-Boíls A, Marí-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Human Reproduction* 2014;29:978–88. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu019>.
- [129] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733–41. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.

- [130] de Menezes MR, Acioli MEA, da Trindade ACL, da Silva SP, de Lima RE, da Silva Teixeira VG, et al. Potential role of microRNAs as biomarkers in human glioblastoma: a mini systematic review from 2015 to 2020. *Mol Biol Rep* 2021;48:4647–58. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06423-9>.
- [131] Wittmann J, Jäck H-M. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2010;1806:200–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.002>.
- [132] Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, Ramón L a, Gilabert J, Marí-Alexandre J, Chirivella M, et al. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS One* 2013;8:e62370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062370>.
- [133] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Dis Model Mech* 2021;14. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>.
- [134] Braza-Boïls A, Mayr M. LDL-receptor-deficient mice lacking microRNA-143/145 have less atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2014;112:629–629. <https://doi.org/10.1160/TH14-09-0734>.
- [135] Peña-Bautista C, Tarazona-Sánchez A, Braza-Boïls A, Balaguer A, Ferré-González L, Cañada-Martínez AJ, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers in early Alzheimer disease expression. *Sci Rep* 2022;12:15589. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19862-6>.
- [136] Mayr B, Niebauer J, Breitenbach-Koller H. Circulating miRNAs as predictors for morbidity and mortality in coronary artery disease. *Mol Biol Rep* 2019;46:5661–5. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04963-9>.
- [137] Cortez MA, Welsh JW, Calin GA. Circulating MicroRNAs as Noninvasive Biomarkers in Breast Cancer, 2012, p. 151–61. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28160-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28160-0_13).
- [138] Garcia-Martin R, Wang G, Brandão BB, Zanotto TM, Shah S, Kumar Patel S, et al. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature* 2022;601:446–51. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04234-3>.

- [139] Yue B, Yang H, Wang J, Ru W, Wu J, Huang Y, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Prolif* 2020;53. <https://doi.org/10.1111/cpr.12857>.
- [140] Li B, Cao Y, Sun M, Feng H. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy. *The FASEB Journal* 2021;35. <https://doi.org/10.1096/fj.202100294RR>.
- [141] Cui H, Lv K, Yang N. HDL and microRNAs, 2022, p. 153–61. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-1592-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-19-1592-5_12).
- [142] Michell DL, Vickers KC. Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2016;1861:2069–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.011>.
- [143] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:5003–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>.
- [144] Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet* 2013;4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00173>.
- [145] Makarova J, Turchinovich A, Shkurnikov M, Tonevitsky A. Extracellular miRNAs and Cell–Cell Communication: Problems and Prospects. *Trends Biochem Sci* 2021;46:640–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.007>.
- [146] Mansoori B, Baradaran B, Nazari A, Gaballu FA, Cho WC-S, Mansoori B. MicroRNAs in the cancer cell-to-cell communication: An insight into biological vehicles. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022;153:113449. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113449>.
- [147] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:10513–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>.
- [148] Zorio E, Medina P, Rueda J, Millan J, Arnau M, Beneyto M, et al. Insights Into the Role of microRNAs in Cardiac Diseases: From Biological Signalling to Therapeutic

- Targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009;7:82–90. <https://doi.org/10.2174/187152509787047676>.
- [149] Mc Cormack BA, González-Cantó E, Agababyan C, Espinoza-Sánchez NA, Tomás-Pérez S, Lluca A, et al. miRNAs in the Era of Personalized Medicine: From Biomarkers to Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2021;22:8154. <https://doi.org/10.3390/ijms22158154>.
- [150] Kvaskoff M, Mahamat-Saleh Y, Farland L v, Shigeshi N, Terry KL, Harris HR, et al. Endometriosis and cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2021;27:393–420. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa045>.
- [151] Moga MA, Bălan A, Dimienescu OG, Burtea V, Dragomir RM, Anastasiu CV. Circulating miRNAs as Biomarkers for Endometriosis and Endometriosis-Related Ovarian Cancer—An Overview. *J Clin Med* 2019;8:735. <https://doi.org/10.3390/jcm8050735>.
- [152] Hutt S, Tailor A, Ellis P, Michael A, Butler-Manuel S, Chatterjee J. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta Oncol (Madr)* 2019;58:342–52. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886>.
- [153] Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2008;110:206–15. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.03.023>.
- [154] Hutt S, Tailor A, Ellis P, Michael A, Butler-Manuel S, Chatterjee J. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta Oncol (Madr)* 2019;58:342–52. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886>.
- [155] Devor E. microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. *Oncol Rep* 2011. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1372>.
- [156] Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNAs and cancer—new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:470–9. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.002>.
- [157] Fridrichova I, Zmetakova I. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. *Cells* 2019;8:1361. <https://doi.org/10.3390/cells8111361>.



- [158] Hutt S, Taylor A, Ellis P, Michael A, Butler-Manuel S, Chatterjee J. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta Oncol (Madr)* 2019;58:342–52. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886>.
- [159] Wang Q, Xu K, Tong Y, Dai X, Xu T, He D, et al. Novel miRNA markers for the diagnosis and prognosis of endometrial cancer. *J Cell Mol Med* 2020;24:4533–46. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15111>.
- [160] Jayaraman M, Radhakrishnan R, Mathews CA, Yan M, Husain S, Moxley KM, et al. Identification of novel diagnostic and prognostic miRNA signatures in endometrial cancer. *Genes Cancer* 2017;8:566–76. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.144>.
- [161] Lee J-W, Park Y-A, Choi J-J, Lee YY, Kim C-J, Choi C, et al. The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol* 2011;120:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.09.022>.
- [162] Yang L, Yang Z, Yao R, Li Y, Liu Z, Chen X, et al. miR-210 promotes progression of endometrial carcinoma by regulating the expression of NFIX. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11:5213–22.
- [163] Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, Inoue N, Machida H, Nakayama T, et al. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Transl Med* 2011;9:30. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-30>.
- [164] Zierau O, Helle J, Schadyew S, Morgenroth Y, Bentler M, Hennig A, et al. Role of miR-203 in estrogen receptor-mediated signaling in the rat uterus and endometrial carcinoma. *J Cell Biochem* 2018;119:5359–72. <https://doi.org/10.1002/jcb.26675>.
- [165] Pointreau Y, Ruffier Loubière A, Denis F, Barillot I. Cancer du col utérin. *Cancer/Radiothérapie* 2010;14:S147–53. [https://doi.org/10.1016/S1278-3218\(10\)70018-4](https://doi.org/10.1016/S1278-3218(10)70018-4).
- [166] Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2021;155:28–44. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13865>.
- [167] Khan SR, Rockall AG, Barwick TD. Molecular imaging in cervical cancer. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Official*

- Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society Of. 2016;60:77–92.
- [168] Laengsri V, Kerdpin U, Plabplueng C, Treeratanapiboon L, Nuchnoi P. Cervical Cancer Markers: Epigenetics and microRNAs. *Lab Med* 2018;49:97–111. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx080>.
- [169] Tang J, Pan H, Wang W, Qi C, Gu C, Shang A, et al. MiR-495-3p and miR-143-3p co-target CDK1 to inhibit the development of cervical cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2021;23:2323–34. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02687-6>.
- [170] Wang Y, Liang Y, Lu Q. MicroRNA epigenetic alterations: Predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet* 2008;74:307–15. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01075.x>.
- [171] Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci* 2010;101:241–9. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01385.x>.
- [172] Lee J-W, Choi CH, Choi J-J, Park Y-A, Kim S-J, Hwang SY, et al. Altered MicroRNA Expression in Cervical Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2008;14:2535–42. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1231>.
- [173] Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, et al. A MicroRNA Expression Signature for Cervical Cancer Prognosis. *Cancer Res* 2010;70:1441–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3289>.
- [174] Li M-Y, Hu X-X. Meta-analysis of microRNA expression profiling studies in human cervical cancer. *Medical Oncology* 2015;32:169. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0510-5>.
- [175] Ramón LA, Braza-Boïls A, Gilabert J, Chirivella M, España F, Estellés A, et al. microRNAs related to angiogenesis are dysregulated in endometrioid endometrial cancer. *Human Reproduction* 2012;27:3036–45. <https://doi.org/10.1093/humrep/des292>.
- [176] Deb B, Uddin A, Chakraborty S. miRNAs and ovarian cancer: An overview. *J Cell Physiol* 2018;233:3846–54. <https://doi.org/10.1002/jcp.26095>.

- [177] Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Taheri M. miRNA profile in ovarian cancer. *Exp Mol Pathol* 2020;113:104381. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104381>.
- [178] Závěský L, Jandáková E, Weinberger V, Minář L, Hanzíková V, Dušková D, et al. Ascites-Derived Extracellular microRNAs as Potential Biomarkers for Ovarian Cancer. *Reproductive Sciences* 2019;26:510–22. <https://doi.org/10.1177/1933719118776808>.
- [179] Iorio M v., Croce CM. *MicroRNA Profiling in Ovarian Cancer*, 2013, p. 187–97. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-547-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-547-7_14).
- [180] Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, et al. MicroRNA Expression Profiles in Serous Ovarian Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2008;14:2690–5. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1731>.
- [181] Corney DC, Nikitin AY. MicroRNA and ovarian cancer. *Histol Histopathol* 2008;23:1161–9. <https://doi.org/10.14670/HH-23.1161>.
- [182] Welponer H, Tsibulak I, Wieser V, Degasper C, Shivalingaiah G, Wenzel S, et al. The miR-34 family and its clinical significance in ovarian cancer. *J Cancer* 2020;11:1446–56. <https://doi.org/10.7150/jca.33831>.
- [183] Wang M, Zhang S. MiR-145 on the Proliferation of Ovarian Cancer Cells by Regulating the Expression of MMP-2/MMP-9. *Cell Mol Biol* 2022;67:141–8. <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.6.19>.
- [184] Maier IM, Maier AC. miRNAs and lncRNAs: Potential Non-Invasive Biomarkers for Endometriosis. *Biomedicines* 2021;9:1662. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111662>.
- [185] Bjorkman S, Taylor HS. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates†. *Biol Reprod* 2019;101:1167–78. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox014>.
- [186] Moga MA, Bălan A, Dimienescu OG, Burtea V, Dragomir RM, Anastasiu CV. Circulating miRNAs as Biomarkers for Endometriosis and Endometriosis-Related Ovarian Cancer—An Overview. *J Clin Med* 2019;8:735. <https://doi.org/10.3390/jcm8050735>.
- [187] Anastasiu CV, Moga MA, Elena Neculau A, Bălan A, Scârneciu I, Dragomir RM, et al. Biomarkers for the Noninvasive Diagnosis of Endometriosis: State of the Art

- and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2020;21:1750. <https://doi.org/10.3390/ijms21051750>.
- [188] Raja MHR, Farooqui N, Zuberi N, Ashraf M, Azhar A, Baig R, et al. Endometriosis, infertility and MicroRNA's: A review. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2021;50:102157. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2021.102157>.
- [189] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril* 2011;96:366-373.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.090>.
- [190] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Kennedy SH, Jenkinson C, Zondervan KT. Developing symptom-based predictive models of endometriosis as a clinical screening tool: results from a multicenter study. *Fertil Steril* 2012;98:692-701.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.022>.
- [191] Jia S -z., Yang Y, Lang J, Sun P, Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Human Reproduction* 2013;28:322–30. <https://doi.org/10.1093/humrep/des413>.
- [192] Burney RO, Giudice LC. Reprint of: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2019;112:e153–61. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.083>.
- [193] Laudanski P, Charkiewicz R, Kuzmicki M, Szamatowicz J, Charkiewicz A, Niklinski J. MicroRNAs expression profiling of eutopic proliferative endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013;11:78. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-78>.
- [194] Retis-Resendiz AM, González-García IN, León-Juárez M, Camacho-Arroyo I, Cerbón M, Vázquez-Martínez ER. The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium. *Clin Epigenetics* 2021;13:116. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01103-8>.
- [195] Critchley HOD, Maybin JA, Armstrong GM, Williams ARW. Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation. *Physiol Rev* 2020;100:1149–79. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2019>.
- [196] Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix

- metalloproteinase systems in endometriosis. *Human Reproduction* 2003;18:1516–22. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg300>.
- [197] Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Human Reproduction* 2007;22:2120–7. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem149>.
- [198] Cho S, Mutlu L, Grechukhina O, Taylor HS. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertil Steril* 2015;1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.02.013>.
- [199] Saare M, Rekker K, Laisk-Podar T, Sõritsa D, Roost AM, Simm J, et al. High-throughput sequencing approach uncovers the miRNome of peritoneal endometriotic lesions and adjacent healthy tissues. *PLoS One* 2014;9:e112630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112630>.
- [200] Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. *New England Journal of Medicine* 2020;382:1244–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1810764>.
- [201] May KE, Conduit-Hulbert S a, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010;16:651–74. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq009>.
- [202] Blackburn SC, Stanton MP. Anatomy and physiology of the peritoneum. *Semin Pediatr Surg* 2014;23:326–30. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2014.06.002>.
- [203] Oral E. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:385–98. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.5.385>.
- [204] Casslén B. Uterine fluid volume. Cyclic variations and possible extrauterine contributions. *J Reprod Med* 1986;31:506–10.
- [205] Stovall DW, Halme J. Endometriosis and associated pathology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1991;3:853–8.
- [206] Broi MG da, Ferriani RA, Navarro PA. Ethio-pathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. *JBRA Assist Reprod* 2019. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20190029>.

- [207] Vallvé-Juanico J, Houshdaran S, Giudice LC. The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2019;25:565–92. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz018>.
- [208] Zhou W-J, Yang H-L, Shao J, Mei J, Chang K-K, Zhu R, et al. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019;76:2111–32. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03056-x>.
- [209] Blumenthal RD, Samoszuk M, Taylor AP, Brown G, Alisauskas R, Goldenberg DM. Degranulating Eosinophils in Human Endometriosis. *Am J Pathol* 2000;156:1581–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65030-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65030-4).
- [210] Blumenthal RD, Samoszuk M, Taylor AP, Brown G, Alisauskas R, Goldenberg DM. Degranulating Eosinophils in Human Endometriosis. *Am J Pathol* 2000;156:1581–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65030-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65030-4).
- [211] Gruber TM, Mechsner S. Pathogenesis of Endometriosis: The Origin of Pain and Subfertility. *Cells* 2021;10:1381. <https://doi.org/10.3390/cells10061381>.
- [212] Jiang J, Jiang Z, Xue M. Serum and peritoneal fluid levels of interleukin-6 and interleukin-37 as biomarkers for endometriosis. *Gynecological Endocrinology* 2019;35:571–5. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1554034>.
- [213] Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation-The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology* 2017;77:e12622. <https://doi.org/10.1111/aji.12622>.
- [214] Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:385–98.
- [215] Bailey AP, Hill AS, Beste MT, Cook CD, Sarda V, Laufer MR, et al. Comparison of cytokines in the peritoneal fluid and conditioned medium of adolescents and adults with and without endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology* 2021;85. <https://doi.org/10.1111/aji.13347>.
- [216] D’Hooghe TM, Xiao L, Hill JA. Cytokine profiles in autologous peritoneal fluid and peripheral blood of women with deep and superficial endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:40–4. <https://doi.org/10.1007/s004040000126>.
- [217] Tao Y, Zhang Q, Huang W, Zhu H, Zhang D, Luo W. The Peritoneal Leptin, MCP-1 and TNF- $\alpha$  in the Pathogenesis of Endometriosis-Associated Infertility. *American*

- Journal of Reproductive Immunology 2011;65:403–6.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00920.x>.
- [218] Leiva MC, Hasty LA, Pfeifer S, Mastroianni L, Lyttle CR. Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:592–8. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90500-I](https://doi.org/10.1016/0002-9378(93)90500-I).
- [219] Bersinger NA, von Roten S, Wunder DM, Raio L, Dreher E, Mueller MD. PAPP-A and osteoprotegerin, together with interleukin-8 and RANTES, are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:103–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.12.010>.
- [220] Nirgianakis K, McKinnon B, Ma L, Imboden S, Bersinger N, Mueller MD. Peritoneal fluid biomarkers in patients with endometriosis: a cross-sectional study. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2021;42:113–22. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0064>.
- [221] Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers D v. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1545–9. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90433-J](https://doi.org/10.1016/0002-9378(93)90433-J).
- [222] Overton C, Fernandez-Shaw S, Hicks B, Barlow D, Starkey P. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. *Human Reproduction* 1996;11:380–6. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/11.2.380>.
- [223] Kauma S, Clark MR, White C, Halme J. Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with or without endometriosis. *Obstetrics and Gynecology* 1988;72:13–8.
- [224] Syrop CH, Halme J. Peritoneal fluid environment and infertility. *Fertil Steril* 1987;48:1–9. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59280-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59280-2).
- [225] Drake TS, Metz SA, Grunert GM, O'Brien WF. Peritoneal fluid volume in endometriosis. *Fertil Steril* 1980;34:280–1.
- [226] Chapron C, Marcellin L, Borghese B, Santulli P. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:666–82. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0245-z>.

- [227] Bouckaer M, Evers H, Doesburg H, Schellekens A, Rolland R. Steroids in the Peritoneal Fluid of Women during the Periovulatory Phase of the Menstrual Cycle 1986;62.
- [228] Shah JS, Soon PS, Marsh DJ. Comparison of methodologies to detect low levels of hemolysis in serum for accurate assessment of serum microRNAs. *PLoS One* 2016;11:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153200>.
- [229] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>.
- [230] Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnol* 2009;9:102. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-102>.
- [231] Kozomara A, Griffiths-jones S. miRBase : integrating microRNA annotation and deep-sequencing data 2011;39:152–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>.
- [232] Kozomara A, Griffiths-jones S. miRBase : annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data 2014;42:68–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>.
- [233] Tamminen J, Lambon Ralph M a, Lewis P a. The role of sleep spindles and slow-wave activity in integrating new information in semantic memory. *J Neurosci* 2013;33:15376–81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5093-12.2013>.
- [234] Cosin R, Gilabert-Estelles J, Ramon LA, Gomez-Lechon MJ, Gilabert J, Chirivella M, et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Human Reproduction* 2010;25:398–405. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep419>.
- [235] Cosar E, Mamillapalli R, Ersoy GS, Cho S, Seifer B, Taylor HS. Serum microRNAs as diagnostic markers of endometriosis: a comprehensive array-based analysis. *Fertil Steril* 2016;106:402–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.013>.
- [236] Graham A, Falcone T, Nothnick WB. The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival. *Hum Reprod* 2015;30:1–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev005>.



- [237] Nothnick WB, Graham A, Holbert J, Weiss MJ. miR-451 deficiency is associated with altered endometrial fibrinogen alpha chain expression and reduced endometriotic implant establishment in an experimental mouse model. *PLoS One* 2014;9:e100336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100336>.
- [238] Chen X, Xu X, Pan B, Zeng K, Xu M, Liu X, et al. miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. *Aging* 2018;10:3421–37. <https://doi.org/10.18632/aging.101656>.
- [239] Wang Y, Xu X, Maglic D, Dill MT, Mojumdar K, Ng PK-S, et al. Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Rep* 2018;25:1304-1317.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.001>.
- [240] Yang X, Zhao H, Yang J, Ma Y, Liu Z, Li C, et al. MiR-150-5p regulates melanoma proliferation, invasion and metastasis via SIX1-mediated Warburg Effect. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;515:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.111>.
- [241] Jia H, Wu D, Zhang Z, Li S. Regulatory effect of the MAFG-AS1/miR-150-5p/MYB axis on the proliferation and migration of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2020;58:33–44. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5150>.
- [242] Lu W, Zhang H, Niu Y, Wu Y, Sun W, Li H, et al. Long non-coding RNA linc00673 regulated non-small cell lung cancer proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transition by sponging miR-150-5p. *Mol Cancer* 2017;16:118. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0685-9>.
- [243] Zhang Z, Wang J, Li J, Wang X, Song W. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;97:511–7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.143>.
- [244] Nothnick WB, Falcone T, Joshi N, Fazleabas AT, Graham A. Serum miR-451a Levels Are Significantly Elevated in Women With Endometriosis and Recapitulated in Baboons (*Papio anubis*) With Experimentally-Induced Disease. *Reproductive Sciences* 2017;24:1195–202. <https://doi.org/10.1177/1933719116681519>.
- [245] Li M, Zhou Y, Taylor HS. miR-451a Inhibition Reduces Established Endometriosis Lesions in Mice. *Reproductive Sciences* 2019;26:1506–11. <https://doi.org/10.1177/1933719119862050>.

- [246] Nothnick WB, Swan K, Flyckt R, Falcone T, Graham A. Human endometriotic lesion expression of the miR-144-3p/miR-451a cluster, its correlation with markers of cell survival and origin of lesion content. *Sci Rep* 2019;9:8823. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45243-7>.
- [247] Koninckx PR, Fernandes R, Ussia A, Schindler L, Wattiez A, Al-Suwaidi S, et al. Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.745548>.
- [248] Nothnick WB, Graham A. Dissecting the miR-451a-Mif Pathway in Endometriosis Pathophysiology Using a Syngeneic Mouse Model: Temporal Expression of Lesion Mif Receptors, Cd74 and Cxcr4. *Biomedicines* 2022;10:1699. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071699>.
- [249] Rekker K, Saare M, Roost AM, Salumets A, Peters M. Circulating microRNA Profile throughout the Menstrual Cycle. *PLoS One* 2013;8:e81166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081166>.
- [250] Teruel-Montoya R, Rosendaal FR, Martínez C. MicroRNAs in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2015;13:170–81. <https://doi.org/10.1111/jth.12788>.
- [251] Joshi NR, Su RW, Chandramouli GVR, Khoo SK, Jeong JW, Young SL, et al. Altered expression of microRNA-451 in eutopic endometrium of baboons (*Papio anubis*) with endometriosis. *Human Reproduction* 2015:dev229. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev229>.
- [252] Yan S, Han B, Gao S, Wang X, Wang Z, Wang F, et al. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8:60149–58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18557>.
- [253] Nakamura N, Terai Y, Nunode M, Kokunai K, Konishi H, Taga S, et al. The differential expression of miRNAs between ovarian endometrioma and endometriosis-associated ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2020;13:51. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00652-5>.
- [254] Wang J, Cong S, Wu H, He Y, Liu X, Sun L, et al. Identification and Analysis of Potential Autophagy-Related Biomarkers in Endometriosis by WGCNA. *Front Mol Biosci* 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.743012>.

- [255] Cai K, Wang Y, Bao X. MiR-106b promotes cell proliferation via targeting RB in laryngeal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011;30:73. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-73>.
- [256] Li X, Yi X, Bie C, Wang Z. Expression of miR-106 in endometrial carcinoma RL95-2 cells and effect on proliferation and invasion of cancer cells. *Oncol Lett* 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8926>.
- [257] Ratert N, Meyer H-A, Jung M, Lioudmer P, Mollenkopf H-J, Wagner I, et al. miRNA Profiling Identifies Candidate miRNAs for Bladder Cancer Diagnosis and Clinical Outcome. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2013;15:695–705. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.008>.
- [258] Li B-K, Huang P-Z, Qiu J-L, Liao Y-D, Hong J, Yuan Y-F. Upregulation of microRNA-106b is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol* 2014;9:226. <https://doi.org/10.1186/s13000-014-0226-4>.
- [259] Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010;29:90. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-90>.
- [260] Qiao G, Dai C, He Y, Shi J, Xu C. Effects of miR-106b-3p on cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition, and targeting of ZNRF3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2019. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4107>.
- [261] Fassbender A. Multiplex immunoassays in endometriosis An array of possibilities. *Frontiers in Bioscience* 2017;22:4496. <https://doi.org/10.2741/4496>.
- [262] Freitag N, Baston-Buest DM, Kruessel J-S, Markert UR, Fehm TN, Bielfeld AP. Eutopic endometrial immune profile of infertility-patients with and without endometriosis. *J Reprod Immunol* 2022;150:103489. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103489>.



## 8.ANEXOS

ANEXO 1.



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE  
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

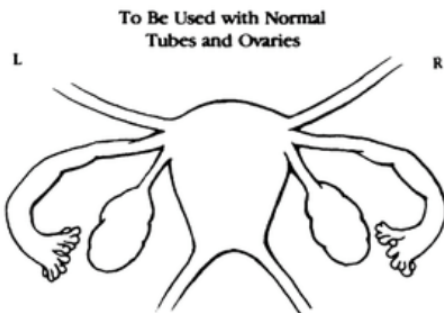
Patient's Name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_  
 Stage I (Minimal) - 1-5      Laparoscopy \_\_\_\_\_ Laparotomy \_\_\_\_\_ Photography \_\_\_\_\_  
 Stage II (Mild) - 6-15      Recommended Treatment \_\_\_\_\_  
 Stage III (Moderate) - 16-40  
 Stage IV (Severe) - >40  
 Total \_\_\_\_\_ Prognosis \_\_\_\_\_

PERITONEUM	<b>ENDOMETRIOSIS</b>	< 1cm	1-3cm	> 3cm
	Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
<b>POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION</b>		Partial 4	Complete 40	
OVARY	<b>ADHESIONS</b>	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
TUBE	R Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16

\*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.  
 Denote appearance of superficial implant types as red [(R), red, red-pink, flamelike, vesicular blobs, clear vesicles], white [(W), opacifications, peritoneal defects, yellow-brown], or black [(B) black, hemosiderin deposits, blue]. Denote percent of total described as R\_\_\_%, W\_\_\_% and B\_\_\_%. Total should equal 100%.

Additional Endometriosis: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Associated Pathology: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



## ANEXO 2. MODELO CONSENTIMIENTO INFORMADO UTILIZADO EN EL ESTUDIO

## DOCUMENTO DE INFORMACION A LA PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: \_\_\_\_\_

**ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.**

<b>LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b>	Biomarcadores en Reproducción, Ginecología y Obstetricia
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL</b>	Dr. Juan Gilabert Estellés
<b>CENTRO</b>	Servicio de Ginecología y Obstetricia (SGO) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Investigación en Biomarcadores en Reproducción, Ginecología y Obstetricia de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV)
<b>EQUIPO INVESTIGADOR</b>	Facultativos del SGO y del laboratorio de Investigación en Biomarcadores en Reproducción, Ginecología y Obstetricia, miembros de la unidad de referencia en cirugía abdominopélvica, facultativos/as del servicio de Anatomía Patológica y de la Unidad de Reproducción.

**1. DESCRIPCIÓN GENERAL:** la línea de investigación de “**Biomarcadores en Reproducción, Ginecología y Obstetricia**” centra sus esfuerzos en la comprensión de los eventos patogénicos implicados en el origen y la progresión de los trastornos reproductivos y de las enfermedades ginecológicas y obstétricas benignas y oncológicas. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del manejo de las patologías relacionadas con la reproducción, ginecología y obstetricia.

PROPÓSITO DE LA LINEA DE INVESTIGACIÓN: analizar en diferentes tipos de muestras factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta de las patologías de interés a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos adversos asociados a dichos tratamientos. En las últimas décadas, la caracterización molecular de los eventos implicados en el desarrollo de las patologías relacionadas con la reproducción, ginecología y obstetricia ha permitido un gran avance en el manejo de las pacientes. No obstante, existen eventos moleculares que todavía necesitan de un mayor estudio. Por ello, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estudios moleculares. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.



**2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:** durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo (como orina heces, saliva, etc.) o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo (como una extracción de sangre).

Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Reproducción, Ginecología y Obstetricia, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos (CEIm), en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

**3. OBJETIVO:** el Centro Sanitario en el que usted está siendo atendida/tratada, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Reproducción, Ginecología y Obstetricia. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.

**4. BENEFICIOS ESPERADOS:** por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales. La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

**5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN:** sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactada en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informada como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

**6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:** la decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

**7. RIESGOS:** el procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico o muestras de sangre extraordinarias que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre apenas tiene efectos secundarios, siendo lo más frecuente la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para el correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

**8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD:** sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que está inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que cumple con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento del reglamento general de protección de datos (RGPD) y la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Al amparo de esta ley, usted como titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, supresión, limitación del tratamiento, portabilidad y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 12) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

**9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION:** en el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.



**10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS:** el Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

## 11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

### Declaración del donante:

Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

### DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

### CONSENTO

➤ Que el CHGUV y la FIHGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Biomarcadores en Reproducción, Ginecología y Obstetricia", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.

- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
  - Mis tejidos excedentes
  - Muestra de heces, orina o saliva
  - Muestra de sangre
  - Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesarios para el diagnóstico
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
  - Si
  - No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
  - destruidas
  - cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
  - cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

Dña : \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_



### DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: \_\_\_\_\_ DNI \_\_\_\_\_

Colegiado Nº \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_ En VALENCIA, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

### 12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

FIRMA: \_\_\_\_\_ En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ como representante legal de D./ Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

FIRMA: \_\_\_\_\_ En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_



**SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS  
INVESTIGACIONES**

<b>LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b>	Biomarcadores en Reproducción, Ginecología y Obstetricia
-------------------------------	--

**PACIENTE:** \_\_\_\_\_

Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_  
y nº de SIP \_\_\_\_\_

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ en  
calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) de la paciente  
\_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

**SOLICITO**

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

FIRMA: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

### ANEXO 3.

**Perfiles de expresión de miRNA en microarray** 166 miRNAs maduros están diferentemente expresados ( $p < 0,05$  y  $> 1,2$  veces de cambio) en 12 muestras de líquido peritoneal de pacientes con endometriosis (48 up-regulated y 78down-regulated) comparado con 6 controles. Los destacados en amarillo son los que se han seleccionado para su validación por PCR.

Downregulated miRNAs		
miRNA	P-value (CONT/PAT)	Fold-Change(ENDO VS. CONTROL)
hsa-miR-3621	1.23E-02	-4.736
hsa-miR-3180-3p	3.23E-02	-3.664
hsa-miR-1231	9.41E-03	-3.513
hsa-miR-4492	4.49E-02	-3.481
hsa-miR-1343-5p	4.66E-02	-3.418
hsa-miR-1909-3p	4.70E-02	-3.396
hsa-miR-4632-5p	2.35E-02	-3.312
hsa-miR-3937	2.58E-03	-3.251
hsa-miR-6722-3p	2.64E-02	-3.188
hsa-miR-3141	2.95E-02	-3.130
hsa-miR-4486	1.30E-02	-3.124
hsa-miR-4695-5p	3.81E-02	-3.097
hsa-miR-6779-5p	1.37E-02	-3.040
hsa-miR-6789-5p	2.61E-02	-2.896
hsa-miR-5189-5p	1.28E-02	-2.795
hsa-miR-6816-5p	4.33E-02	-2.719
hsa-miR-6769b-5p	4.35E-02	-2.605
hsa-miR-149-3p	3.93E-02	-2.481
hsa-miR-3196	2.83E-02	-2.455
hsa-miR-6858-5p	3.47E-02	-2.421
hsa-miR-4488	1.99E-02	-2.405
hsa-miR-8089	3.70E-02	-2.281
hsa-miR-4690-5p	2.78E-02	-2.267
hsa-miR-1229-5p	3.98E-02	-2.234
hsa-miR-1228-5p	2.41E-02	-2.185
hsa-miR-6846-5p	1.72E-02	-2.114
hsa-miR-4707-5p	2.77E-02	-2.108
hsa-miR-3656	4.39E-02	-2.086
hsa-miR-7108-5p	2.59E-02	-2.041
hsa-miR-8072	4.17E-02	-2.018
hsa-miR-6860	2.15E-02	-1.982

hsa-miR-6132	3.96E-02	-1.912
hsa-miR-139-3p	3.33E-03	-1.840
hsa-miR-6088	4.40E-02	-1.815
hsa-miR-6799-5p	3.62E-02	-1.813
hsa-miR-1237-5p	4.54E-02	-1.788
hsa-miR-6753-5p	1.15E-02	-1.745
hsa-miR-4685-5p	4.77E-02	-1.728
hsa-miR-3147	3.63E-02	-1.592
hsa-miR-3188	2.22E-02	-1.536
hsa-miR-6735-5p	3.86E-02	-1.514
hsa-miR-7114-5p	3.13E-02	-1.500
hsa-miR-129-5p	2.44E-03	-1.483
hsa-miR-6736-5p	3.38E-02	-1.449
hsa-miR-4784	9.84E-03	-1.442
hsa-miR-6840-3p	1.97E-02	-1.437
hsa-miR-1909-5p	2.92E-02	-1.433
hsa-miR-6165	6.90E-03	-1.432
hsa-miR-6836-3p	2.98E-02	-1.428
hsa-miR-6738-5p	3.22E-02	-1.381
hsa-miR-6515-5p	4.94E-02	-1.371
hsa-miR-4746-3p	3.99E-02	-1.371
hsa-miR-6894-5p	3.09E-02	-1.362
hsa-miR-4667-3p	2.58E-02	-1.353
hsa-miR-7113-3p	1.03E-02	-1.335
hsa-miR-4793-5p	2.23E-02	-1.331
hsa-miR-6886-5p	1.52E-02	-1.328
hsa-miR-769-3p	3.72E-02	-1.325
hsa-miR-570-3p	3.72E-02	-1.318
hsa-miR-29c-3p	4.36E-02	-1.295
hsa-miR-6766-3p	4.28E-02	-1.293
hsa-miR-3974	6.82E-03	-1.286
hsa-miR-4644	2.89E-02	-1.283
hsa-miR-4450	2.30E-02	-1.278
hsa-miR-623	2.14E-02	-1.267
hsa-miR-514b-5p	1.73E-02	-1.266
hsa-miR-3689a-5p	6.21E-03	-1.258
hsa-miR-3689b-5p	6.21E-03	-1.258
hsa-miR-3689e	6.21E-03	-1.258
hsa-miR-6807-3p	4.23E-03	-1.255
hsa-miR-128-1-5p	5.08E-03	-1.253
hsa-miR-505-3p	8.14E-03	-1.246
hsa-miR-4257	8.02E-03	-1.241
hsa-miR-3176	8.52E-03	-1.240
hsa-miR-296-3p	4.71E-02	-1.237
hsa-miR-6884-5p	3.87E-02	-1.232



<b>hsa-miR-181c-3p</b>	1.68E-02	-1.227
<b>hsa-miR-4509</b>	3.79E-02	-1.209

<b>Upregulated miRNAs</b>		
<b>miRNA</b>	<b>P-value</b>	<b>Fold-Change</b>
hsa-miR-543	9.27E-03	1.201
hsa-miR-1303	4.12E-02	1.201
hsa-miR-1297	1.08E-02	1.202
hsa-miR-4681	1.31E-02	1.206
hsa-miR-4738-5p	4.51E-02	1.211
hsa-miR-2681-3p	4.87E-02	1.211
hsa-miR-103b	2.61E-02	1.216
hsa-miR-2909	6.60E-03	1.217
hsa-miR-3191-3p	3.65E-02	1.221
hsa-miR-6869-3p	3.57E-02	1.222
hsa-miR-563	3.34E-02	1.222
hsa-miR-567	6.29E-03	1.226
hsa-miR-3529-3p	1.32E-02	1.228
hsa-miR-518a-3p	1.09E-02	1.228
hsa-miR-8061	2.78E-03	1.231
hsa-miR-4424	2.83E-02	1.232
hsa-miR-8057	1.22E-02	1.236
hsa-miR-4524a-3p	2.73E-02	1.237
hsa-miR-194-5p	1.70E-02	1.248
hsa-miR-6771-3p	3.62E-02	1.253
hsa-miR-708-5p	4.35E-02	1.253
hsa-miR-519d-5p	1.66E-03	1.255
hsa-miR-935	1.21E-02	1.257
hsa-miR-3167	4.07E-02	1.259
hsa-miR-3121-5p	9.16E-04	1.265
hsa-miR-4418	1.31E-02	1.265
hsa-miR-1296-5p	2.18E-02	1.266
hsa-miR-3925-3p	3.00E-02	1.274
hsa-miR-642b-5p	3.95E-02	1.281
hsa-miR-652-5p	2.90E-02	1.284
hsa-miR-216b-3p	4.68E-02	1.285
hsa-miR-577	9.58E-03	1.289
hsa-miR-6770-3p	4.12E-02	1.294
hsa-miR-6772-3p	1.76E-02	1.296
hsa-miR-625-3p	4.39E-02	1.297
hsa-miR-578	1.26E-02	1.304
hsa-miR-1207-3p	3.12E-02	1.312
hsa-miR-3925-5p	6.09E-03	1.342
hsa-miR-3115	2.39E-02	1.345
hsa-miR-140-5p	2.86E-02	1.345
hsa-miR-320d	4.87E-02	1.350
hsa-miR-519e-5p	2.51E-03	1.384
hsa-miR-4429	2.63E-02	1.461

hsa-miR-23c	4.25E-03	1.513
hsa-miR-106b-3p	1.22E-02	1.689
hsa-miR-424-3p	3.67E-02	2.009
hsa-miR-451a	3.49E-02	4.172
hsa-miR-486-5p	3.86E-02	8.235

#### **ANEXO 4.**

Relación de Artículos derivados del proceso de elaboración de la tesis doctoral.

# Peritoneal fluid modifies the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis

Aitana Braza-Boils<sup>1,\*</sup>, Salam Salloum-Asfar<sup>2</sup>, Josep Marí-Alexandre<sup>1</sup>, Ana Belén Arroyo<sup>2</sup>, Rocío González-Conejero<sup>2</sup>, Moisés Barceló-Molina<sup>1</sup>, Javier García-Oms<sup>3</sup>, Vicente Vicente<sup>2</sup>, Amparo Estellés<sup>1</sup>, Juan Gilabert-Estellés<sup>3</sup>, and Constantino Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Hemostasia, Trombosis, Aterosclerosis y Biología Vascular, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Centro Regional de Hemodonación, Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain <sup>3</sup>Área Maternoinfantil, Hospital General Universitario, Valencia, Spain

\*Correspondence address. E-mail: a.braza.boils@gmail.com

Submitted on May 14, 2015; resubmitted on July 17, 2015; accepted on July 30, 2015

**STUDY QUESTION:** Could peritoneal fluid (PF) from patients with endometriosis alter the microRNA (miRNA) expression profile in endometrial and endometriotic cells from patients?

**SUMMARY ANSWER:** PF from patients with endometriosis modifies the miRNA expression profile in endometrial cells from patients.

**WHAT IS KNOWN ALREADY:** Angiogenesis is a pivotal system in the development of endometriosis, and dysregulated miRNA expression in this disease has been reported. However, to our knowledge, the effect of PF from patients on the miRNA expression profile of patient endometrial cells has not been reported. Moreover, an effect of three miRNAs (miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p) on the regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A mRNA translation in endometrial cells from patients with endometriosis has not been demonstrated.

**STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** Primary cultures of stromal cells from endometrium from 8 control women (control cells) and 11 patients with endometriosis (eutopic cells) and ovarian endometriomas (ectopic cells) were treated with PF from control women (CPF) and patients (EPF) or not treated (OPF) in order to evaluate the effect of PF on miRNA expression in these cells.

**PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS:** MiRNA expression arrays (Affymetrix platform) were prepared from cells (control, eutopic, ectopic) treated with CPF, EPF or OPF. Results from arrays were validated by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction in cultures from 8 control endometrium, 11 eutopic endometrium and 11 ovarian endometriomas. Functional experiments were performed in primary cell cultures using mimics for miRNAs miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p to assess their effect as VEGF-A expression regulators. To confirm a repressive action of miR-29c-3p through forming miRNA:VEGFA duplexes, we performed luciferase expression assays.

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** EPF modified the miRNA expression profile in eutopic cells. A total of 267 miRNAs were modified in response to EPF compared with OPF in eutopic cells. Nine miRNAs (miR-16-5p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-106b-5p, miR-130a-5p, miR-149-5p, miR-185-5p, miR-195-5p, miR-424-5p) that were differently expressed in response to EPF, and which were potential targets involved in angiogenesis, proteolysis or endometriosis, were validated in further experiments (control = 8, eutopic = 11, ectopic = 11). Except for miR-149-5p, all validated miRNAs showed significantly lower levels (miR-16-5p, miR-106b-5p, miR-130a-5p; miR-195-5p and miR-424-5p,  $P < 0.05$ ; miR-21-5p, miR-29c-3p and miR-185-5p,  $P < 0.01$ ) after EPF treatment in primary cell cultures from eutopic endometrium from patients in comparison with OPF. Transfection of stromal cells with mimics of miRNAs miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p showed a significant down-regulation of VEGF-A protein expression. However, VEGFA mRNA expression after mimic transfection was not significantly modified, indicating the miRNAs inhibited VEGF-A mRNA translation rather than degrading VEGFA mRNA. Luciferase experiments also corroborated VEGF-A as a target gene of miR-29c-3p.

**LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION:** The study was performed in an *in vitro* model of endometriosis using stromal cells. This model is just a representation to try to elucidate the molecular mechanisms involved in the development of endometriosis. Further studies to identify the pathways involved in this miRNA expression modification in response to PF from patients are needed.

**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** This is the first study describing a modified miRNA expression profile in eutopic cells from patients in response to PF from patients. These promising results improve the body of knowledge on endometriosis pathogenesis and could open up new therapeutic strategies for the treatment of endometriosis through the use of miRNAs.

**STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S):** This work was supported by research grants by ISCIII and FEDER (PII1/00091, PII1/00566, PII4/01309, PII4/00253 and FI12/00012), RIC (RD12/0042/0029 and RD12/0042/0050), IIS La Fe 2011-211, Prometeo 2011/027 and Contrato Sara Borrell CD13/0005. There are no conflicts of interest to declare.

**Key words:** endometriosis / microRNA / peritoneal fluid / angiogenesis / VEGF-A

## Introduction

Endometriosis is one of the most common gynecological diseases, whose prevalence is estimated at ~10% of women of reproductive age and up to 50% of infertile women (Burney and Giudice, 2012). It is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterus, and it is associated with pain and infertility (McKinnon *et al.*, 2012).

Nowadays, the most accepted theory explaining the development of endometriosis is the retrograde menstruation theory (Sampson, 1927). This theory proposes that endometrial fragments migrate to the peritoneum in a retrograde way during menstruation. In women with endometriosis, these endometrial fragments are able to survive, proliferate and develop new vessels to ensure the establishment of ectopic lesions. Although endometriosis is a benign disease, some features are in common with metastatic processes such as an aberrant angiogenesis. Hence, several groups have analyzed the important role of angiogenesis in the pathogenesis of endometriosis (Donnez *et al.*, 1998; Gilabert-Estellés *et al.*, 2007, 2012; Ramón *et al.*, 2011; Rahmioglu *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2013; Braza-Boils *et al.*, 2014).

Angiogenesis is a complex process regulated by a balance between promoters (proangiogenic factors) and inhibitors (antiangiogenic factors) and is essential for supplying oxygen and nutrition to tissues. Among these factors, the main regulator for angiogenesis is known to be the vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor (VEGFR) system, in which VEGF-A plays a pivotal role (Shibuya, 2008).

Ectopic lesions located in the pelvic peritoneum are immersed in peritoneal fluid (PF); therefore, the study of PF components and their effects on the development of endometriosis is a crucial objective to better understand this pathological condition (Cosín *et al.*, 2010; Berbic and Fraser, 2011; Braza-Boils *et al.*, 2013; Olkowska-Truchanowicz *et al.*, 2013). In this context, increased levels of peritoneal macrophages and various proinflammatory and proangiogenic cytokines, abnormal T and B lymphocytes and VEGF-A have been reported in the PF from patients (Giudice and Kao, 2004; Gilabert-Estellés *et al.*, 2007; Martínez-Román *et al.*, 1997; Olkowska-Truchanowicz *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013). More recently, Berkes *et al.* (2014) described that 49% of studied patients with endometriosis presented neutrophil extracellular traps (NETs) in the PF, whereas control women rarely showed NET formation. They also observed that the highest percentage of NET-positive PFs was observed in patients with Stage I and II disease. These results suggest that NETs could play a role in initiation of the endometriosis.

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that may regulate angiogenesis through the modulation of RNA translation (Bartel,

2009). Several studies have reported the influence of miRNAs on the expression of proteins involved in physiological and pathological conditions (Burney *et al.*, 2009; Ohlsson-Teague *et al.*, 2009, 2010; Kuokkanen *et al.*, 2010; Ramón *et al.*, 2012). In relation to gynecological diseases, it has been suggested that altered expression of miRNAs may be involved in the development of endometriosis (Pan *et al.*, 2007, 2008; Toloubeydokhti *et al.*, 2008; Burney *et al.*, 2009; Guo, 2009; Ohlsson-Teague *et al.*, 2009, 2010; Hawkins *et al.*, 2011; Ramón *et al.*, 2011; Gilabert-Estellés *et al.*, 2012; Braza-Boils *et al.*, 2013, 2014; Laudanski *et al.*, 2013). In a recent study (Braza-Boils *et al.*, 2014), we described dysregulated miRNA expression in endometriosis, including changes in miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p. *In silico* studies showed that these three miRNAs may regulate VEGF-A expression.

Several studies have indicated that miR-424-5p may be involved in angiogenesis regulation (Wang and Olson, 2009; Chamorro-Jorganes *et al.*, 2011).

Moreover, the role of miR-16-5p and miR-424-5p in the cell-intrinsic angiogenic activity of endothelial cells (ECs) has been investigated (Chamorro-Jorganes *et al.*, 2011), and the authors concluded that both miRNAs directly targeted VEGF-A. Therefore, these miRNAs could participate in the regulation of the angiogenic functions of ECs.

In relation to the role of miR-29c in angiogenesis, a previous study in rats confirmed that VEGF-A is a direct target of miR-29a,c specifically suppressing endogenous VEGF-A translation *in vitro* (Yang *et al.*, 2013).

To our knowledge, the direct effect of these three miRNAs (miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p) on the regulation of VEGF-A translation in endometrial and endometriotic cells from patients with endometriosis has not been demonstrated.

In the present study, we investigated the role of PF from patients with endometriosis on the miRNA expression profile in primary cell cultures of stromal cells from control and eutopic endometrium and ovarian endometrioma from patients. Moreover, we evaluated the relationship of miRNAs to the aberrant angiogenesis observed in endometriosis.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Written informed consent was obtained from all patients and controls, and the study was approved by the Ethical Committee from Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain (#2008/0111) and Hospital General Universitario, Valencia, Spain (#PBL00093).

## Clinical groups

### Patients

Caucasian women with moderate or severe endometriosis (Stages III and IV, revised American Society for Reproductive Medicine classification system, 1997) were studied. All women underwent laparoscopic surgical examination of the abdominal cavity and complete excision of endometriotic tissue. The presence of the disease was suspected either clinically or by ultrasonography and confirmed by surgical findings and post-operative pathological examination. Laparoscopic examination of the abdominal cavity excluded the presence of any other pelvic pathology that could potentially confound the data observed.

### Controls

Normal endometrial tissues were obtained from fertile women without endometriosis who underwent surgery for tubal sterilization. The absence of endometriosis was confirmed by meticulous examination of the pelvic and extrapelvic peritoneum, ovaries, intestine and diaphragm in order to detect typical or atypical endometriotic lesions.

PF from controls and patients were centrifuged at  $1500 \times g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$  pore size membrane, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Women affected by menorrhagia or hypermenorrhea or women who had been pregnant or breastfeeding during the previous 6 months were excluded from the study. None of the women had received any form of hormone therapy for at least 3 months before the study.

## Tissue samples and cell lines

In order to isolate stromal cells, 11 endometrial tissues (eutopic cells) (mean age 32 years; range 19–40) and 11 ovarian endometriomas (ectopic cells) from women with moderate or severe endometriosis (Stages III and IV) (mean age 30 years; range 19–42) and control endometrial tissue (control cells) from 8 women without the disease (mean age 36 years; range 24–43) were obtained.

The EC line EA.hy926 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). ECs were maintained in phenol-red free Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Madrid, Spain). A human colon cancer cell line HCT-116 deficient for Dicer (HCT-DK) was a kind gift from Dr Renato Baserga (Thomas Jefferson University, PA, USA). HCT-DK were cultured in McCoy's 5A (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum.

## PF pools

PF pools consisted of 10 PFs from women with endometriosis (endometriotic PF pool, EPF) (mean age 33 years; range 27–39) and 10 PFs from fertile women without endometriosis (control PF pool, CPF) (mean age 37 years; range 21–47) in the proliferative phase of the menstrual cycle.

## Primary cell culture of stromal cells from endometrial and endometriotic tissues and PF exposure

Cell culture and exposure to PF pools were performed as previously described (Braza-Boils et al., 2013), and functional experiments were performed in cultures at passage 2–4. The cell lines EA.hy926 and HCT-DK were cultured according to the American Type Culture Collection protocols.

## Cell transfections

Cells were seeded 24 h before transfection in complete medium without antibiotics and transfected with 100 nM of chemically modified double-stranded RNAs that mimic endogenous miRNAs (miR-16-5p, miR-29c-3p,

miR-424-5p or scrambled control) by using the siPORT™ NeoFX™ transfection agent from Life Technologies in OPTIMEM according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were collected for subsequent mRNA and protein analyses. All transfections were performed in triplicate.

## RNA extraction

Total RNA from cells stimulated with EPF or CPF and without stimulation (OPF) was extracted using mirVana miRNA isolation kit (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. Total RNA from transfected cell cultures was isolated using Trizol Reagent (Life Technologies). Yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Products, Wilmington, DE, USA), and the RNA integrity was analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All samples employed for microarray assays presented a RNA integrity number  $\geq 9.0$ .

## Analysis of miRNA expression profiles

MiRNA expression profiles were studied in primary cell cultures of stromal cells from four eutopic endometrium, three ovarian endometrioma and three control endometrium exposed to EPF, CPF or OPF. Affymetrix platform, GeneChip miRNA 2.0 arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) were employed according to the manufacturer's protocol. Arrays were prepared in our Array Facility (IIS La Fe, Valencia, Spain). Data analysis was performed employing PARTEK Genomic Suite software (PARTEK, Inc., St Louis, MO, USA) and normalized using the robust multiarray analysis (RMA) algorithm. Analysis of variance (ANOVA) statistical analysis allowed us to generate a list of differently expressed miRNAs, with significance set at a  $P$ -value  $< 0.05$ .

## Validation of selected mature miRNAs by quantitative real-time RT-PCR

Target genes of differentially expressed miRNAs in response to PF exposure were assessed using the following miRNA binding sites prediction programs: miRBase (<http://microma.sanger.ac.uk/>) (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011), miRSVR (<http://www.microma.org>) (Betel et al., 2010), TargetScan (<http://www.targetscan.org>) (Lewis et al., 2005) and DIANA-microT (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) (Paraskevopoulou et al., 2013). Nine miRNAs (miR-16-5p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-106b-5p, miR-130a-5p, miR-185-5p, miR-195-5p, miR-424-5p) with potential targets involved in angiogenesis, proteolysis or endometriosis were selected to be validated by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) in a larger number of experiments, including the cell cultures in which microarray experiments were performed. RNA RNU6B was employed as endogenous control.

Mature miRNAs quantification was performed by miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Vedbaek, Denmark) employing a Light cycler 480 II instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

## VEGF-A protein quantification

VEGF-A protein levels from supernatants were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Human VEGF, IBL International, Hamburg, Germany). No cross-reactivity or interference with platelet-derived growth factor was observed. This assay recognizes human VEGF-A<sub>165</sub> and VEGF-A<sub>121</sub> isoforms. The intra-assay and inter-assay variation coefficients were 4–6% and 7–10%, respectively.

VEGF-A protein expression from cells was quantified by western blot (anti-VEGF antibody ab46154, Abcam, Cambridge, UK), which recognizes both human VEGF-A<sub>165</sub> and VEGF-A<sub>121</sub> isoforms.

## VEGF-A mRNA

VEGF-A mRNA was quantified by qRT-PCR. Briefly, RNA (400 ng) and SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) were used for reverse transcription reactions. *VEGFA* and beta-actin (*ACTB*) (as endogenous reference control) gene expression was quantified by polymerase chain reaction (PCR) (probe references: Hs00900055\_m1 and Hs99999903\_m1, respectively, from Life Technologies). The  $2^{-\Delta Ct}$  method was followed to calculate the relative abundance of mRNA compared with endogenous control expression (Ct = threshold cycle;  $\Delta Ct = Ct$  endogenous control—Ct sample gene).

## Luciferase experiments

### Plasmid construction

To confirm the repressive action of miR-29c-3p through forming miRNA:-*VEGFA* duplexes, we inserted a fragment of the *VEGFA* 3' untranslated region (UTR) containing the binding site for this miRNA into a luciferase expression vector, generating the luciferase reporter construct pMIR-*VEGFA*-3'UTR. Briefly, pMIR-*VEGFA*-3'UTR contained a fragment located at nt +1575-1829 of the *VEGFA* 3'UTR. The PCR fragment was cloned into the pCR2.1 vector (Life Technologies™). Positive clones were digested with *SacI* and *HindIII* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), and the insert was subcloned into the luciferase reporter plasmid pMIR-REPORT™ (Life Technologies) previously digested with *SacI* and *HindIII*. Insertion of the *VEGFA* 3'UTR fragment was checked by sequencing (ABI3130 XL, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). All sequence analyses and alignments were performed with the SeqmanPro program (Lasergene version 7.1, DNASTAR, Madison, WI, USA).

To generate mutations in the predicted target site for the miR-29c-3p, seven nucleotides located in the seed sequence were deleted using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). Sequencing was performed to check for the deletion of the seed sequences. The primers used for cloning and mutagenesis are detailed in [Supplementary data, Table S1](#).

### Luciferase vector transfection

MiR-29c-3p mimic was co-transfected with pMIR-*VEGFA*-3'UTR and *Renilla* vector pRL-TK (Promega, Madison, WI, USA) into the HCT-DK cell line.

Cells were seeded at a density of 80 000 cells/well in 24-well plates with McCoy's 5A supplemented with 10% fetal calf serum without antibiotics. The following day, cells were co-transfected with scrambled precursor (SCR) or miR-29c-3p mimic (both pMIR-REPORT plasmids—1000 ng/well—wild type or mutated for the miRNA seed site) and 100 ng/well of *Renilla* luciferase control plasmid (pRL-TK, Promega) using Lipofectamine LTX (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Luciferase assays were performed as previously described ([Salloom-Asfar et al., 2014](#)). The enzymatic activities of *Renilla* and firefly luciferases were quantified in a Synergy 2 luminometer (Biotek, Winooski, VT, USA). Each combination of pMIR-REPORT (wild-type and mutated 3'UTR) and pRL-TK was tested in triplicate in five independent experiments. Firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity for each transfected well. The normalized data were expressed as changes relative to the data of the cells transfected with 100 nM SCR mimic. SCR was taken as 100%.

## Statistical analysis

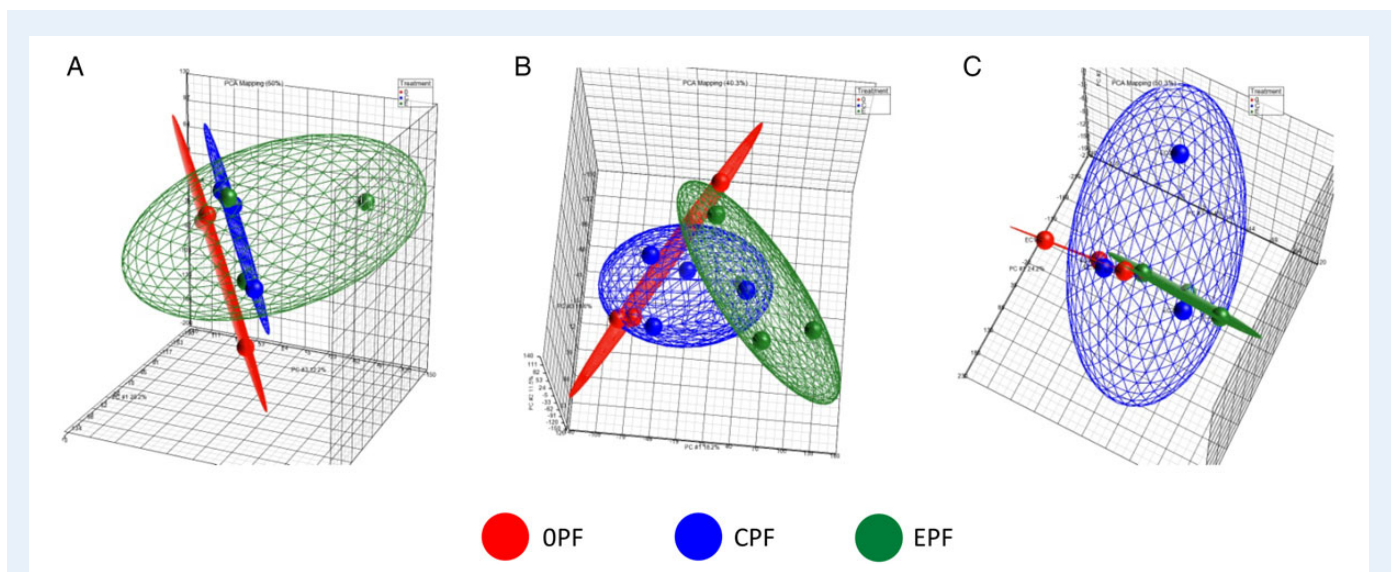
Results from arrays were analyzed using PARTEK Genomic Suite Software. Comparisons between groups for all other analyses were performed by an unpaired t-test. Statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences Release 20 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Luciferase activity levels were compared between SCR and mimics in wild-type and mutant vectors using linear mixed models. Independent experiments were regarded as a random effects variable in the model, and SCR/miR and WT/MUT factors were regarded as fixed effects. Error bars were used to display SEs, and *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. These analyses were performed using R software (version 3.0.2) (r-project.org).

## Results

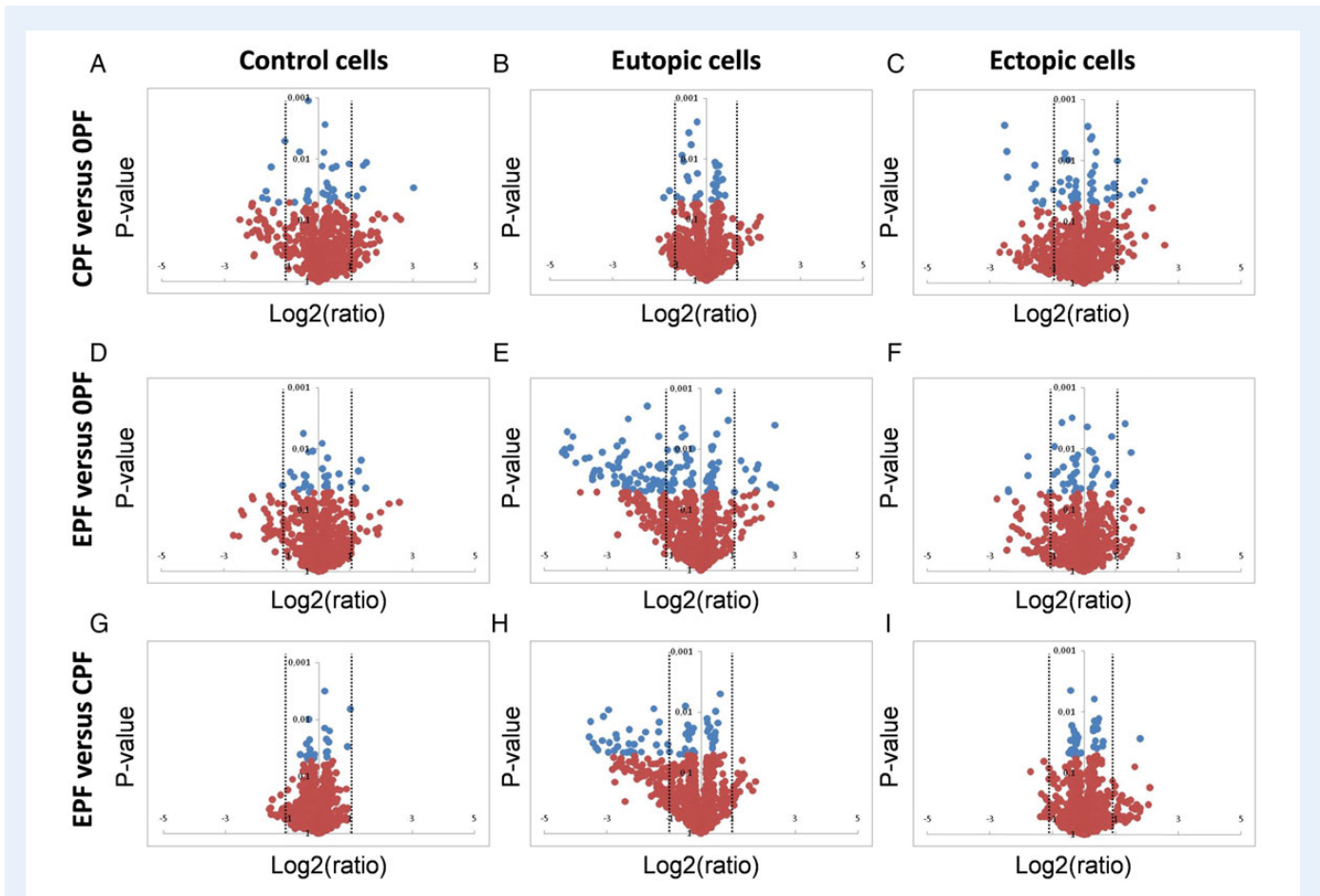
### MiRNA expression profiles (Affymetrix platform)

The GeneChip miRNA 2.0 Array contains 1105 human probes for mature miRNAs and 1121 probes for their respective pre-miRNAs.

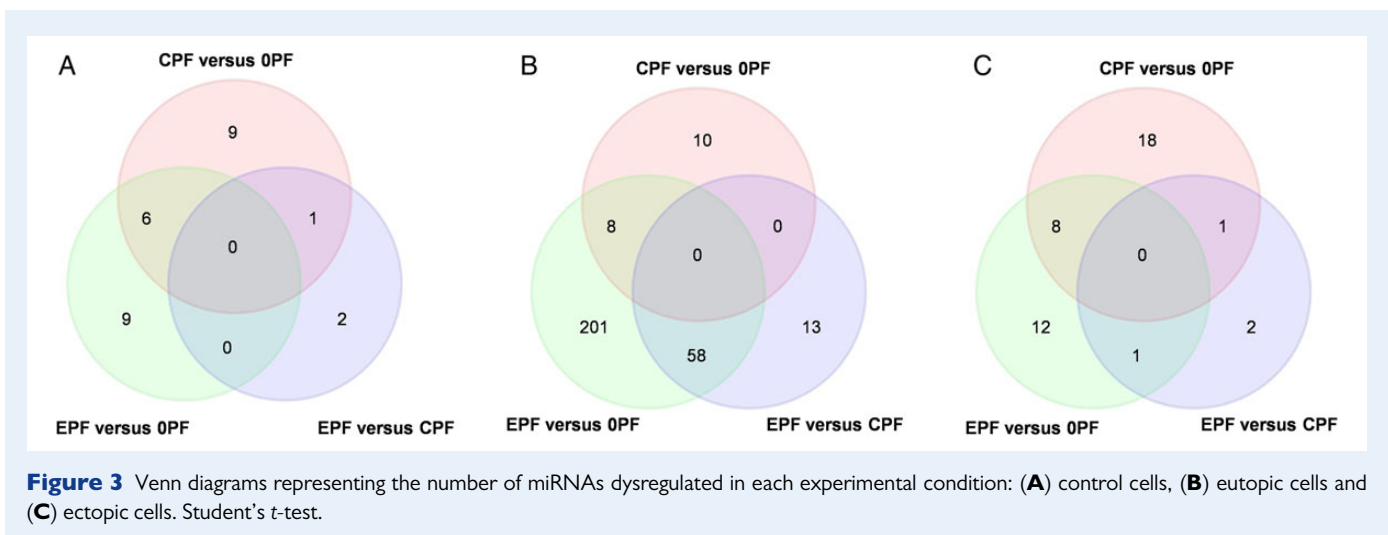


**Figure 1** Principal component analysis performed from miRNA expression arrays (Affymetrix): (A) control cells, (B) eutopic cells and (C) ectopic cells. OPF: without any treatment; CPF: treated with peritoneal fluid from control women and EPF: treated with peritoneal fluid from patients.





**Figure 2** Volcano plots representing miRNA differently expressed in control, eutopic or ectopic cells in response to different treatments.



**Figure 3** Venn diagrams representing the number of miRNAs dysregulated in each experimental condition: (A) control cells, (B) eutopic cells and (C) ectopic cells. Student's *t*-test.

Profiling of these RNAs was completed for three cultures from control endometrium (control cells), four from endometrium from patients (eutopic cells) and three from ovarian endometriomas (ectopic cells) treated with PFs from patients (EPF), controls (CPF) and without treatment (OPF). Principal component analysis revealed that control cells treated with CPF showed no modification in the miRNA expression

pattern in comparison with untreated cells. Nevertheless, the miRNA expression was different in response to EPF (Fig. 1A). In contrast to control cells, eutopic and ectopic cells responded to EPF and CPF in a different way in terms of miRNA expression (Fig. 1B and C). Volcano plots from ANOVA test (Fig. 2) revealed that the major difference in miRNA expression was observed in eutopic cells after EPF treatment

**Table 1** miRNA microarray expression and targets of miRNA selected for the PCR experiments.

miRNA (v. 15) <sup>a</sup>	miRNA (v. 20) <sup>b</sup>	miRNA sequence 5'–3'	Eutopic cells response to EPF compared with OPF		Target
			Fold change	P-value *	
miR-16	<b>miR-16-5p</b>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	-9.96870	0.04321	VEGFA, EGFR2, BCL2, FGFR1, COX2
miR-21	<b>miR-21-5p</b>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	-16.96419	0.00620	TIMP3, TGFb2, SERPINB5, VEGFA, BCL2, EGFR, MMP2, HIF1a, MMP8, TGFb, TGFBR1, THBS1, TNFRSF11B
miR-29c	<b>miR-29c-3p</b>	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	-2.38095	0.01301	VEGFA, PDGFB-C, THSD4 (TSP-1D4), SERBP1, ADAMTS2, 5–7, 9, 17–19
miR-106b	<b>miR-106b-5p</b>	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	-20.34633	0.01002	TGFBR2, MMP2, THSD3, CCNG2, ADAM9, IL8, MMP24, COL4A3, CCND1, TIMP2, CCND2, COL19A, FGF4, VEGFA
miR-130a	<b>miR-130a-3p</b>	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU	-19.25180	0.00517	SERPINE1, COL4A1, IL6R, COL4A5, VEGFA, COL1A2, SERPINB7, FAS (TNFR superfamily)
miR-149	<b>miR-149-5p</b>	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	3.43946	0.04766	GPC1, FGFR1 <sup>c</sup> , EDNRA, TNFRSF19
miR-185	<b>miR-185-5p</b>	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA	-19.84907	0.01248	VEGFA, THSD7A, CLDN11, IL17R, HIF3a, EDA2R
miR-195	<b>miR-195-5p</b>	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	-4.99004	0.00318	COL12A1, CDCA4, BCL2L2, VEGFA, CLDN12, CCND1, SERBP1, DICER1, ADAMTS5, GHR, CLDN2, ESRRA, ESRRG, ADAMTS1
miR-424	<b>miR-424-5p</b>	CAGCAGCAAUUAUGUUUUGAA	-2.03838	0.04712	VEGFA, IL1, FGF2

ADAMTS2, 5–7, 9, 17–19: ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2, 5–7, 9, 17–19; BCL2: B-cell lymphoma 2; BCL2L2: BCL2-like 2; CCND1: cyclin D1; CCND2: cyclin D2; CCNG2: cyclin G2; CDCA4: cell division cycle associated 4; CLDN11: claudin 11; CLDN12: claudin 12; COL1A2: collagen, type I, alpha 2; COL4A1: collagen, type IV, alpha 1; COL4A3: collagen, type IV, alpha 3; COL4A5: collagen, type IV, alpha 5; COL12A1: collagen, type XII, alpha 1; COL19A: collagen, type IX, alpha; COX2: cyclooxygenase 2; DICER1: dicer 1, ribonuclease type III; EDA2R: ectodysplasin A2 receptor; EDNRA: endothelin receptor type A; EGFR2: epidermal growth factor receptor 2; ESRRA: estrogen-related receptor alpha; ESRRG: estrogen-related receptor gamma; FAS (TNFR superfamily): Fas cell surface death receptor; FGF2: fibroblast growth factor 2; FGF4: fibroblast growth factor 4; FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1; GHR: growth hormone receptor; GPC1: glypican 1; HIF1a-3a: hypoxia inducible factor 1–3, alpha subunit; IL1: interleukin 1; IL6R: interleukin 6 receptor; IL8: interleukin 8; IL17R: interleukin 17 receptor; MMP2: matrix metalloproteinase-2; MMP8: matrix metalloproteinase-8; MMP24: matrix metalloproteinase-24; PDGFB-C: platelet-derived growth factor polypeptide-C; SERPINE1: plasminogen activator inhibitor type 1; SERPINB5-7: serpin peptidase inhibitor, clade B, member 5–7; TGFb2: transforming growth factor beta 2; TGFBR1: transforming growth factor, beta receptor 1; TGFBR2: transforming growth factor, beta receptor 2; THBS1: thrombospondin 1; THSD3: thrombospondin, type I, domain containing 3; THSD4: thrombospondin, type I, domain containing 4; THSD7A: thrombospondin, type I, domain containing 7A; TIMP3-2: tissue inhibitor of metalloproteinases-3-2; TNFRSF11B: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b; TNFRSF19: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19; VEGFA: vascular endothelial growth factor.

EPF, endometriotic peritoneal fluid; OPF, without peritoneal fluid.

<sup>a</sup>Referred to miRBase database release (version 15).

<sup>b</sup>Referred to miRBase database release (version 20). MiRNAs are named in microarray according to miRBase version 16. However, the current classification is referred to miRBase 20 release.

<sup>c</sup>Chamorro-Jorganes et al. (2014).

\*ANOVA.

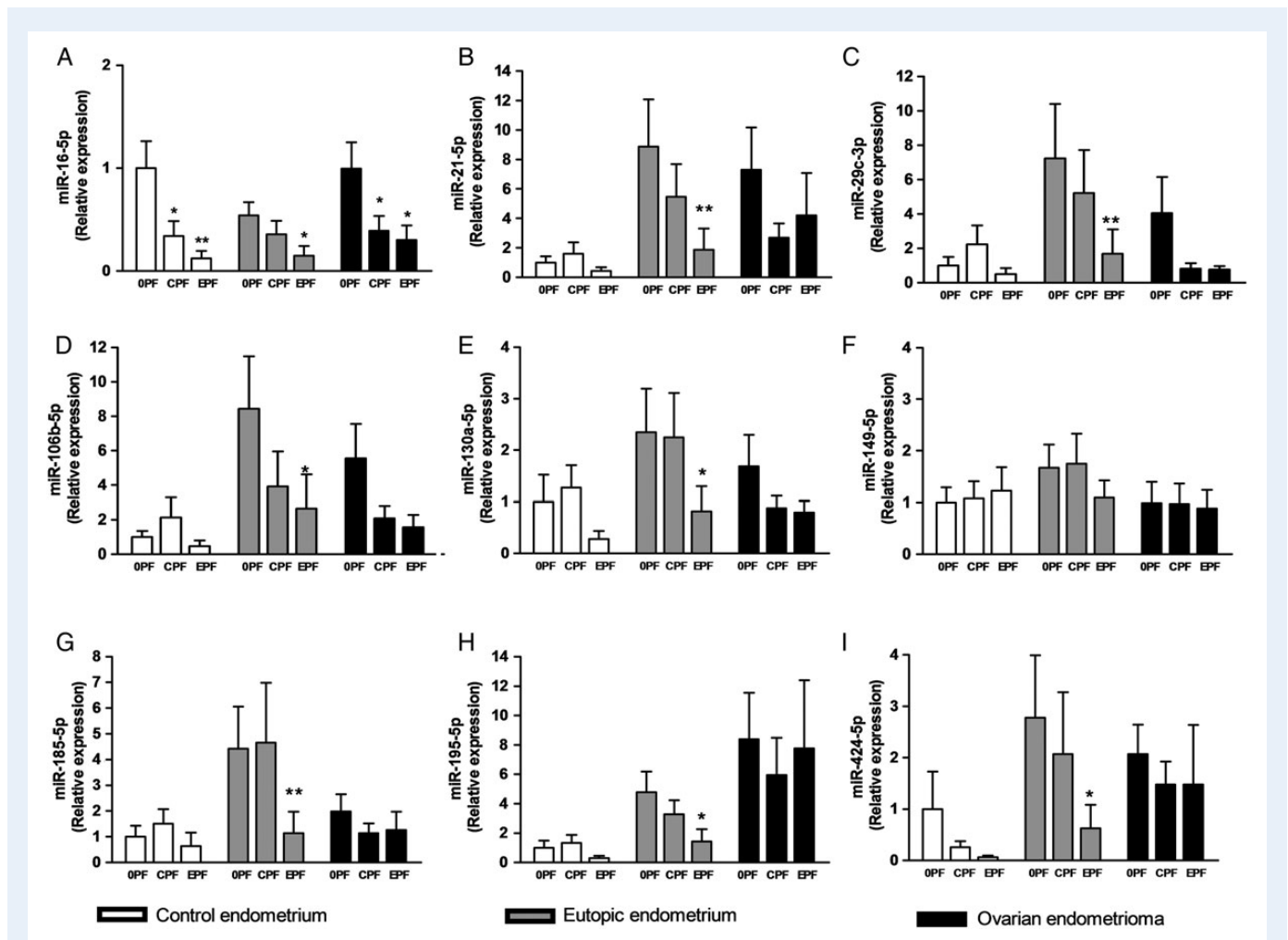
(Fig. 2E and H). Moreover, it should be underlined that the majority of these miRNAs were down-regulated in response to EPF. The comparison between the response to EPF and to OPF showed that eutopic cells presented the highest number of miRNAs significantly dysregulated:  $P < 0.05$  and  $\pm 2$ -fold change (Fig. 2H). Venn diagrams (Fig. 3) representing all of the differentially expressed ( $P < 0.05$ ) human miRNA probes in the array showed that EPF modified the expression of some miRNAs  $> 12$ -fold in eutopic cells compared with the other cultures. Among the 267 miRNAs that are modified in response to EPF compared with OPF in eutopic cells (Fig. 3B), 82 corresponded to mature miRNAs (72 down-regulated and 10 up-regulated) ( $P < 0.05$ ;  $\pm 2$ -fold change) (Supplementary data, Table SII).

After the *in silico* study of the target genes for those miRNAs differentially expressed in eutopic cells from patients treated with EPF, we selected nine miRNAs related to angiogenesis (miR-16-5p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-106b-5p, miR-130a-5p, miR-149-5p, miR-185-5p,

miR-195-5p, miR-424-5p) for validation by qRT-PCR in a larger number of experiments. Eight of these miRNAs were down-regulated in the expression arrays (miR-16-5p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-106b-5p, miR-130a-5p, miR-185-5p, miR-195-5p, miR-424-5p), and miR-149-5p was up-regulated. (Table I).

### Validation by qRT-PCR

With the exception of miRNA-149-5p, which did not show increased levels, as the arrays results revealed (Fig. 4F), the other eight miRNAs showed statistically significant lower levels after EPF treatment in primary cell cultures from eutopic endometrium from patients (Fig. 4A–E, H and I). MiR-16-5p and miR-424-5p showed lower levels after CPF and EPF treatments in control cells. Ectopic cells reduced the expression of miR-16-5p, miR-29c-3p, miR-106b-5p, miR-130a-5p and miR-185-5p in the presence of both PF pools, but only the change in miR-16-5p was statistically significant.



**Figure 4** Nine miRNAs were selected from array results in order to be validated by qRT-PCR in control ( $n = 8$ ), eutopic ( $n = 11$ ) and ectopic ( $n = 11$ ) cells treated with: ANOVA test \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

## Functional experiments using mimics

MiR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p were significantly down-regulated in eutopic cells after EPF treatment in the array validation phase. Recently, our group published a dysregulated miRNA expression profile in different lesions characteristic of endometriosis, including miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p (Braza-Boils et al., 2014). Moreover, *in silico* analysis revealed that all three miRNAs could regulate VEGF-A translation (Table I).

To specifically investigate whether VEGF-A expression could be regulated by these three miRNAs, we transfected the EA.hy926 EC line and primary cell cultures from control and patient endometrium with mimics of miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p (Fig. 5).

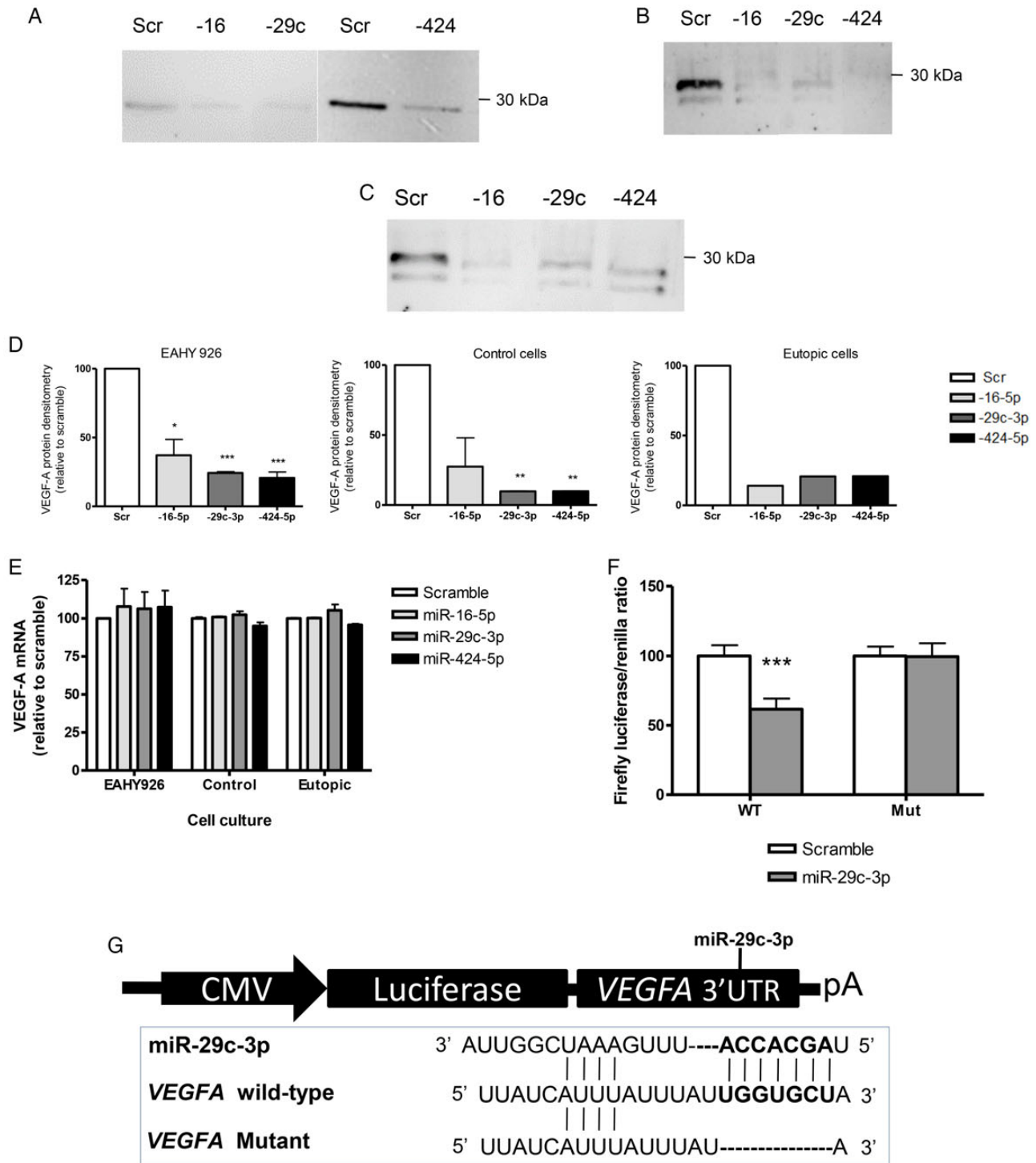
In order to assess the possible effect of endogenous miRNAs on mimic transfections, miRNAs levels were quantified by qRT-PCR (Supplementary data, Fig. S1). Results validated the effect of exogenous synthetic miRNAs used in the functional studies.

In the EA.hy926 cell line, transfection with miR-16-5p, miR-29c-3p or miR-424-5p mimics induced a reduction in VEGF-A expression versus scrambled mimic of  $63 \pm 11\%$ ,  $76 \pm 0.9\%$  and  $79 \pm 0.9\%$  ( $P < 0.01$ ), respectively (Fig. 5A and D). When the same transfections with

miR-16-5p, miR-29c-3p or miR-424-5p mimics were performed in primary cell cultures from controls and patient endometrium, VEGF-A expression was reduced versus scrambled mimic by  $79 \pm 20\%$  ( $P = 0.12$ ),  $90 \pm 0.2\%$  and  $90 \pm 0.2\%$  ( $P < 0.001$ ) in endometrial cells from women without the disease (Fig. 5B and D) and  $96\%$  ( $P < 0.001$ ),  $79\%$  and  $78\%$  ( $P < 0.01$ ) in patient endometrial cells, respectively (Fig. 5C and D). In control cell cultures, different doses of mimics (20, 50 and 100 nM) were transfected. VEGFA mRNA levels were quantified after transfections, observing no statistically significant modifications in any of the studied cell types (Fig. 5E). Moreover, quantification of VEGF-A protein levels by ELISA showed that mimics seem to act in a dose-dependent manner (Supplementary data, Fig. S2).

## Validation of miRNA-VEGF-A interaction

To test the hypothesis that miR-29c-3p can directly modulate VEGF-A expression, VEGFA 3'UTR was cloned downstream from the firefly luciferase open reading frame. Either the wild-type reporter construct or the miR-29c-3p binding site deleted construct were co-transfected in different experiments (Fig. 5G) in the HCT116-Dicer KO cell line, with a SCR or a miR-29c-3p mimic.



**Figure 5** *In vitro* studies. (A–C) Representative western blots for VEGF-A after transfection of cells (A: EA.hy 926, B: control cells, C: eutopic cells) with scramble or miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p mimics (100 nM) for 48 h. (D) Densitometric analysis of VEGF-A extracellular expression. (E) VEGF-A protein levels after control cell transfection with mimics (20, 50 and 100 nM) measured by ELISA. (F and G) Luciferase assays. (F) VEGF-A mRNA levels after mimic transfection (100 nM). (G) Schematic representation of miR-29c-3p predicted target site in VEGFA 3' UTR. Complementarities between the seed region (seven nucleotides) of miR-29c-3p and 3' UTR of VEGFA mRNA target site are shown. HCT116—The dicer KO cell line was co-transfected with scramble or miR-29c-3p mimic and pMIR-VEGFA-3' UTR wild-type (WT) or mutated (Mut). All experiments were performed in triplicate ( $n = 3$ ). ANOVA test  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ .

Our results showed that the relative luciferase activity was significantly decreased in cells co-transfected with the wild-type construct and miR-29c-3p ( $62 \pm 8\%$ ,  $P < 0.001$ ). However, this inhibition was not observed when co-transfection was performed with the vector containing the specific mutated 3' UTR of VEGFA (Fig. 5F), indicating that VEGFA 3' UTR could be a direct target of miR-29c-3p.

## Discussion

In the present study, we observed that PF from patients modified the miRNA expression profile in endometrial stromal cells from women with endometriosis, including miRNAs involved in angiogenesis. In a previous report (Braza-Boils et al., 2014), we described a dysregulated miRNA expression profile in endometrial and endometriotic tissues, including miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p, and *in silico* studies showed that these three miRNAs may regulate VEGF-A expression. In the present study, we have performed functional studies employing mimics for these miRNAs, indicating that these miRNAs regulate VEGF-A translation not only in the EA.hy926 cell line but also in cells from endometrial tissues from women with and without endometriosis.

Angiogenesis plays an important role in multiple physiological and pathological processes including gynaecological diseases like endometriosis. Several miRNAs can control the expression of VEGF-A. MiR-29c-3p is a multifunctional miRNA implicated in several processes, including extracellular remodeling and angiogenesis, and can contribute to the formation of endometriotic lesions in patients with endometriosis (Braza-Boils et al., 2014). A study performed in rats (Yang et al., 2013) demonstrated that VEGF-A is a direct target of miR-29a and miR-29c and these miRNAs suppressed endogenous VEGF-A expression *in vitro*. In the present study, we have observed that the transfection of miR-29c-3p in endometrial and endometriotic cells from patients with endometriosis significantly decreased VEGF-A protein expression. Furthermore, luciferase experiments indicated that VEGF-A is a direct target of miR-29c-3p also in humans.

Both miR-16-5p and miR-424-5p target the same 'seed sequence', the nucleotide sequence in which these miRNAs can bind to VEGFA mRNA, which implies that both miRNAs can share most of their target genes. In the present work, we observed a significant reduction in VEGF-A protein expression in primary cell cultures from controls and patients endometrium after transfection with miR-16-5p or miR-424-5p mimics. However, VEGFA mRNA expression after mimic transfection was not significantly modified. The decrease in protein levels without significant modification of mRNA levels indicates that these miRNAs mainly inhibit VEGF-A translation without degrading VEGFA mRNA, as has been described for several proteins (Braza-Boils et al., 2013). Indeed, in a previous study (Braza-Boils et al., 2013), we investigated the influence of PF from women with and without endometriosis on the expression of six miRNAs, including miR-16-5p, that modulate angiogenesis, as well as several angiogenic and proteolytic factors in endometrial and endometriotic cell cultures. We found a significant correlation between the decrease in miR-16-5p and the increase in VEGF-A protein, but not mRNA, in response to PF exposure in endometrial and endometriotic cell cultures.

In a previous report, Chamorro-Jorganes et al. (2011) investigated the role of miR-16-5p and miR-424-5p in the angiogenic activity of ECs and showed that both miRNAs directly targeted VEGFA. These results are in agreement with results obtained in the present report, in which we have

observed that miR-16-5p and miR-424-5p can regulate VEGF-A protein levels in endometrial and endometriotic cells.

In a previous study (Braza-Boils et al., 2014), we suggested that miR-424-5p contributed, at least in part, to the higher VEGF-A levels observed in the endometrium from patients with endometriosis. Other authors indicated that miR-424-5p targets VEGF-A and plays an important role in down-regulating the angiogenic activity of this protein (Wang and Olson, 2009; Chamorro-Jorganes et al., 2011). Moreover, Nakashima et al. (2010) reported that down-regulation of miR-424 can contribute to the abnormal angiogenesis in senile hemangioma.

MiRNAs may mediate cell-to-cell communication via exosomes (Boon and Vickers, 2013; Kosaka et al., 2013). However, the mechanisms whereby miRNAs are packaged in exosomes and the selection of miRNAs secreted in each cell state are unclear. Exosomal miRNAs have been characterized in blood, urine and other body fluids, and exosomes can reflect their tissue or cell of origin by the presence of specific surface proteins (Zhang et al., 2015). Moreover, a cell-phenotype modulation induced by miRNAs-enriched exosomes has been described (Hulsmans and Holvoet, 2013; Raposo and Stoorvogel, 2013; Rayner and Hennessy, 2013).

In order to perform miRNA-based communication, three steps are required. In a first step, miRNAs must be secreted from donor cells into exosomes. Second, miRNAs migrate into RNase-protected vesicles in the recipient cell. And, finally, miRNAs must recognize their mRNA target and repress its translation (Boon and Vickers, 2013).

Although peritoneal macrophages are able to secrete miRNA-rich exosomes (Hulsmans and Holvoet, 2013) and could contribute to the final endometriotic phenotype by means of the aforementioned mechanism, our results showed that PF from patients modified miRNA expression in eutopic cells from patients with endometriosis, indicating not only that peritoneal factors could be involved in the endometriosis pathogenesis, but also that endometrial factors seem to be implicated. However, more studies are required in order to elucidate the mechanisms by which PF from patients is able to modify the receptor cell phenotype.

In conclusion, PF from patients modified the miRNA expression profile in endometrial cells from women with endometriosis. Functional studies employing mimics for miR-16-5p, miR-29c-3p and miR-424-5p suggested that these miRNAs regulate VEGF-A translation not only in EA.hy926 cells but also in primary stromal cells from endometrium from patients with endometriosis and control women. Additional experiments are required in order to elucidate the potential role of miRNA-rich exosomes in this 'in vitro' model of endometriosis. These promising results really improve the body of endometriosis pathogenesis knowledge that could open up new therapeutic strategies for the treatment of endometriosis through the use of miRNAs.

## Supplementary data

Supplementary data are available at <http://humrep.oxfordjournals.org/>.

## Acknowledgements

The authors thank David Hervás for statistical analysis and Dolors Sánchez-Izquierdo for microarray data analysis.

## Authors' roles

A.B.-B. developed the idea for the paper, formulated the study design, performed analyses and interpretation of data, and manuscript drafting. S.S.-A. performed analyses and interpretation of data. J.M.-A. performed analyses and interpretation of data and wrote the manuscript. B.A. performed analyses and interpretation of data. R.G.-C. participated in analysis and interpretation of data and participated in a critical revision. M.B.-B. performed analyses and interpretation of data. J.G.-O. provided patients for the study. V.V. participated in a critical revision. A.E. developed the idea for the paper, formulated the study design, participated in analysis and interpretation of data, and wrote the manuscript. J.G.-E. provided patients for the study and participated in a critical revision. C.M. developed the idea for the paper, formulated the study design, performed analyses and interpretation of data, and wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

## Funding

This work was supported by ISCIII and FEDER (PI11/00091, PI14/00253, PI14/01309 and FI12/00012), RIC (RD12/0042/0029 and RD12/0042/0050), IIS La Fe 2011-211, Prometeo 2011/027 and Contrato Sara Borrell CD13/0005.

## Conflict of interest

None declared.

## References

- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;**136**:215–233.
- Berbic M, Fraser IS. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *J Reprod Immunol* 2011;**88**:149–155.
- Berkes E, Oehmke F, Tinneberg HR, Preissner KT, Saffarzadeh M. Association of neutrophil extracellular traps with endometriosis-related chronic inflammation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;**183**:193–200.
- Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 2010;**11**:R90.
- Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**:186–192.
- Braza-Boils A, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gilabert J, Marí-Alexandre J, Chirivella M, España F, Estellés A. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS One* 2013;**8**:e62370.
- Braza-Boils A, Marí-Alexandre J, Gilabert J, Dolors S-I, España F, Estellés A, Gilabert-Estellés J. microRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum Reprod* 2014;**29**:978–988.
- Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;**98**:511–519.
- Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, Giudice LC. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:625–631.
- Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LO, Sandhu D, Fernández-Hernando C, Suárez Y. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:2595–2606.
- Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Rotllan N, Cirera-Salinas D, Suárez Y. Autoregulation of glypican-1 by intronic microRNA-149 fine tunes the angiogenic response to FGF2 in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2014;**127**:1169–1178.
- Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gómez-Lechón MJ, Gilabert J, Chirivella M, Braza-Boils A, España F, Estellés A. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010;**25**:398–405.
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;**13**:1686–1690.
- Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, Castelló R, Chirivella M, Estellés A. Expression of angiogenic factors in endometriosis: its relation to fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems. *Hum Reprod* 2007;**22**:2120–2127.
- Gilabert-Estellés J, Braza-Boils A, Ramon LA, Zorio E, Medina P, España F, Estelles A. Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Curr Med Chem* 2012;**19**:2406–2413.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;**364**:1789–1799.
- Guo SW. Epigenetics of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:587–607.
- Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, Matzuk MM. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol* 2011;**25**:821–832.
- Hulsman M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res* 2013;**100**:7–18.
- Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:W169–W173.
- Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet* 2013;**4**:173.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:D152–D157.
- 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.
- Laudanski P, Charkiewicz R, Kuzmicki M, Szamatowicz J, Charkiewicz A, Niklinski J. MicroRNAs expression profiling of eutopic proliferative endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;**11**:78.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;**120**:15–20.
- Martínez-Román S, Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Vilella R, Vanrell JA. Transferrin receptor (CD71) expression in peritoneal macrophages from fertile and infertile women with and without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997;**38**:413–417.
- McKinnon B, Bersinger NA, Wotzkow C, Mueller MD. Endometriosis-associated nerve fibers, peritoneal fluid cytokine concentrations, and pain in endometriotic lesions from different locations. *Fertil Steril* 2012;**97**:373–380.
- Nakashima T, Jinnin M, Etoh T, Fukushima S, Masuguchi S, Maruo K, Inoue Y, Ishihara T, Ihn H. Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy. *PLoS One* 2010;**5**:e14334.

- Ohlsson Teague E, Van der Hoek K, Van der Hoek M, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson S, Print C, Hull L. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009;**23**:265–275.
- Ohlsson-Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:146–165.
- Olkowska-Truchanowicz J, Bocian K, Maksym RB, Białoszewska A, Włodarczyk D, Baranowski W, Ząbek J, Korczak-Kowalska G, Malejczyk J. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2013;**28**:119–124.
- Pan Q, Chegini N. MicroRNA signature and regulatory functions in the endometrium during normal and disease states. *Semin Reprod Med* 2008;**26**:479–493.
- Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:797–806.
- Rahmioglu N, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT. Insights into assessing the genetics of endometriosis. *Curr Obstet Gynecol Rep* 2012;**1**:124–137.
- Ramón LA, Braza-Boils A, Gilabert-Estellés J, Gilabert J, España F, Chirivella M, Estellés A. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod* 2011;**26**:1082–1090.
- Ramón LA, Braza-Boils A, Gilabert J, España F, Chirivella M, Estellés A, Gilabert-Estellés J. microRNAs related to angiogenesis are dysregulated in endometrioid endometrial cancer. *Human Reprod* 2012;**27**:3036–3045.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;**200**:373–383.
- Rayner KJ, Hennessy EJ. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *J Lipid Res* 2013;**54**:1174–1181.
- Rocha AL, Reis FM, Taylor RN. Angiogenesis and endometriosis. *Obstet Gynecol Int* 2013;**2013**:859619.
- Salloum-Asfar S, Teruel-Montoya R, Arroyo AB, García-Barberá N, Chaudhry A, Schuetz E, Luengo-Gil G, Vicente V, González-Conejero R, Martínez C. Regulation of coagulation factor XI expression by microRNAs in the human liver. *PLoS One* 2014;**9**:e111713.
- Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 1927;**3**:93–110.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008;**41**:278–286.
- Toloubeydokhti T, Pan Q, Luo X, Bukulmez O, Chegini N. The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs. *Reprod Sci* 2008;**15**:993–1001.
- Wang S, Olson EN. AngiomiRs: key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2009;**19**:205–211.
- Yang L, Engeland CG, Cheng B. Social isolation impairs oral palatal wound healing in Sprague-Dawley rats: a role for miR-29 and miR-203 via VEGF suppression. *PLoS One* 2013;**8**:e72359.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015;**13**:17–24.

## MicroRNAs: New players in endometriosis

Josep Marí-Alexandre, **Moisés Barceló-Molina**, María Olcina-Guillem, Javier García-Oms, Aitana Braza-Boïls, Juan Gilabert-Estellés

Josep Marí-Alexandre, Moisés Barceló-Molina, María Olcina-Guillem, Aitana Braza-Boïls, Grupo de Hemostasia, Trombosis, Aterosclerosis y Biología Vascular, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, 46026 Valencia, Spain

Javier García-Oms, Juan Gilabert-Estellés, Área Materno-infantil, Hospital General Universitario, 46014 Valencia, Spain

Juan Gilabert-Estellés, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

**Author contributions:** Marí-Alexandre J, Barceló-Molina M, Olcina-Guillem M and Garcia-Oms J have performed the literature review and helped in the elaboration of the manuscript; Marí-Alexandre J, Braza-Boïls A and Gilabert-Estellés J have written and supervised the final version of the manuscript.

**Supported by** ISCIII and FEDER, Nos. PI011/00091, PI011/00566, PI14/01309, PI14/00253 and FI12/00012; RIC, Nos. RD12/0042/0029 and RD12/0042/0050; IIS La Fe 2011-211; Prometeo, No. 2011/027; and Sara Borrell Contract, No. CD13/0005.

**Conflict-of-interest statement:** Authors have no conflict of interest for this paper.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Correspondence to:** Juan Gilabert-Estellés, MD, PhD, Professor of Medicine, Chief of the Área Materno-infantil, Hospital General Universitario, Av. Tres Cruces 2, 46014 Valencia, Spain. [gilabert\\_juaest@gva.es](mailto:gilabert_juaest@gva.es)  
Telephone: +34-63-8064295  
Fax: +34-96-1972014

Received: July 29, 2015  
Peer-review started: August 6, 2015  
First decision: September 16, 2015

Revised: December 2, 2015

Accepted: January 5, 2016

Article in press: January 7, 2016

Published online: February 10, 2016

### Abstract

Endometriosis is an estrogen-dependent inflammatory disorder that limits the quality of life of affected women. This pathology affects 10% of reproductive-age women, although the prevalence in those patients experiencing pain, infertility or both is as high as 35%-50%. Endometriosis is characterized by endometrial-like tissue outside the uterus, primarily on the pelvic peritoneum, ovaries and the pouch of Douglas. Despite extensive research endeavours, a unifying theory regarding the exact etiopathogenic mechanism of this high prevalent and incapacitating condition is still lacking, although it has been suggested that epigenetics could be involved. MicroRNAs (miRNAs), one of the epigenetic players, are small non-coding RNAs that can act as post-transcriptional regulators of gene expression, reducing the expression of their target mRNAs either inhibiting its translation or promoting its degradation. miRNA expression profiles are specific of tissue and cell type. Abnormal miRNA expression has been described in different pathological conditions, such as a myriad of oncological, cardiovascular and inflammatory diseases and gynecological pathologies. In endometriosis, miRNA expression patterns of eutopic endometrium from patients and control women and from different endometriotic lesions have been described. These small non-coding molecules have become attractive candidates as novel biomarkers for an early non-invasive diagnosis of the disease, which could suppose a valuable benefit to the patients in terms of improvement of prognosis and reduction of the ratio of recurrence. In this systematic review we will focus on the role of miRNAs in the pathophysiology of endometriosis.

**Key words:** MicroRNAs; Endometriosis; Epigenetics;



## Angiogenesis; Biomarkers

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Endometriosis is an estrogen-dependent inflammatory disorder that limits the quality of life of affected women. Nowadays, a unifying theory regarding its exact etiopathogenic mechanism has not been achieved yet. Our objective is to review the current literature to better understand the role of microRNAs, one of the epigenetic players, in the pathophysiology of endometriosis and their potential as novel diagnostic biomarkers to guide therapeutic interventions in endometriosis.

Marí-Alexandre J, Barceló-Molina M, Olcina-Guillem M, García-Oms J, Braza-Boils A, Gilabert-Estellés J. MicroRNAs: New players in endometriosis. *World J Obstet Gynecol* 2016; 5(1): 28-38 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/2218-6220/full/v5/i1/28.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.5317/wjog.v5.i1.28>

## INTRODUCTION

Endometriosis is an estrogen-dependent inflammatory disorder that limits the quality of life of affected women<sup>[1-3]</sup>. This pathology affects 10% of reproductive-age women, although the prevalence in those patients experiencing pain, infertility or both is as high as 35%-50%<sup>[4]</sup>. The prevalence of this condition is estimated around 176 million worldwide, with an average diagnostic delay of 7 years<sup>[5]</sup>, being the mean age at diagnose 32.5-36.4 years, depending of the study population<sup>[5,6]</sup>.

Endometriosis is characterized by endometrial-like tissue outside the uterus, primarily on the pelvic peritoneum, ovaries and the pouch of Douglas. These extrauterine lesions are responsible for the main symptoms, pelvic pain and infertility<sup>[1]</sup>.

Despite extensive research endeavours, a unifying theory regarding the exact etiopathogenic mechanism of this high prevalent and incapacitating condition is still lacking. Several authors have reported a hormonal, immunity and a genetic base for this gynecological disorder. However, a growing body of evidence suggests that epigenetics could also be involved<sup>[7]</sup>, with an exponential increase of papers published on this issue in recent years.

Epigenetics refers to the study of mechanisms that control gene expression in a potentially heritable way without affecting DNA sequence. MicroRNAs (miRNAs), DNA methylation and modifications of the chromatin structure represent the different types of the known epigenetic modifications, exerting their regulatory effect additively<sup>[8]</sup>. In this review we will focus on the role of miRNAs in the pathophysiology of endometriosis.

MiRNAs are small (19-22nt) non-coding RNAs that can act as post-transcriptional regulators of gene expression, reducing the expression of their target mRNAs either inhibiting its translation or promoting its degradation. MiRNAs usually regulate gene expression by binding to the 3' UTR (Untranslated Region) of their target mRNA. Importantly, several miRNAs can target a given mRNA and a single miRNA can target several mRNA, increasing the complexity of the regulatory mechanism mediated by these molecules<sup>[9-13]</sup>. In malignancies, miRNAs can act as oncogenes or tumor suppressors, depending on their targets<sup>[14-16]</sup>. It is important to highlight that the miRNA expression profiles are specific of tissue and cell type<sup>[9]</sup>. To date, more than 1881 miRNA precursors, coding for more than 2500 mature miRNAs have been described in humans<sup>[17]</sup>.

MiRNAs were first described in 1993 by Lee *et al*<sup>[10]</sup> in the worm *Caenorhabditis elegans*. Since then, studies about biogenesis, functions, roles and characterisation of the mechanism of action of miRNAs have grown considerably and nowadays they are considered as excellent biomarkers of some diseases such as coronary artery disease<sup>[18-20]</sup>, cancer<sup>[21,22]</sup>, and several gynecological pathologies, including endometriosis<sup>[23,24]</sup>.

## PERITONEAL FACTORS AND ENDOMETRIOSIS

Endometriosis is a multifactorial disease in which endometrial and peritoneal factors such as those related to angiogenesis and proteolysis may be involved<sup>[25-27]</sup>. Peritoneal fluid (PF) is a complex suspension containing large amount of macrophages as well as endometrial and red blood cells, small molecules diffused from plasma through the mesothelial wall and other components dependent on ovarian contribution and local secretion such as steroid hormones and growth factors, respectively<sup>[28]</sup>. Because ectopic lesions located in the pelvic peritoneum are completely submerged in this fluid, their components have emerged as an important field of study<sup>[28-31]</sup>.

It is well documented that endometriosis is characterized by an important inflammatory process<sup>[32-34]</sup> with and increased production of reactive oxygen species (ROS)<sup>[35-37]</sup>. Berkes *et al*<sup>[38]</sup> and Santulli *et al*<sup>[39]</sup> have identified significantly increased levels of protein oxidative stress markers in the PF from women with deep infiltrating endometriosis when compared with endometriosis-free controls. On the other hand, NETosis describes the mechanisms by which activated neutrophils expel their entire chromatin, serving as catch and kill scaffold against microorganisms, a structure designated as neutrophil extracellular traps (NETs). Furthermore, it is known that ROS are the major activator of NETosis. The involvement of NETosis in endometriosis was studied Berkes *et al*<sup>[38]</sup>, who observed the presence of NET formation in virtually half of the patients with endometriosis, primarily in the

stage I and II group and rarely in controls, suggesting that NETosis is implicated in the initiation of the disease.

The contribution of immune system disorders to endometriosis has been proposed by several authors<sup>[2,40-42]</sup>. In this context, macrophage migration inhibitory factor (MIF) is arousing growing interest. MIF is a major pro-inflammatory factor found elevated in PF from women with endometriosis. Apart from its effect on activating and inhibiting macrophage mobility, it is also considered a critical upstream activator of innate immunity. MIF may be required for ectopic endometrial tissue growth and progression of endometriosis lesions *in vivo*<sup>[43]</sup>. Interestingly, miR-451 has been postulated to target MIF<sup>[44]</sup>. By using a murine model, Nothnick and coworkers<sup>[45]</sup> concluded that disruption of miR-451 expression in endometrial tissue impairs the ability of this tissue to establish ectopically. These authors also found elevated expression levels of miR-451 and diminished of MIF in ectopic endometriotic lesions (mainly peritoneal lesions) when compared with matched eutopic tissue. In addition, *in vitro* luciferase assays corroborated MIF as a target of miR-451 and forced expression of miR-451 reduced MIF and cell survival. Consequently, the aforementioned authors hypothesized that miR-451 over-expresses in ectopic lesions in an attempt to curtail endometriotic lesion/cell survival<sup>[46]</sup>.

## MIRNAS IN ENDOMETRIOSIS

Abnormal miRNA expression has been described in different gynecological pathologies, including malignancies<sup>[47-49]</sup>, benign conditions as leiomyoma<sup>[50]</sup>, adenomyosis<sup>[51]</sup>, and endometriosis<sup>[11,52-54]</sup>. Among gynecological tumors, ovarian cancer represents the second most prevalent and the most lethal malignancy in developed countries<sup>[55,56]</sup>, what could be explained by the difficulty of its diagnosis at early stages and the lack of effective treatments<sup>[49]</sup>. Recently reviewed by Davidson *et al*<sup>[57]</sup>, miRNAs could be an invaluable tool to overcome the above mentioned limitations, regarding their potential role in diagnosis and progression of ovarian carcinoma as well as prediction of response to chemotherapy. For instance, miRNAs of the miR-200 family, the miR-199/14 cluster and the let-7 paralogs have emerged as potential therapeutic targets in ovarian cancer<sup>[49]</sup>. In addition, Lee *et al*<sup>[58]</sup> found that higher expression of miR-181d, miR-30c, miR-30d, and miR-30e-3p was associated with significantly better disease-free or overall survival in this condition. These both miR-30 and miR-200 families have also been associated with endometrial cancer, the most frequent gynecological malignancy<sup>[56,59]</sup>. In a recent work, Kong *et al*<sup>[59]</sup> reported miR-30c to be a tumor suppressor *via* the miR-30c-MTA-1 signaling pathway, with a decreased expression of this miRNA in tumor cells.

Regarding endometriosis, miRNA expression patterns of eutopic endometrium from control women and pati-

ents<sup>[53,60]</sup> and ectopic lesions from patients have also been described<sup>[11,53,61]</sup>. Although endometriosis is a benign condition, it shares common mechanisms with tumors (*e.g.*, tissue invasion, inflammation, reduced apoptosis and aberrant angiogenesis)<sup>[55]</sup>. In this context, the relationship between endometriosis and ovarian cancer, specially endometrioid and clear cell ovarian carcinoma, has been long reviewed<sup>[62-66]</sup>, but recent literature on this issue points that existing data is not enough to establish a doubtless causality<sup>[55]</sup>.

Among the pioneering studies addressing the miRNA expression patterns in endometrial and endometriotic tissues was the work published by Burney *et al*<sup>[67]</sup>. Four endometrial samples from women with endometriosis and three from endometriosis-free women in the early secretory phase of the menstrual cycle were assessed for miRNA expression by means of microarray analysis. After real time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) validation, the authors reported a downregulation of four miRNAs (miR-34c-5p, miR-34b\*, miR-9 and miR-9\*) belonging to two miRNA families (miR-34 and miR-9, respectively) in the eutopic endometrium of women with endometriosis compared to endometrium from control women. Notably, members of the miR-34 family mediate the p53-dependent suppression of proliferation<sup>[68]</sup>.

Furthermore, Laudanski *et al*<sup>[60]</sup> conducted a study enrolling 25 endometriosis-free women and 21 patients with ovarian endometriosis in the proliferative phase in which the expression of 667 human miRNAs was examined. Validation of array results led to the corroboration that miR-483-5p, a regulator of IGF2, and miR-629-3p, involved in inflammation, were down-regulated in the eutopic endometrium of patients in comparison to controls. The authors pointed to the idea that dysregulation of these genes could contribute to the overgrowth of endometrial tissue outside the uterus.

Human endometrium is a unique tissue that undergoes complex molecular, cellular, and functional changes on a cyclic basis under ovarian hormone regulation<sup>[69,70]</sup>. These changes are essential for uterine receptivity and can be grouped in three distinct phases: Proliferative, secretory and menstrual<sup>[71]</sup>. Thus, some authors hypothesized that miRNA expression could vary across the menstrual cycle<sup>[11,72]</sup>. For instance, Kuokkanen *et al*<sup>[72]</sup> showed that miRNA expression profiles of human endometrial epithelium were under hormonal regulation and, therefore, varied across the physiological phases of the menstrual cycle. Particularly, miRNAs targeting several cell cycle regulators were over-expressed in the midsecretory phase. Conversely, others have identified no effect on menstrual cycle phase on endometrial miRNA expression<sup>[11,53]</sup>. These discrepancies could be explained by the cell-type specificity in the response to sex steroid hormones of the human endometrium<sup>[72]</sup> and the different type of cellular populations studied in each study.

Filigheddu *et al*<sup>[61]</sup> described a set of miRNAs dif-

ferentially expressed in ovarian endometriomas in comparison to paired eutopic endometrium. By means of microarray technology, 84 significant differently expressed miRNAs were identified. In addition, the use of bioinformatic tools allowed researchers to identify the predicted targets of these dysregulated miRNAs, as well as the molecular networks and the biological function they affected. Interestingly, one of the most significantly up-regulated miRNAs was found to be miR-202-3p. In a recent report<sup>[53]</sup>, our research group corroborated these results, with a 200-fold over-expression of miR-202-3p in ovarian endometriomas in comparison to paired eutopic endometrium. With regards to miR-202-3p, it has been reported<sup>[73]</sup> that this miRNA targets the glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) transcription factor, a strong positive activator of downstream target genes involved in proliferation, migration, invasion and angiogenesis, such as BCL-2, CD24, metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9<sup>[74]</sup>. GLI1 also regulates the transcription of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), which has been postulated as the main regulator of angiogenesis<sup>[74-77]</sup>. Thus, the over-expression of BCL-2 in the eutopic endometrium of patients with endometriosis<sup>[4,67]</sup> could be a consequence of the GLI1 regulation by miR-202-3p.

Using a Next Generation Sequencing approach, Hawkins *et al.*<sup>[78]</sup> found 10 miRNAs up-regulated (miR-100, -193a-3p, -193a-5p, -202, -29c, -485-3p, -509-3-5p, -574-3p, -708) and 12 miRNAs down-regulated (miR-10a, -34c-5p, -141, -200b, -200c, -200a, -203, -375, -429, -449b, -504, -873) in ovarian endometriomas in comparison to control endometrium, suggesting that miRNAs could also play a significant role in these ovarian lesions. Interestingly, one of the most dysregulated miRNAs in ovarian endometrioma was miR-29c, in agreement with our own data<sup>[53]</sup>.

Different miRNA profiles have been described in peritoneal lesions compared to paired eutopic endometrial tissues<sup>[11]</sup>. Through miRNA microarray analyses and *in silico* studies, the authors identified 22 differently expressed miRNAs that putatively regulated the expression of 673 differently expressed mRNA targets. Of them, 14 were up-regulated in peritoneal lesions (miR-1, -29c, -99a, -99b, -100, -125b, -125a, -126, -143, -145, -150, -194, -223, -365) and 8 were down-regulated (miR-20a, -34c, -142-3p, -141, -196b, -200a, -200b, -424) compared to paired eutopic endometrial tissue. Interestingly, the mRNAs targets of these miRNAs had been previously related to endometriosis-associated molecular pathways, including cell death, cell proliferation and angiogenesis<sup>[11]</sup>.

More recently, Saare *et al.*<sup>[79]</sup> identified five over-expressed miRNAs (miR-34c, -449a, -200a, -200b, -141) in peritoneal endometriotic lesions in comparison to eutopic endometria using a high-throughput miRNA sequencing approach. This set of miRNAs allowed the discrimination of peritoneal lesions from the healthy surrounding tissue. Finally, they concluded providing

a note for caution when evaluating peritoneal lesions, due that analyses carried out in biopsies also containing healthy surrounding tissues could mask aberrant miRNA expression intrinsic of peritoneal endometriotic tissues.

Although efforts have been made in the identification of the role of miRNAs in the pathogenesis of endometriosis, we are aware that future research will provide new regulatory functions for known miRNAs and that new identified miRNAs will expand our knowledge of this condition. Hence, several authors are focusing on the discovery of new miRNAs associated with human female reproductive tract disorders. For instance, Creighton *et al.*<sup>[80]</sup> performed a next generation sequencing of over 100 tissues or cell lines derived from human female reproductive organs in both healthy and pathological states. As a result, 7 confirmed and 51 highly confident predicted novel miRNAs were identified.

Even though the involvement of miRNAs in the pathophysiology of endometriosis requires further investigation, nowadays these small non-coding molecules are considered as putative biomarkers for an early non-invasive diagnosis of the disease, which could suppose a valuable benefit to the patients in terms of improvement of prognosis and reduction of the ratio of recurrence, as recently demonstrated in other miRNA regulated diseases<sup>[81-83]</sup>.

## ANGIOGENESIS-RELATED MIRNAS IN ENDOMETRIOSIS

The involvement of angiogenesis in the physiopathology of endometriosis has been long discussed, as the endometrial tissue migrated to the peritoneum requires a blood supply in order to survive, proliferate, invade the extracellular matrix and establish the endometriotic lesion<sup>[84]</sup>. VEGF represents one of the most potent angiogenic factors. Several studies have reported an increase in VEGF-A levels in endometriosis and it has been suggested that VEGF-A plays an important role in the progression of the disease<sup>[84,85]</sup>. Regarding angiogenesis inhibitors, alterations of thrombospondin-1 (TSP-1) expression has been reported to be involved in endometriosis, in which vascularisation is mandatory for the survival of migrated tissues<sup>[85]</sup>.

In previous publications, our research group has found and up-regulation of the expression of angiogenic and proteolytic factors in endometrial tissue from patients with endometriosis<sup>[85,86]</sup> and we have suggested that this increase might contribute to the invasive potential of endometrial cells.

The miRNA regulation of angiogenesis has been long reported in several pathologies, including endometriosis<sup>[12,53,54]</sup>. The miR-17-92 cluster, also known as oncomir-1, encodes six mature miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a and miR-92a)<sup>[87]</sup> and has been reported to play an important role in the tumor neovascularisation<sup>[27]</sup>. Two miRNAs encoded in this cluster, miR-17-5p and miR-20a, have been found

to be down-regulated in ovarian endometriotic cysts in comparison to eutopic endometrium<sup>[11,61]</sup>. As miR-17-5p targets TSP-1, a decrease of the miR-17-5p levels in ovarian cysts could repress the down-regulation of TSP-1 expression and provide an explanation for the clinically observed low invasion grade of these endometriotic lesions to the surrounding ovarian tissue.

Extracellular matrix remodelling is a crucial process in the regulation of angiogenesis<sup>[88]</sup> and plays a critically important role in the establishment of the endometriotic lesion<sup>[89]</sup>. mRNA levels of key components of the metallo-proteinase systems have been reportedly observed to be deregulated in eutopic and ectopic endometria of patients with endometriosis<sup>[85,86,89,90]</sup>. In a recently published paper<sup>[53]</sup>, we observed that miR-29c-3p was up-regulated in several endometriosis tissues (ovarian endometrioma, peritoneal lesions and rectovaginal nodule). Provided that miR-29c-3p regulates different genes of the extracellular matrix, our results are in agreement with previously published studies<sup>[11,78]</sup> accounting for the coordinated role of several miRNAs in the remodelling process necessary for the implantation of migrated endometria in ectopic locations and the establishment of endometriotic lesions.

Taking into consideration the importance of angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis, several therapies targeting VEGF as blockers or inhibitors have been proposed aiming to decrease the number of lesions, inhibit growth and reduce vascular density. In this context, soluble truncated VEGF receptors (Flt-1), antibodies to human VEGF and bevacizumab<sup>[91]</sup>, among others, have been tested in murine models of endometriosis. Although results from these studies are promising, it should be taken into account that the use of an animal model that neither menstruate nor develop spontaneous endometriosis is a major limitation. Furthermore, the use of molecules that might block the expression or mimic functions of angiogenesis-related miRNAs could represent new therapeutic approaches in the treatment of endometriosis as recently demonstrated in other miRNA-regulated diseases<sup>[92]</sup>.

## CLINICAL UTILITY OF MIRNAS AS BIOMARKERS OF ENDOMETRIOSIS

Despite the fact that endometriosis is one of the most common benign gynecological diseases, there is a lack of non-invasive or semi-invasive diagnostic test that overcomes the need for the current surgical diagnosis<sup>[53,67]</sup>. Laparoscopy with histological confirmation, the gold standard for diagnosis, is a minimally invasive procedure. However, patients usually undergo general anesthesia and a certain degree of expertise from clinicians is necessary and it is a costly procedure. Additional concerns are related to the delay in the diagnosis of the disease, which has been estimated of around 7 years<sup>[32,93]</sup>. This may be due to multiple reasons including non-specific symptoms of

the disease (pelvic pain and infertility), which leads to multiple tests for differential diagnosis<sup>[45]</sup>. As a consequence, patients are diagnosed at advanced stages of the disease, which impairs the prognosis and increases the risk of recurrence. For all these reasons, there is a great interest among researchers to find a non-invasive or semi-invasive test for the diagnosis of endometriosis that would ideally diagnose patients in initial steps of the disease and overcome the need for an invasive procedure.

Since they were first described to be present in blood<sup>[82]</sup>, circulating miRNAs have become interesting biomarkers in different conditions<sup>[16,23,24,94,95]</sup>. The presence of miRNAs in different biofluids, including blood<sup>[96]</sup>, could be explained by different mechanisms: (1) passive release of miRNAs from broken cells and tissues following tissue injury, chronic inflammation, cell apoptosis or necrosis, or from cells with a short half-life, such as platelets; (2) active secretion *via* cell-derived microvesicles (including exosomes and shedding vesicles); and (3) active secretion by cells as RNA-binding-protein conjugated complexes. Mechanisms (2) and (3) also offer an explanation for their highly elevated stability in plasma, despite the presence of elevated amounts of RNAses<sup>[97]</sup>. Although so far the biological functions of circulating miRNAs remain to be completely defined, some authors have proposed a role into cell-to-cell communication for these short nucleic acids<sup>[97-100]</sup>. In any case, it is clear that their presence in plasma/serum and the distinct advantages that they offer over other biomarkers (for instance and unlike mRNAs, miRNAs show high stability in blood, can be both amplified and detected with high sensitivity and specificity<sup>[101]</sup> and are highly resistant to storage handling<sup>[97,101]</sup>) offers an opportunity to use them as biomarkers.

In the field of gynecological pathologies, several authors have explored this possibility<sup>[94,102,103]</sup>. In ovarian cancer, miRNA expression profiles have been analyzed in whole blood and sera from patients, either as free-circulating miRNAs or encapsulated in exosomes. An example of the last is the study conducted by Taylor *et al*<sup>[95]</sup> in serum exosomes from patients with serous papillary adenocarcinoma of the ovary. Eight miRNAs (miR-21, -141, -200a, -200b, -200c, -203, -205, -214) were found to be up-regulated in tumor-derived exosomes compared with serum from benign ovarian disease patients. Interestingly, these 8 miRNAs showed a high correlation between their cellular and exosomal levels. In another study, published by Resnick and coworkers<sup>[104]</sup>, 8 miRNAs were found to be deregulated (miR-21, miR-29a, miR-92, miR-93 and miR-126 up-regulated and miR-99b, miR-127 and miR-155 down-regulated) in serum obtained from 19 patients with epithelial ovarian carcinoma (serous, clear cell, endometrioid and mucinous) in comparison to miRNAs analysed in sera from 11 controls. Interestingly, three out of the five up-regulated miRNAs (miR-21, miR-92

**Table 1** Current studies assessing the clinical utility of circulating miRNAs as biomarkers of endometriosis

Sample	Anticoagulant	Main results	Participants (patients/controls)	Ref.
Serum	-	↓ let-7b and miR-135 <sup>a</sup> let-7d and let-7f showed a tendency towards down-regulation <sup>a</sup>	n = 24/n = 24 <sup>b</sup>	[102]
Plasma	EDTA	↓ miR-17-5p, miR-20a and miR-22	n = 23/n = 23 <sup>c</sup>	[103]
Serum	-	↑ miR-122 and miR-199a ↓ miR-9*, miR-141*, miR-145* and miR-542-3p <sup>a</sup>	n = 60/n = 25 <sup>d</sup>	[106]
Plasma	EDTA	↓ miR-200a-3p, miR-200b-3p and miR-141-3p <sup>a</sup>	n = 61/n = 65 <sup>e</sup>	[110]

Down-regulated (↓) and (↑) up-regulated miRNAs in samples from patients in comparison to control women. <sup>a</sup>Combination of miRNAs in bold yielded the best diagnostic value; <sup>b</sup>Control group presented dermoid cysts (n = 10), serous cystadenoma (n = 5), mucinous cystadenoma (n = 3), simple ovarian cysts (n = 3) and paratubal cysts (n = 1); <sup>c</sup>Control group presented uterine leiomyoma (n = 14), mature teratoma (n = 4), simple cysts (n = 3) and unexplained infertility (n = 2); <sup>d</sup>Main diagnosis: Infertility due to tubal factors; <sup>e</sup>Thirty-five endometriosis-free women with primary (n = 10) or secondary (n = 15) infertility, suspicion of endometriosis (n = 5), polycystic ovaries (n = 3) and pelvic pain (n = 2) and 30 self-reported healthy women. EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

and miR-93) were overexpressed in 3 patients with normal CA-125 levels. This finding could be explained by the high sensitivity and accuracy of the RT-PCR quantification, suggesting that miRNAs could provide an advantage as biomarkers in terms of sensitivity in comparison to those in current clinical use.

Häusler *et al.*<sup>[105]</sup> analysed the miRNA expression profile in whole blood from 24 patients with epithelial carcinoma (mainly serous histotype) and from 15 healthy donors. As a result, the expression of miR-30c1\* was found to be up-regulated and the expression of miR-181a\*, miR-342-3p and miR-450b-5p down-regulated in patients in comparison to controls, enabling a discrimination between populations.

Regarding endometriosis, an interesting recent review from Fassbender *et al.*<sup>[23]</sup> pointed to the possibility of developing a semi-invasive test for endometriosis from PF obtained *via* transvaginal ultrasound-guided aspiration. Although this is an interesting approach, current research is mainly focused on developing serum/plasma biomarkers as a noninvasive diagnostic tool. Jia *et al.*<sup>[103]</sup> explored this possibility, conduct a study that enrolled 23 women with histologically proven endometriosis and 23 endometriosis-free controls. RNA from plasma was extracted to perform a miRNA microarray profiling. Three out of the six miRNAs selected for qRT-PCR (miR-17-5p, miR-20a and miR-22) were proven to be significantly down-regulated in patients and useful to discriminate women with endometriosis from patients. Wang *et al.*<sup>[106]</sup> performed a circulating miRNA profiling with a different approach. For miRNA profiling, 2 pools of sera from 10 endometriosis patients and 10 control women, respectively, were prepared. Results from array were validated by qRT-PCR in sera from 60 patients and 25 control women, finding that miR-199a and miR-122 levels were up-regulated and miR-145\*, miR-141\*, miR-542-3p and miR-9\* down-regulated in samples from patients in comparison to control women and could therefore serve as biomarkers of the disease. In a very recent study, Cho *et al.*<sup>[102]</sup> quantified the levels of miR-135a,b and let-7a-f in sera of 24 endometriosis patients and 24 disease-free women. The selection of these miRNAs was based on their previous association with endometriosis<sup>[107,108]</sup>. Employing a logistic regression

approach, researchers found that a combination of let-7b, let-7d and let-7f during the proliferative phase yielded the highest area under the curve value in discriminating patients with endometriosis from control women. Of note, several miRNAs were found to be differently expressed depending on the phase of the menstrual cycle in patients but not in controls, in agreement with previous reports<sup>[109]</sup>. Finally, Rekker *et al.*<sup>[110]</sup> performed the last published study regarding circulating miRNAs as biomarkers of endometriosis. Based on previous literature, authors selected 3 miRNAs from the miR-200 family (miR-200a-3p, miR-200b-3p and miR-141-3p) whose expression was assessed in plasma samples from 61 patients and 65 control women. The expression of all 3 miRNAs was down-regulated in patients and miR-200a-3p and miR-141-3p showed the highest potential as noninvasive biomarkers for this benign condition. Remarkably, authors also analyzed variations of the levels of the three miRNAs of interest with time of sampling (morning/evening) finding lower levels in evening samples, perhaps due to circadian fluctuations in their expression. This is an interesting approach and points to the time of sampling as an important factor to be taken into account when performing circulating miRNAs studies. All these studies on the role of circulating miRNAs as biomarkers of endometriosis are summarized in Table 1.

Importantly, it should be noted that the circulating miRNA pool is not a mirror of tissue miRNAs content<sup>[83,111]</sup> and that changes in tissue miRNA will not be reflected in the same extent in the circulating miRNA profile<sup>[101]</sup>. Therefore, the aforementioned differences in endometrial miRNA expression profiles found in endometriosis should be considered in the context of a semi-invasive diagnosis of endometriosis by means of endometrial biopsy, because of the low probability of finding such differences in serum or plasma from the same patients.

## CONCLUSION

MiRNAs, one of the epigenetic players, are small non-coding RNAs that can act as post-transcriptional regulators of gene expression reducing the expression of their target mRNA. The involvement of miRNAs in

different pathological conditions has been well established and miRNA expression profiles have been performed in biopsies from different conditions, including gynaecological pathologies as endometriosis. Despite being a benign gynaecological pathology, endometriosis deeply impairs the quality of life of affected women in terms of pain and infertility. The prevalence of endometriosis in reproductive-age women is estimated around 1 out of 10 and raises to 5 out of 10 in patients experiencing both pain and infertility. Research endeavours are being conducted in order to find a non-invasive or semi-invasive biomarker of the disease that ideally diagnosis the disease at initial stages and overcomes the need for the current laparoscopy gold standard diagnosis. In this area, circulating miRNAs have emerged as attractive molecules to be considered as biomarkers. Up to date, only few studies have been performed in order to obtain a circulating miRNA-based diagnostic tool. However, differences in experimental design among them make it difficult to compare results. From our point of view, there is a need for standardization of clinical data annotation, sample collection and handling among research projects that takes into account several aspects: (1) surgical and non-surgical data; (2) type of sample (serum/plasma) and processing protocols. In the case of plasma, the choice of anticoagulant is not a minor feature in experimental design and must be carefully addressed; (3) time of sampling is also an important factor and a decision has to be made between morning fasting samples or evening samples, as demonstrated by Rekker *et al.*<sup>[110]</sup>; and (4) number of participants in circulating miRNAs as biomarkers of endometriosis studies is scarce and usually control population is heterogeneous, including self-reported endometriosis-free women, patients with different benign gynaecological conditions and infertile women due to tubal factors. For all these reasons, we encourage researchers in the field to follow recommendations from the World Endometriosis Research Foundation<sup>[112-115]</sup> in order to solve the observed heterogeneity in experimental designs and improve reproducibility between studies. In addition, validation of experimental algorithms in different cohorts is needed so as to improve quality of research and reach the ultimate goal, benefit patients with an earlier diagnose of endometriosis and avoiding unnecessary assisted reproductive techniques in those women whose fertility is not affected by the disease. To achieve this ambitious objective, we do encourage researchers to collaborate and synergistically add efforts to be able to recruit larger cohorts of patients and endometriosis-free women for circulating miRNAs studies, adopt standardized protocols and improve research outcomes.

## REFERENCES

- 1 Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010; **362**: 2389-2398 [PMID: 20573927 DOI: 10.1056/NEJMc1000274]
- 2 Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; **364**: 1789-1799

- [PMID: 15541453 DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17403-5]
- 3 Tamaresis JS, Irwin JC, Goldfien GA, Rabban JT, Burney RO, Nezhat C, DePaolo LV, Giudice LC. Molecular classification of endometriosis and disease stage using high-dimensional genomic data. *Endocrinology* 2014; **155**: 4986-4999 [PMID: 25243856 DOI: 10.1210/en.2014-1490]
- 4 Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012; **98**: 511-519 [PMID: 22819144 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029]
- 5 Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, Jenkinson C, Kennedy SH, Zondervan KT. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril* 2011; **96**: 366-373.e8 [PMID: 21718982 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.090]
- 6 Fuldeore M, Yang H, Du EX, Soliman AM, Wu EQ, Winkel C. Healthcare utilization and costs in women diagnosed with endometriosis before and after diagnosis: a longitudinal analysis of claims databases. *Fertil Steril* 2015; **103**: 163-171 [PMID: 25455535 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.011]
- 7 Guo SW. Epigenetics of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009; **15**: 587-607 [PMID: 19651637 DOI: 10.1093/molehr/gap064]
- 8 Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; **28**: 1057-1068 [PMID: 20944598 DOI: 10.1038/nbt.1685]
- 9 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281-297 [PMID: 14744438 DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5]
- 10 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**: 843-854 [PMID: 8252621 DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y]
- 11 Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010; **16**: 142-165 [PMID: 19773286 DOI: 10.1093/humupd/dmp034]
- 12 Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2011; **55**: 79-86 [PMID: 21777698 DOI: 10.1016/j.vph.2011.06.006]
- 13 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; **425**: 415-419 [PMID: 14508493 DOI: 10.1038/nature01957]
- 14 Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma. *Histol Histopathol* 2013; **28**: 437-451 [PMID: 23224781 DOI: 10.14670/HH-28.437]
- 15 Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, Okamoto Y, Seki N. MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2013; **40**: 143-149 [PMID: 22831895 DOI: 10.1016/j.anl.2012.07.001]
- 16 Huang J, Zhang SY, Gao YM, Liu YF, Liu YB, Zhao ZG, Yang K. MicroRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Cell Prolif* 2014; **47**: 277-286 [PMID: 24909356 DOI: 10.1111/cpr.12109]
- 17 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: D68-D73 [PMID: 24275495 DOI: 10.1093/nar/gkt1181]
- 18 Zorio E, Medina P, Rueda J, Millán JM, Arnau MA, Beneyto M, Marín F, Gimeno JR, Osca J, Salvador A, España F, Estellés A. Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009; **7**: 82-90 [PMID: 19149547 DOI: 10.2174/187152509787047676]
- 19 Papageorgiou N, Tousoulis D, Charakida M, Briasoulis A, Androulakis E, Tentolouris C, Siasos G, Stefanadis C. Prognostic role of miRNAs in coronary artery disease. *Curr Top Med Chem* 2013; **13**: 1540-1547 [PMID: 23745806 DOI: 10.2174/1568026611

- 3139990103]
- 20 **Economou EK**, Oikonomou E, Siasos G, Papageorgiou N, Tsalamandris S, Mourouzis K, Papaioanou S, Tousoulis D. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis* 2015; **241**: 624-633 [PMID: 26117399 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.037]
  - 21 **Schwarzenbach H**, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; **11**: 145-156 [PMID: 24492836 DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.5]
  - 22 **Cheng G**. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; **81**: 75-93 [PMID: 25220354 DOI: 10.1016/j.addr.2014.09.001]
  - 23 **Fassbender A**, Vodolazkaia A, Saunders P, Lebovic D, Waelkens E, De Moor B, D'Hooghe T. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril* 2013; **99**: 1135-1145 [PMID: 23414923 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.097]
  - 24 **Fassbender A**, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 130854 [PMID: 26240814 DOI: 10.1155/2015/130854]
  - 25 **Kobayashi H**. Invasive capacity of heterotopic endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 2000; **50** Suppl 1: 26-32 [PMID: 11093058 DOI: 10.1159/000052875]
  - 26 **Cosin R**, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gómez-Lechón MJ, Gilabert J, Chirivella M, Braza-Boils A, España F, Estellés A. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010; **25**: 398-405 [PMID: 19945964]
  - 27 **Braza-Boils A**, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gilabert J, Marí-Alexandre J, Chirivella M, España F, Estellés A. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS One* 2013; **8**: e62370 [PMID: 23620826 DOI: 10.1371/journal.pone.0062370]
  - 28 **Koninckx PR**, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998; **4**: 741-751 [PMID: 10027629 DOI: 10.1093/humupd/4.5.741]
  - 29 **Mier-Cabrera J**, Jiménez-Zamudio L, García-Latorre E, Cruz-Orozco O, Hernández-Guerrero C. Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG* 2011; **118**: 6-16 [PMID: 21083865 DOI: 10.1111/j.1471-0528.2010.02777.x]
  - 30 **Na YJ**, Lee DH, Kim SC, Joo JK, Wang JW, Jin JO, Kwak JY, Lee KS. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of monocyte-specific chemokines by leukocytes. *Arch Gynecol Obstet* 2011; **283**: 1333-1341 [PMID: 20617440 DOI: 10.1007/s00404-010-1583-1]
  - 31 **Liu Y**, Hu J, Shen W, Wang J, Chen C, Han J, Zai D, Cai Z, Yu C. Peritoneal fluid of patients with endometriosis promotes proliferation of endometrial stromal cells and induces COX-2 expression. *Fertil Steril* 2011; **95**: 1836-1838 [PMID: 21145050 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.039]
  - 32 **Reis FM**, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2013; **19**: 406-418 [PMID: 23539633 DOI: 10.1093/humupd/dmt010]
  - 33 **Bulun SE**. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009; **360**: 268-279 [PMID: 19144942 DOI: 10.1056/NEJMr0804690]
  - 34 **Augoulea A**, Alexandrou A, Creatsa M, Vrachnis N, Lambrinouadaki I. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet* 2012; **286**: 99-103 [PMID: 22546953 DOI: 10.1007/s00404-012-2357-8]
  - 35 **Ngô C**, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 2009; **175**: 225-234 [PMID: 19498006 DOI: 10.2353/ajpath.2009.080804]
  - 36 **Agarwal A**, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; **10**: 49 [PMID: 22748101 DOI: 10.1186/1477-7827-10-49]
  - 37 **Polak G**, Wertel I, Barczyński B, Kwaśniewski W, Bednarek W, Kotarski J. Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; **168**: 187-190 [PMID: 23351670 DOI: 10.1016/j.ejogrb.2012.12.043]
  - 38 **Berkes E**, Oehmke F, Tinneberg HR, Preissner KT, Saffarzadeh M. Association of neutrophil extracellular traps with endometriosis-related chronic inflammation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; **183**: 193-200 [PMID: 25461378 DOI: 10.1016/j.ejogrb.2014.10.040]
  - 39 **Santulli P**, Chouzenoux S, Fiorese M, Marcellin L, Lemarechal H, Millischer AE, Batteux F, Borderie D, Chapron C. Protein oxidative stress markers in peritoneal fluids of women with deep infiltrating endometriosis are increased. *Hum Reprod* 2015; **30**: 49-60 [PMID: 25376454 DOI: 10.1093/humrep/deu290]
  - 40 **Vinatier D**, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; **2**: 371-384 [PMID: 15717437 DOI: 10.1093/humupd/2.5.371]
  - 41 **Sinaii N**, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK, Stratton P. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod* 2002; **17**: 2715-2724 [PMID: 12351553 DOI: 10.1093/humrep/17.10.2715]
  - 42 **Olovsson M**. Immunological aspects of endometriosis: an update. *Am J Reprod Immunol* 2011; **66** Suppl 1: 101-104 [PMID: 21726345 DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01045.x]
  - 43 **Rakhila H**, Girard K, Leboeuf M, Lemyre M, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor is involved in ectopic endometrial tissue growth and peritoneal-endometrial tissue interaction in vivo: a plausible link to endometriosis development. *PLoS One* 2014; **9**: e110434 [PMID: 25329068 DOI: 10.1371/journal.pone.0110434]
  - 44 **Bandres E**, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, Zarate R, Diaz-Gonzalez JA, Ramirez N, Sola JJ, Jimenez P, Rodriguez J, Garcia-Foncillas J. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2281-2290 [PMID: 19318487 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1818]
  - 45 **Nothnick WB**, Graham A, Holbert J, Weiss MJ. miR-451 deficiency is associated with altered endometrial fibrinogen alpha chain expression and reduced endometriotic implant establishment in an experimental mouse model. *PLoS One* 2014; **9**: e100336 [PMID: 24937656 DOI: 10.1371/journal.pone.0100336]
  - 46 **Graham A**, Falcone T, Nothnick WB. The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival. *Hum Reprod* 2015; **30**: 642-652 [PMID: 25637622 DOI: 10.1093/humrep/dev005]
  - 47 **Pedroza-Torres A**, López-Urrutia E, García-Castillo V, Jacobo-Herrera N, Herrera LA, Peralta-Zaragoza O, López-Camarillo C, De Leon DC, Fernández-Retana J, Cerna-Cortés JF, Pérez-Plasencia C. MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules* 2014; **19**: 6263-6281 [PMID: 24840898 DOI: 10.3390/molecules19056263]
  - 48 **Banno K**, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Nogami Y, Umene K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Kataoka F, Tomiyama E, Aoki D. Application of microRNA in diagnosis and treatment of ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 232817 [PMID: 24822185 DOI: 10.1155/2014/232817]
  - 49 **Kinose Y**, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 249393 [PMID: 25295252 DOI: 10.1155/2014/249393]
  - 50 **Karmon AE**, Cardozo ER, Rueda BR, Styer AK. MicroRNAs in the development and pathobiology of uterine leiomyomata: does evidence support future strategies for clinical intervention? *Hum Reprod Update* 2014; **20**: 670-687 [PMID: 24706045 DOI: 10.1093/humupd/dmu017]
  - 51 **Verit FF**, Yucel O. Endometriosis, leiomyoma and adenomyosis: the risk of gynecologic malignancy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**: 5589-5597 [PMID: 24289548]

- 52 **Nothnick WB**. The role of micro-RNAs in the female reproductive tract. *Reproduction* 2012; **143**: 559-576 [PMID: 22454533 DOI: 10.1530/REP-11-0240]
- 53 **Braza-Boïls A**, Marí-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, Gilabert-Estellés J. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum Reprod* 2014; **29**: 978-988 [PMID: 24608518 DOI: 10.1093/humrep/deu019]
- 54 **Braza-Boïls A**, Salloum-Asfar S, Marí-Alexandre J, Arroyo AB, González-Conejero R, Barceló-Molina M, García-Oms J, Vicente V, Estellés A, Gilabert-Estellés J, Martínez C. Peritoneal fluid modifies the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2015; **30**: 2292-2302 [PMID: 26307093 DOI: 10.1093/humrep/dev204]
- 55 **Guo SW**. Endometriosis and ovarian cancer: potential benefits and harms of screening and risk-reducing surgery. *Fertil Steril* 2015; **104**: 813-830 [PMID: 26335131 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.006]
- 56 **Siegel RL**, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**: 5-29 [PMID: 25559415 DOI: 10.3322/caac.21254]
- 57 **Davidson B**, Tropé CG, Reich R. The clinical and diagnostic role of microRNAs in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2014; **133**: 640-646 [PMID: 24713546 DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.03.575]
- 58 **Lee H**, Park CS, Deftereos G, Morihara J, Stern JE, Hawes SE, Swisher E, Kiviat NB, Feng Q. MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *World J Surg Oncol* 2012; **10**: 174 [PMID: 22925189 DOI: 10.1186/1477-7819-10-174]
- 59 **Kong X**, Xu X, Yan Y, Guo F, Li J, Hu Y, Zhou H, Xun Q. Estrogen regulates the tumour suppressor MiRNA-30c and its target gene, MTA-1, in endometrial cancer. *PLoS One* 2014; **9**: e90810 [PMID: 24595016 DOI: 10.1371/journal.pone.0090810]
- 60 **Laudanski P**, Charkiewicz R, Kuzmicki M, Szamatowicz J, Charkiewicz A, Niklinski J. MicroRNAs expression profiling of eutopic proliferative endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; **11**: 78 [PMID: 23945042 DOI: 10.1186/1477-7827-11-78]
- 61 **Filigheddu N**, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Patrignani C, Graziani A, Surico N. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**: 369549 [PMID: 20300586 DOI: 10.1155/2010/369549]
- 62 **Wei JJ**, William J, Bulun S. Endometriosis and ovarian cancer: a review of clinical, pathologic, and molecular aspects. *Int J Gynecol Pathol* 2011; **30**: 553-568 [PMID: 21979592 DOI: 10.1097/PGP.0b013e31821f4b85]
- 63 **Sayasneh A**, Tsivos D, Crawford R. Endometriosis and ovarian cancer: a systematic review. *ISRN Obstet Gynecol* 2011; **2011**: 140310 [PMID: 21789283 DOI: 10.5402/2011/140310]
- 64 **Munksgaard PS**, Blaakaer J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol* 2012; **124**: 164-169 [PMID: 22032835 DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.10.001]
- 65 **Worley MJ**, Welch WR, Berkowitz RS, Ng SW. Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 5367-5379 [PMID: 23466883 DOI: 10.3390/ijms14035367]
- 66 **Siufi Neto J**, Kho RM, Siufi DF, Baracat EC, Anderson KS, Abrão MS. Cellular, histologic, and molecular changes associated with endometriosis and ovarian cancer. *J Minim Invasive Gynecol* 2014; **21**: 55-63 [PMID: 23962574 DOI: 10.1016/j.jmig.2013.07.021]
- 67 **Burney RO**, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhad CN, Lessey BA, Giudice LC. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009; **15**: 625-631 [PMID: 19692421 DOI: 10.1093/molehr/gap068]
- 68 **Corney DC**, Hwang CI, Matoso A, Vogt M, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Kamat AA, Sood AK, Ellenson LH, Hermeking H, Nikitin AY. Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 1119-1128 [PMID: 20145172 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2642]
- 69 **Houshdaran S**, Zelenko Z, Irwin JC, Giudice LC. Human endometrial DNA methylome is cycle-dependent and is associated with gene expression regulation. *Mol Endocrinol* 2014; **28**: 1118-1135 [PMID: 24877562 DOI: 10.1210/me.2013-1340]
- 70 **Munro SK**, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2010; **16**: 297-310 [PMID: 20139117 DOI: 10.1093/molehr/gaq010]
- 71 **Harada T**, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004; **10**: 29-38 [PMID: 15005462 DOI: 10.1093/humupd/dmh007]
- 72 **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 [PMID: 19864316 DOI: 10.1095/biolreprod.109.081059]
- 73 **Zhao Y**, Li C, Wang M, Su L, Qu Y, Li J, Yu B, Yan M, Yu Y, Liu B, Zhu Z. Decrease of miR-202-3p expression, a novel tumor suppressor, in gastric cancer. *PLoS One* 2013; **8**: e69756 [PMID: 23936094 DOI: 10.1371/journal.pone.0069756]
- 74 **Carpenter RL**, Lo HW. Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer. *Discov Med* 2012; **13**: 105-113 [PMID: 22369969]
- 75 **Shibuya M**. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008; **41**: 278-286 [PMID: 18452647 DOI: 10.5483/BMBRep.2008.41.4.278]
- 76 **Cao X**, Geradts J, Dewhirst MW, Lo HW. Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. *Oncogene* 2012; **31**: 104-115 [PMID: 21666711 DOI: 10.1038/onc.2011.219]
- 77 **Santoni M**, Burattini L, Nabissi M, Morelli MB, Berardi R, Santoni G, Cascinu S. Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr Protein Pept Sci* 2013; **14**: 133-140 [PMID: 23544423 DOI: 10.2174/1389203711314020005]
- 78 **Hawkins SM**, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, Matzuk MM. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol* 2011; **25**: 821-832 [PMID: 21436257 DOI: 10.1210/me.2010-0371]
- 79 **Saare M**, Rekker K, Laisk-Podar T, Sõritsa D, Roost AM, Simm J, Velthut-Meikas A, Samuel K, Metsalu T, Karro H, Sõritsa A, Salumets A, Peters M. High-throughput sequencing approach uncovers the miRNome of peritoneal endometriotic lesions and adjacent healthy tissues. *PLoS One* 2014; **9**: e112630 [PMID: 25386850 DOI: 10.1371/journal.pone.0112630]
- 80 **Creighton CJ**, Benham AL, Zhu H, Khan MF, Reid JG, Nagaraja AK, Fountain MD, Dziadek O, Han D, Ma L, Kim J, Hawkins SM, Anderson ML, Matzuk MM, Gunaratne PH. Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One* 2010; **5**: e9637 [PMID: 20224791 DOI: 10.1371/journal.pone.0009637]
- 81 **Ng EK**, Wong CL, Ma ES, Kwong A. MicroRNAs as New Players for Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets in Breast Cancer. *J Oncol* 2009; **2009**: 305420 [PMID: 19644558 DOI: 10.1155/2009/305420]
- 82 **Mitchell PS**, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 10513-10518 [PMID: 18663219 DOI: 10.1073/pnas.0804549105]
- 83 **Pigati L**, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 2010; **5**: e13515 [PMID: 20976003 DOI: 10.1371/journal.pone.0013515]
- 84 **Laschke MW**, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007; **13**: 331-342 [PMID:



- 17347159 DOI: 10.1093/humupd/dmm006]
- 85 **Gilbert-Estellés J**, Ramón LA, España F, Gilbert J, Vila V, Réganon E, Castelló R, Chirivella M, Estellés A. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod* 2007; **22**: 2120-2127 [PMID: 17609243 DOI: 10.1093/humrep/dem149]
  - 86 **Gilbert-Estellés J**, Estellés A, Gilbert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; **18**: 1516-1522 [PMID: 12832381 DOI: 10.1093/humrep/deg300]
  - 87 **Doebel C**, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* 2010; **115**: 4944-4950 [PMID: 20299512 DOI: 10.1182/blood-2010-01-264812]
  - 88 **Neve A**, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 756078 [PMID: 24949467 DOI: 10.1155/2014/756078]
  - 89 **Ramón L**, Gilbert-Estellés J, Castelló R, Gilbert J, España F, Romeu A, Chirivella M, Aznar J, Estellés A. mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Hum Reprod* 2005; **20**: 272-278 [PMID: 15579491 DOI: 10.1093/humrep/deh571]
  - 90 **Klemmt PA**, Carver JG, Koninckx P, McVeigh EJ, Mardon HJ. Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum Reprod* 2007; **22**: 3139-3147 [PMID: 17921481 DOI: 10.1093/humrep/dem262]
  - 91 **Rocha AL**, Reis FM, Taylor RN. Angiogenesis and endometriosis. *Obstet Gynecol Int* 2013; **2013**: 859619 [PMID: 23766765 DOI: 10.1155/2013/859619]
  - 92 **Chen Y**, Gao DY, Huang L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; **81**: 128-141 [PMID: 24859533 DOI: 10.1016/j.addr.2014.05.009]
  - 93 **Husby GK**, Haugen RS, Moen MH. Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; **82**: 649-653 [PMID: 12790847 DOI: 10.1034/j.1600-0412.2003.00168.x]
  - 94 **Suryawanshi S**, Vlad AM, Lin HM, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, Lin Y, Donnellan N, Klein-Patel M, Lee T, Mansuria S, Elishaev E, Budiu R, Edwards RP, Huang X. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 1213-1224 [PMID: 23362326 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2726]
  - 95 **Taylor DD**, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; **110**: 13-21 [PMID: 18589210 DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033]
  - 96 **Weber JA**, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; **56**: 1733-1741 [PMID: 20847327 DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405]
  - 97 **Shah MY**, Calin GA. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. *Nucleic Acid Ther* 2013; **23**: 2-8 [PMID: 23051203 DOI: 10.1089/nat.2012.0375]
  - 98 **Kosaka N**, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet* 2013; **4**: 173 [PMID: 24046777 DOI: 10.3389/fgene.2013.00173]
  - 99 **Xu L**, Yang BF, Ai J. MicroRNA transport: a new way in cell communication. *J Cell Physiol* 2013; **228**: 1713-1719 [PMID: 23460497 DOI: 10.1002/jcp.24344]
  - 100 **Wahlgren J**, De L Karlson T, Brisslert M, Vaziri Sani F, Telemo E, Sunnerhagen P, Valadi H. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: e130 [PMID: 22618874 DOI: 10.1093/nar/gks463]
  - 101 **Mayr M**, Zampetaki A, Willeit P, Willeit J, Kiechl S. MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 206-214 [PMID: 23325478 DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300141]
  - 102 **Cho S**, Mutlu L, Grechukhina O, Taylor HS. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertil Steril* 2015; **103**: 1252-1260.e1 [PMID: 25772772 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.013]
  - 103 **Jia SZ**, Yang Y, Lang J, Sun P, Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2013; **28**: 322-330 [PMID: 23203215 DOI: 10.1093/humrep/des413]
  - 104 **Resnick KE**, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; **112**: 55-59 [PMID: 18954897 DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.08.036]
  - 105 **Häusler SF**, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, Krockenberger M, Engel JB, Hönig A, Scheffler M, Dietl J, Wischhusen J. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer* 2010; **103**: 693-700 [PMID: 20683447 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605833]
  - 106 **Wang WT**, Zhao YN, Han BW, Hong SJ, Chen YQ. Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: 281-289 [PMID: 23118427 DOI: 10.1210/jc.2012-2415]
  - 107 **Grechukhina O**, Petracco R, Popkhadze S, Massasa E, Paranjape T, Chan E, Flores I, Weidhaas JB, Taylor HS. A polymorphism in a let-7 microRNA binding site of KRAS in women with endometriosis. *EMBO Mol Med* 2012; **4**: 206-217 [PMID: 22307873 DOI: 10.1002/emmm.201100200]
  - 108 **Petracco R**, Grechukhina O, Popkhadze S, Massasa E, Zhou Y, Taylor HS. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: E1925-E1933 [PMID: 21956427 DOI: 10.1210/jc.2011-1231]
  - 109 **Rekker K**, Saare M, Roost AM, Salumets A, Peters M. Circulating microRNA Profile throughout the menstrual cycle. *PLoS One* 2013; **8**: e81166 [PMID: 24244734 DOI: 10.1371/journal.pone.0081166]
  - 110 **Rekker K**, Saare M, Roost AM, Kaart T, Sõritsa D, Karro H, Sõritsa A, Simón C, Salumets A, Peters M. Circulating miR-200-family microRNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertil Steril* 2015; **104**: 938-946.e2 [PMID: 26206343 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.029]
  - 111 **Valadi H**, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvalld JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 654-659 [PMID: 17486113 DOI: 10.1038/ncb1596]
  - 112 **Becker CM**, Laufer MR, Stratton P, Hummelshoj L, Missmer SA, Zondervan KT, Adamson GD. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil Steril* 2014; **102**: 1213-1222 [PMID: 25150390 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.709]
  - 113 **Vitonis AF**, Vincent K, Rahmioglu N, Fassbender A, Buck Louis GM, Hummelshoj L, Giudice LC, Stratton P, Adamson GD, Becker CM, Zondervan KT, Missmer SA. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: II. Clinical and covariate phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil Steril* 2014; **102**: 1223-1232 [PMID: 25256930 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1244]
  - 114 **Rahmioglu N**, Fassbender A, Vitonis AF, Tworoger SS, Hummelshoj L, D'Hooghe TM, Adamson GD, Giudice LC, Becker CM, Zondervan KT, Missmer SA. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: III. Fluid biospecimen collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil Steril* 2014; **102**: 1233-1243 [PMID:

25256929 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1208]

- 115 **Fassbender A**, Rahmioglu N, Vitonis AF, Viganò P, Giudice LC, D'Hooghe TM, Hummelshoj L, Adamson GD, Becker CM, Missmer SA, Zondervan KT. World Endometriosis Research Foundation

Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: IV. Tissue collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil Steril* 2014; **102**: 1244-1253 [PMID: 25256928 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1209]

**P- Reviewer:** Liang H, Lynn Stewart S, Rovas L, Sun J  
**S- Editor:** Kong JX **L- Editor:** A **E- Editor:** Wu HL





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**

8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-223-8242

Fax: +1-925-223-8243

E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx>

<http://www.wjgnet.com>





## microRNAs and angiogenesis in endometriosis

Josep Marí-Alexandre<sup>a</sup>, Javier García-Oms<sup>b</sup>, **Moisés Barceló-Molina<sup>a</sup>**, Juan Gilabert-Aguilar<sup>c</sup>, Amparo Estellés<sup>a</sup>, Aitana Braza-Boils<sup>a</sup>, Juan Gilabert-Estellés<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Area Materno-infantil, Hospital General Universitario, Valencia, Spain

<sup>c</sup>Hospital Casa de Salud, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

microRNA

Angiogenesis

Endometriosis

New therapeutic strategies

### ABSTRACT

miRNAs function as important regulators of a wide range of cellular processes, such as angiogenesis and fibrinolysis, by posttranscriptional modulation of gene expression. We present a review on the role of miRNAs and angiogenesis in endometriosis.

Endometriosis, defined as the implantation of endometrial tissue outside the uterine cavity, is one of the most frequent benign gynecological diseases and it has important consequences on the quality of life and fertility of patients. Similarly to tumor metastasis, the ectopic endometrium acquires the capability to adhere, proliferate and infiltrate the extracellular matrix. Endometriosis is a multifactorial and polygenic disease in which angiogenesis and proteolysis may be involved, and emerging data provide evidence that a dysregulation of miRNA expression may be implicated in these processes. The detection of circulating miRNAs in plasma and other body fluids and their relative stability has raised the possibility that they might serve as non-invasive biomarkers for the diagnosis of the disease. On the other hand, the development of therapies that might block the expression or mimic the functions of miRNAs could represent new therapeutic strategies for the treatment of endometriosis.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### microRNAs

microRNAs (miRNAs) are small 21–22 nucleotide non-coding RNAs that regulate gene expression and play a key role in a wide range of biological processes. These small molecules bind to the 3' untranslated regions (3'-UTR) of their target mRNAs, mediating translational repression and/or mRNA degradation [1,2].

Although miRNAs were first discovered in 1993, it has been more recently when research endeavors have suggested and reinforced their role as important regulators of gene expression in most cellular processes and a broad spectrum of diseases [3,4].

Several conditions of miRNAs provide them the capability to act as ideal biomarkers to assess the presence or prognosis of several gynecological diseases. miRNAs lack of known post-processing modifications, have low complexity and are present at diverse body fluids [5]. miRNAs can be analyzed not only in biological fluids (plasma, serum, peritoneal fluid, etc) but also in fresh frozen tissues and in formalin-fixed paraffin-embedded tissues due to their stability in adverse conditions.

Abnormal miRNA expression profiles are associated with several human diseases, including cancer, cardiovascular disorders and benign or malignant disorders of the human female reproductive

tract [4,6–8]. The altered miRNA expression pattern in women with endometriosis may promote ovarian cancer development by enhancing or inactivating different oncogenic and tumor suppressor target genes [9]. Thus, this miRNA dysregulation could give the rationale for the observed two-fold increased risk for ovarian cancer reported in this population [10,11]. Therefore, unraveling the role of miRNAs in gynecological diseases, such as ovarian and endometrial cancer, might provide important tools to ascertain the potential of malignant transformation in endometriosis.

### microRNAs and angiogenesis in endometriosis

Endometriosis is defined by the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity affecting up to half of the patients with pain and infertility and resulting in important impairment of their quality of life. To establish the endometriotic lesion, the ectopic endometrium has to survive outside the uterus, avoid the immunity mechanisms and, mimicking tumor metastases, attach to the peritoneum or other locations, infiltrate the extracellular matrix and create a vessel network through activation of angiogenesis [12]. Endometriosis includes a wide range of lesions at different locations and three different entities can be differentiated: endometriotic implants on the surface of the peritoneum (peritoneal endometriosis), ovarian cysts lined by endometrioid glands (ovarian endometriomas), and fibrotic masses comprising endometriotic, adipose and fibromuscular tissues, usually located

\* Corresponding author: Juan Gilabert-Estellés, Hospital General Universitario, Av. Tres Cruces 2, 46014 Valencia, Spain.

E-mail address: [juangilaeste@yahoo.es](mailto:juangilaeste@yahoo.es) (J. Gilabert-Estellés).

between the rectum and the vagina (rectovaginal endometriotic nodule). Moreover, peritoneal implants can be divided in active or red lesions (highly vascularized) and inactive or black lesions (more fibrotic). Although it remains uncertain whether these three types are variants of the same pathologic process or caused by different mechanisms [13], anyhow it seems clear, that their specific clinical features warrant an individualized analysis of their biological behavior.

Endometriosis is a benign disease that behaves in several aspects such as cancer. For instance, endometriotic tissue metastasizes outside the uterine cavity and infiltrates the surrounding tissue progressing along the time if no therapy is adopted. This disease is classified as a tumor-like entity by the World Health Organization Histologic Classification of Ovarian Tumors [14]. In 1925, Sampson was the first to report a case of a suspected malignant transformation in endometriosis [15]. Since then, several studies have focused on the relationship between endometriosis and gynecological cancers, especially ovarian cancer [16].

Endometriosis has been described as a multifactorial and polygenic disease and emerging data provide evidence that dysregulation of miRNA expression may be involved [17–23]. miRNAs appear to be potent regulators of gene expression in endometriosis, raising the prospect of using miRNAs as biomarkers and therapeutic tools of the disease [24].

It has been reported that angiogenesis may play an important role in the pathogenesis of endometriosis. Similarly to tumor metastases, endometriotic implants require neovascularization to proliferate, invade the extracellular matrix and establish an endometriotic lesion [12]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) represents one of the most potent angiogenic factors. Several studies have reported an increase in VEGF-A levels in endometriosis and it has been suggested that VEGF plays an important role in the progression of the disease [8,19]. Thrombospondin-1 (TSP-1) is an inhibitor of angiogenesis and it has been reported that alterations in TSP-1 expression may be involved in many pathologies of the reproductive tract, including endometriosis, in which vessel formation occurs [8].

We have previously reported an increase in the expression of angiogenic and proteolytic factors in endometrial tissue from patients with endometriosis [17–20] and we have suggested that this increase might contribute to the invasive potential of endometrial cells.

The miRNA expression profiles of eutopic and ectopic endometrium (peritoneal and ovarian endometrioma) from women with endometriosis have been recently described [24]. Two independent studies reported that miR-17-5p and miR-20a, involved in angiogenesis regulation, are down-regulated in the ovarian endometrioma in comparison to eutopic endometrium [25,26]. The miR-17-92 cluster, also known as oncomir-1, encodes six mature miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a and miR-92a) [27]. It has been reported that the miR-17-92 cluster increases tumor neovascularization by down-regulating TSP-1 expression [28]. Therefore, a decrease in miR-17-5p levels could in turn post-transcriptionally up-regulate TSP-1 expression. In keeping with some previously mentioned authors, this mechanism may reduce the angiogenic activity of the ectopic endometrium in the ovarian endometrioma, thus helping to explain the low invasiveness of this tissue and also the frequent clinical finding of a preserved ovarian tissue surrounding the ovarian endometriotic cyst.

Our group has confirmed these findings in recent studies [8,29] in which the miRNA expression profiles of eutopic endometrium from women without endometriosis as well as of paired eutopic and ovarian endometrioma from patients were obtained. In addition, we have showed a significant increase in miR-125a, miR-222 and miR-202-3p levels and a decrease in VEGF-A protein levels in ovarian endometrioma in comparison to eutopic endometrium.

Furthermore, miR-202-3p expression was significantly lower in eutopic endometrium samples. It has been reported [30] that miR-202-3p down-regulates the expression of the proteinglioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1), a transcription factor that, in turn, regulates the transcription of both Bcl-2 and VEGF-A [30–33]. Accordingly, dysregulation of miR-202-3p could be, at least in part, responsible for the increased VEGF-A levels in eutopic endometrium from patients and reduced VEGF-A levels observed in ovarian endometrioma. On the other hand, the overexpression of Bcl-2 found in the eutopic endometrium of women with endometriosis [34,35] could be modulated by miR-202-3p by regulating the expression of the GLI1 transcription factor. These findings suggest that dysregulation of miRNA during endometriosis might play a pivotal role establishing endometriotic lesions by affecting different physiological processes.

Endometriosis is a multifactorial disease in which endometrial and peritoneal factors could be involved. Peritoneal fluid from patients with endometriosis is a complex suspension carrying inflammatory cytokines, growth factors, steroid hormones, proangiogenic factors, macrophages, and endometrial and red blood cells. Several years ago, our group described increased VEGF-A levels in this body fluid from patients [19,23], which could be correlated with the stage of the disease. Moreover, results from our group indicate that the peritoneal fluid from patients reduces the expression of VEGFA-related miRNAs miR-16, miR-17-5p, miR-20a and miR-125a in primary stromal cell cultures from affected women. Together with the parallel increase observed in VEGF-A these findings suggest that peritoneal fluid from patients influences endometriotic cell survival through the dysregulation of angiogenesis-related miRNAs [28]. Therefore, the angiogenic potential of both the endometrium and the peritoneal environment found in endometriosis patients could promote lesion establishment and survival.

Extracellular matrix proteins remodelling also plays a critically important role in the establishment of the endometriotic lesion. An abnormal expression of different components of the metalloproteinase systems both in the endometrium and in the endometriotic tissue of women affected with the disease has been reported [20]. Thus, miR-29c is up-regulated in the endometriotic tissue and its role targeting different extracellular matrix genes supports a potential role of the miRNAs network in the remodelling process that leads to implantation of endometrial tissue outside the uterus and to the formation of early endometriotic lesions [26].

Several therapies targeting VEGF as blockers or inhibitors have been proposed aiming to decrease the number of lesions, inhibit growth and reduce vascular density. In this context, soluble truncated VEGF receptors (Flt-1), antibodies to human VEGF and bevacizumab [36], among others, have been tested in murine models of endometriosis. Although results from these studies are promising, it should be taken into account that the use of an animal model that neither menstruate nor develop spontaneous endometriosis is a major limitation. Furthermore, the use of molecules that might block the expression or mimic functions of angiogenesis-related miRNAs could represent new approaches to guide therapeutic interventions in endometriosis, as recently demonstrated in other miRNA-regulated diseases [28].

### Future perspectives

Despite its high prevalence, endometriosis is associated with a delayed diagnosis of several years, perhaps because the gold standard for diagnosis is surgical assessment by laparoscopy or laparotomy. miRNAs have been proposed as biomarkers for several diseases including endometriosis, endometrial and ovarian cancer. In this context, the evaluation of miRNAs in minimally invasive samples as menstrual blood or plasma could represent a useful tool for an early diagnosis and an improved management of

this condition. In addition, miRNAs could be a useful tool for the treatment of these diseases or they could be implicated in pharmacological treatment responses. Moreover, the development of therapies that modulate miRNA expression, either blocking or mimicking the miRNA activity could represent new therapeutic strategies for any of the aforementioned gynecological disorders.

### Acknowledgements

This work was supported by research grants from the PN de I+D+I of the Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria and FEDER (PI11/00091, PI14/01309, FI12/00012, “Sara Borrell” CD13/005) RIC RD12/0042/0029, Generalitat Valenciana (PROMETEO/2011/027 and AP-141/11), and Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe.

### Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### References

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33.
- [2] Guo H, Ingolia NT, Jonathan S, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835–40.
- [3] Zorio E, Medina P, Rueda J, et al. Insights of the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signaling to therapeutic targets. *Cardiovas Hematol Agent Med Chem* 2009;7:82–90.
- [4] Gilabert-Estellés J, Braza-Boils A, Ramón LA, et al. Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem* 2012;19:2406–13.
- [5] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733–41.
- [6] Pan Q, Chegini N. MicroRNA signature and regulatory functions in the endometrium during normal and disease states. *Semin Reprod Med* 2008;26:479–93.
- [7] Creighton CJ, Benham AL, Zhu H, et al. Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One* 2010;5:e9637.
- [8] Ramón LA, Braza-Boils A, Gilabert-Estellés J, et al. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum. Reprod* 2011;26:1082–90.
- [9] Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, Lin Y, Donnellan N, Klein-Patel M, Lee T, Mansuria S, Elishaev E, Budi R, Edwards RP, Huang X. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:1213–24.
- [10] Melin A, Sparen P, Persson I, et al. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod* 2006;21:1237–52.
- [11] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789–99.
- [12] Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007;13:331–42.
- [13] Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fert Steril* 1997;68:585–96.
- [14] Scully RE. Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect* 1987;73:15–25.
- [15] Sampson J. Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ. *Arch Surg* 1925;10:1–72.
- [16] Munksgaard PS, Blaakaer J. The association between endometriosis and gynecological cancers and breast cancer: a review of epidemiological data. *Gynecol Oncol* 2011;123:157–63.
- [17] Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:1516–22.
- [18] Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, et al. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. In: *Tissue Remodeling Factors in the Physiology and Pathophysiology of the Female Reproductive Tract*. Front Biosci 2005;10:1162–76.
- [19] Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: its relation to fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems. *Hum Reprod* 2007;22:2120–7.
- [20] Ramón L, Gilabert-Estellés J, Castelló R, et al. mRNA quantitative analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using real-time reverse transcription-PCR assay. *Hum Reprod* 2005;20:272–8.
- [21] Guo SW. Epigenetics of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;15:587–607.
- [22] Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms (–460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. *Fertil Steril* 2009;92:1214–20.
- [23] Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010;25:398–405.
- [24] Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, et al. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol* 2011;25:821–32.
- [25] Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010,1–29.
- [26] Ohlsson-Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010;16:146–65.
- [27] Doebele C, Bonauer A, Fischer A, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* 2010;115:4944–50.
- [28] Braza-Boils A, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gilabert J, Marí-Alexandre J, Chirivella M, España F, Estellés A. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in stromal cell cultures of eutopic endometria and ovarian endometriomas from women with endometriosis. *Plos One* 2013;8:e62370, 1–10.
- [29] Braza-Boils A, Marí-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, Gilabert-Estellés J. microRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum Reprod* 2014;29:978–88.
- [30] Zhao Y, Li C, Wang M, Su L, Qu Y, Li J, Yu B, Yan M, Yu Y, Liu B, et al. Decrease of miR-202-3p expression, a novel tumor suppressor, in gastric cancer. *PLoS One* 2013;8:e69756.
- [31] Carpenter RL, Lo HW. Hedgehog pathway and GLI isoforms in human cancer. *Discov Med* 2012;13:105–13.
- [32] Cao X, Geradts J, Dewhirst MW, Lo HW. Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. *Oncogene* 2012;31:104–15.
- [33] Santoni M, Burattini L, Nabissi M, Morelli MB, Berardi R, Santoni G, Cascinu S. Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr Protein Pept Sci* 2013;14:133–40.
- [34] Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;15:625–31.
- [35] Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98:511–9.
- [36] Rocha AL, Reis FM, Taylor RN. Angiogenesis and endometriosis. *Obstet Gynecol Int* 2013;2013:859619.

## ORIGINAL ARTICLE

## Deregulated hepatic microRNAs underlie the association between non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease

Aitana Braza-Boils<sup>1,\*</sup>, Josep Marí-Alexandre<sup>1,\*</sup>, Pilar Molina<sup>2</sup>, Miguel A. Arnau<sup>3</sup>, Moisés Barceló-Molina<sup>1</sup>, Diana Domingo<sup>3</sup>, Javier Girbes<sup>4</sup>, Juan Giner<sup>2</sup>, Luis Martínez-Dolz<sup>3</sup> and Esther Zorio<sup>3</sup>

1 Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

2 Servicio de Patología, Instituto de Medicina Legal, Valencia, Spain

3 Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

4 Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, Spain

DOI: 10.1111/liv.13097

### Abstract

**Background & Aims:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) appears to be a new risk factor for the development of coronary artery disease (CAD). Members of a class of non-coding RNAs, termed microRNAs (miRNAs), have been identified as post-transcriptional regulators of cholesterol homeostasis and can contribute to the development of NAFLD. The aims of this study were to (i) to assess the relationship between NAFLD and sudden cardiac death (SCD) from severe CAD in forensic autopsies and (ii) to quantify several hepatic miRNAs previously associated with lipid metabolism and NAFLD to correlate their expression with the presence of NAFLD, CAD, obesity parameters and *postmortem* lipid profile. **Methods:** A total of 133 cases of autopsies with SCD and established CAD (patient group, CAD-SCD) and 106 cases of non-CAD sudden death (control group, non-CAD-SD) were included. miRNAs were quantified in frozen liver tissues. **Results:** Males predominated in both groups. Patients more frequently exhibited NAFLD and necroinflammatory steatohepatitis (NASH) than controls (62% vs 26%,  $P = 0.001$  and 42% vs 26%,  $P = 0.001$  respectively). In both groups, the presence of NAFLD correlated with body mass index and abdominal circumference ( $P < 0.05$ ). An increase in miR-34a-5p and a decrease in miR-122-5p and -29c-3p in patients with NASH vs controls without NAFLD were observed ( $P < 0.05$ ). Finally, significant correlations between miR-122-5p and unfavourable lipid profile and also hs-CRP and miR-34a-5p were noted. **Conclusions:** CAD is associated with NAFLD and NASH. The hepatic miRNAs studied appear to be associated with NAFLD severity and may promote CAD through lipid metabolism alteration and/or promotion of the systemic inflammation.

### Keywords

ischaemic heart disease – microRNAs – steatohepatitis – sudden cardiac death

Sudden cardiac death (SCD) is the leading cause of sudden unexpected non-traumatic deaths in adults aged <65 years in Western countries, being the first manifestation of cardiovascular disease in 20–40% of the cases. Although the incidence of SCD varies in different series regarding a variable range of ages, it

has been estimated in 0.35–1.28 per 1000 inhabitants per year (1) and it has become a major public health problem in industrialized countries. Coronary artery disease (CAD) is the most prevalent cause of SCD, being responsible for 60–80% of the cases of SCD (2).

### Abbreviations

AC, abdominal circumference; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; GGT,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; miRNA, microRNA; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, necroinflammatory steatohepatitis; SCD, sudden cardiac death.

### Correspondence

Esther Zorio, Cardiology Department, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell n°106, Valencia 46026.

Tel: +00 34 961245859; Fax: +961 246312

e-mail: zorio\_est@gva.es

\*Co-first author.

Handling editor: Luca Valenti

Received 15 November 2015; Accepted 8 February 2016

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.13097/supinfo](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.13097/supinfo)

**Key points**

- The presence and the severity of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are associated to the presence of significant coronary stenoses in victims of sudden cardiac death.
- A deregulation of several hepatic microRNAs (namely miR-34a-5p, -122-5p and -29c-3p) has been observed in association not only to the development of NAFLD but also to its severity.
- The miR-34a-5p is upregulated also in healthy livers of patients with coronary stenoses.
- As a speculative connection, our results suggest that an unfavourable lipid profile and a proinflammatory effect could underlie the essentials of the cross-talk between the liver (with NAFLD) and the coronary arteries (with significant stenoses).

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a clinical and pathological multifactorial disorder characterized by similar histological findings to those observed in alcoholic hepatitis but in the absence of alcohol intake in amounts known to cause hepatic damage (less than 20 g/day is commonly accepted) (3). NAFLD ranges from simple steatosis to necroinflammatory steatohepatitis (NASH) with different degrees of severity and fibrosis. Although NAFLD represents the most common cause of liver disease in the Western world being its prevalence 13–30% in the general population (4, 5), the estimated prevalence of NASH is only 2–3% in the general population (6) and 37% in the morbidly obese patients (7).

The association between NAFLD and obesity, type 2 diabetes mellitus and/or dyslipidaemias is being increasingly recognized supporting the new concept that NAFLD could be regarded as a true new component of the metabolic syndrome or even an active factor involved in its pathogenesis (8–10). The increased cardiovascular risk observed in NAFLD patients has suggested a predisposition to atherosclerosis although it is still a matter of debate whether this link is dependent or independent from other features of the metabolic syndrome (10). The possible mechanisms linking NAFLD and CAD include inflammation and oxidative stress pathways, hyperlipidaemia and insulin resistance (8–11).

Besides the classical factors involved in cholesterol metabolism, microRNAs (miRNAs) have been identified as important post-transcriptional regulators of cholesterol homeostasis (12). miRNAs are small (21–22 nucleotides) non-coding RNAs that regulate gene expression and play fundamental regulatory roles in many pathophysiological processes (13). These small molecules bind to target mRNAs, mediating translational repression and/or mRNA degradation (13–15). Several studies have identified a specific miRNA expres-

sion profile associated to NAFLD (16–18) and others have suggested the diagnostic potential of miRNAs in CAD (19, 20).

Pathological information derived from *postmortem* studies constitutes a key source of knowledge to understand many disease conditions. According to the legislation, a forensic autopsy is required in all clear or suspected violent deaths, including sudden and unexpected deaths in non-hospitalized children and young adults. Forensic-based studies could provide relevant data to develop cardiovascular prevention strategies. Only few reports on autopsy series have corroborated that ischaemic heart disease is the most common cause of death among autopsies of patients with NAFLD (21, 22) and none has simultaneously analysed the potential role of miRNAs in this scenario. The aim of this study has been not only to assess the relationship between NAFLD and severe CAD in forensic autopsies in a county of Spain, but also to correlate the level of certain hepatic miRNAs with the presence of NAFLD, CAD, obesity and dyslipidaemia.

**Material and methods****Ethics statement**

This study was approved by the Ethical Committee from the Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain (#2013/0113).

**Clinical Groups**

A total of 133 consecutive cases of SCD associated with significant CAD (CAD-SCD, patient group) and 106 consecutive cases of non-CAD unexpected sudden deaths (non-CAD-SD, control group) were prospectively included from 2008 to 2014 following a broad protocol created to offer a multidisciplinary approach of SCD occurring under 55-year old. Autopsies were performed at the Institute of Legal Medicine of Valencia, Spain. Sudden death was defined as a natural death either (i) witnessed and occurring within 1 hour from the onset of symptoms in an apparently healthy subject or whose disease was not so severe as to predict such an abrupt outcome or (ii) unwitnessed when the deceased was known to be in good health 24 h before death (1, 23). CAD-SCD (patient group) was defined by at least one of the following: an atheromatous cross-sectional area reduction of >75% in at least one epicardial coronary artery, a complicated plaque (ruptured or eroded with or without thrombosis) and the presence of acute or healed myocardial infarction. Non-CAD-SD (control group) comprised 43 cases of SCD with structurally normal heart, 21 familial cardiomyopathies (hypertrophic, arrhythmogenic and dilated cardiomyopathies), 6 pulmonary thromboembolisms, 5 aortic dissections, 4 valvulopathies, 3 myocarditis, 2



channelopathies, 1 coronary dissection and 1 Wolf–Parkinson–White syndrome and 20 non cardiac causes including brain haemorrhages and thoracic traumas. Forensic investigation included compilation of circumstances of death and premortem clinical information, routine autopsy with body mass index (BMI), abdominal circumference (AC), routine toxicological analyses and macro and microscopic examination of the major organs. *Brunt* histological scoring system semiquantitatively assessed the presence of steatosis, inflammation and hepatocytic injury to grade NASH severity (grade 1 mild, grade 2 moderate and grade 3 severe) (24). The cause of death was established based on the correlation of clinical and pathological reports following current recommendation and guidelines (1). BMI was calculated from weight in kilograms divided by the square of height in meters. This study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by our institution's human research committee. No written informed consent was required given the fact that all the participants were dead at the time of the recruitment and that all the biological samples analysed had been obtained within the protocol of the legal autopsy that they all underwent following the Spanish Laws concerning sudden deaths.

#### Analytical parameters

Analytical parameters were analysed in peripheral blood whenever it was available at the postmortem examination. Total cholesterol (T-Ch), triglycerides and GGT were determined by enzymatic methods and HDL-cholesterol (HDL-Ch) with direct methods (Architect 16000; Abbott Diagnostic, Lake Forest, IL, USA). When triglycerides were <400 mg/dl LDL-cholesterol (LDL-Ch) was calculated with Friedewald's formula. VLDL-cholesterol (VLDL-Ch) was obtained from triglycerides/5. Lipoprotein(a) and apolipoprotein A and B and were all measured using kinetic nephelometry (Image Nephelometer<sup>®</sup>; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). High-sensitivity C reactive protein level (hs-CRP) was assessed with turbidimetric methods (Image Nephelometer<sup>®</sup>; Beckman Coulter Inc.).

#### RNA extraction and quality determination

Liver tissues were rinsed in cold PBS and stored in RNA later (Ambion) at  $-80^{\circ}\text{C}$  until their processing. Liver samples from 68 patients and 27 controls were included in the miRNA study. The mirVana-Paris miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) was used to extract the total RNA. The RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) in all the samples. Following manufacturer's specifications, only samples with A260/A280 ratio of  $\sim 2.0$  and A260/

230 ratio in the range 1.9–2.2 were considered for inclusion in this study.

#### Quantification of selected mature miRNAs by quantitative real-time RT-PCR

On the basis of the literature supporting the association of miRNAs with NAFLD, we selected six miRNAs to be evaluated in our cohort of samples: miR-122-5p (MIMAT0000421), -33a-5p (MIMAT0000091), -34a-5p (MIMAT0000255), -21-5p (MIMAT0000076), -29c-3p (MIMAT0000681) and -106b-5p (MIMAT0000680). The miR-27a-3p (MIMAT0000084), but not the small nucleolar RNA RNU6B, served as an endogenous control since RNU6B did not present stable levels in our samples. Instead, the miR-27a-3p was tested and validated as an endogenous control.

Quantification was performed by miRCURY LNA<sup>™</sup> Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Vedbaek, Denmark). This method is based on a universal RT followed by a real-time PCR amplification with LNA<sup>™</sup> enhanced primers. The protocol was performed as outlined in the instruction manual, employing a LightCycler 480 instrument II (Roche, Applied Science, Penzberg, Germany).

#### Statistical analysis

Adequate variable measures of central tendency and dispersion were used and chi-square, odds ratio, Student's *t*-test and ANOVA (with Bonferroni correction) were calculated to assess associations of dichotomic and continuous variables. Pearson's test was used for correlation assessments. In the analyses, SPSS 12.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used. Multivariate analyses were performed including in the model the epidemiological variables with statistically significant differences in the univariate, namely age, sex, BMI and AC.

miRNA data quantified by real-time qRT-PCR are presented as fold changes with respect to the reference subgroup (the controls without NAFLD). Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

#### Results

Clinical and forensic data from our 239 cases are shown in Table 1. Patients were significantly older than controls ( $45 \pm 8$  vs  $37 \pm 10$ ,  $P < 0.001$ ). In both groups, a male predominance was observed (88% in patients and 73% in controls). BMI ( $27.1 \pm 4.3 \text{ kg/m}^2$  vs  $25.7 \pm 4.7 \text{ kg/m}^2$ ,  $P < 0.05$ ) and AC ( $95.2 \pm 13.1 \text{ cm}$  vs  $90.0 \pm 15.1 \text{ cm}$ ,  $P < 0.01$ ) were again higher in the patient than in the control group. Among the analytical parameters, CAD-SCD patients exhibited increased levels of T-Ch ( $204 \pm 62 \text{ mg/dl}$  vs  $175 \pm 56 \text{ mg/dl}$ ,  $P < 0.05$ ), T-Ch/HDL-Ch ratio ( $5.9 \pm 2.3$  vs  $4.5 \pm 1.3$ ,  $P < 0.01$ ) and LDL-Ch/HDL-Ch ratio ( $3.4 \pm 1.4$  vs  $2.4 \pm 1.4$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** Anthropometric, lipid and other analytic parameters in patients (CAD-SCD group) vs controls (non-CAD-SD group)

Total Groups	CAD-SCD group (N = 133)	Non-CAD-SD group (N = 106)	P
Age (years)	45 ± 8	37 ± 10	<0.001
Male/female	117/16	77/29	0.004
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.1 ± 4.3	25.7 ± 4.7	0.027
AC (cm)	95.2 ± 13.1	90.0 ± 15.1	0.009
	(N = 66)	(N = 35)	P
T-Ch (mg/dl)	204 ± 62	175 ± 56	0.041
HDL-Ch (mg/dl)	37 ± 12	40 ± 14	0.273
LDL-Ch (mg/dl)	120 ± 52	90 ± 49	0.061
VLDL-Ch (mg/dl)	88 ± 42	72 ± 21	0.073
Triglycerides (mg/dl)	433 ± 214	359 ± 107	0.107
T-Ch/HDL-Ch ratio	5.9 ± 2.3	4.5 ± 1.3	0.007
LDL-Ch/HDL-Ch ratio	3.4 ± 1.4	2.4 ± 1.4	0.032
ApoA1/ApoB ratio	1.1 ± 0.31	1.3 ± 0.52	0.058
Lipoprotein (a) (mg/dl)	37.9 ± 31.1 (0–124)	41.1 ± 73.4 (2–344)	0.158
hs-CRP (mg/dl)	9.8 ± 19.0	5.6 ± 19.9	0.381
GGT (IU/l)	59 ± 35	50 ± 35	0.305

BMI, body mass index; AC, abdominal circumference; T-Ch, total cholesterol; HDL-CH, High-density lipoprotein cholesterol; LDL-Ch, low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-Ch, very-low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high-sensitivity C reactive protein; GGT,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.

### Prevalence of NAFLD

The presence of NAFLD was associated with CAD in our study population (62% vs 26%,  $P < 0.001$ ) with an odds ratio for CAD-SCD of 4.62 (95% CI 2.65–8.07) (Table 2). Furthermore, when grading the presence of NAFLD into absence, steatosis and NASH, a higher percentage of CAD-SCD individuals was observed in the two latter (and more unfavourable) groups among patients in comparison to controls with increasing odds ratios attending to the severity of the NASH in the univariate and also in the multivariate analyses (Table 2).

### Expression of hepatic miRNAs measured in liver of a subgroup of patients and controls

The selected six miRNAs (miR-122-5p, -33a-5p, -34a-5p, -21-5p, -29c-3p, -106b-5p) were quantified only in 68 cases of the patient and 27 cases of the control group from whom frozen liver samples were available. Nonetheless, these subcohorts were representative from the whole series since statistical analyses ruled out remarkable differences regarding age, sex BMI and AC (data not shown).

**Table 2.** Prevalence of NAFLD in patients (CAD-SCD group) vs in controls (non-CAD-SD group)

	CAD-SCD group (N = 133) N (frequency)	Non-CAD-SD group (N = 106) N (frequency)	OR (95% CI)	P
Non-NAFLD	50 (0.38)	78 (0.74)	1*	
NAFLD	83 (0.62)	28 (0.26)	4.62 (2.65–8.07)† 2.63 (1.31–5.28)‡	<0.001 0.006
Simple steatosis (yes)	27 (0.20)	16 (0.15)	2.63 (1.29–5.37)† 1.92 (0.84–4.43)‡	0.038 0.123
NASH (yes)	56 (0.42)	12 (0.11)	7.28 (3.55–14.92)† 4.42 (1.67–11.65)‡	<0.001 0.003
NASH 1	4 (0.03)	3 (0.028)	2.08 (0.45–9.69)† 1.34 (0.16–11.18)‡	0.351 0.788
NASH 2	37 (0.28)	7 (0.065)	8.25 (3.41–19.93)† 4.94 (1.61–15.18)‡	<0.001 0.005
NASH 3	15 (0.11)	2 (0.018)	11.70 (2.57–53.36)† 13.43 (1.49–121.39)‡	0.001 0.021

\*Reference group.

†Univariate analysis.

‡Multivariate analysis adjusted for age, sex, body mass index and abdominal circumference.

NASH score as previously reported (NASH 1 mild, NASH 2 moderate and NASH 3 severe) (24).

Patients exhibited higher miR-34a-5p and lower miR-122-5p levels than controls ( $P < 0.001$  and  $< 0.01$ , respectively, Fig. 1A). Furthermore, hepatic miR-34a-5p was statistically increased in patients even in the absence of NAFLD ( $P < 0.01$ , Fig. 1B).

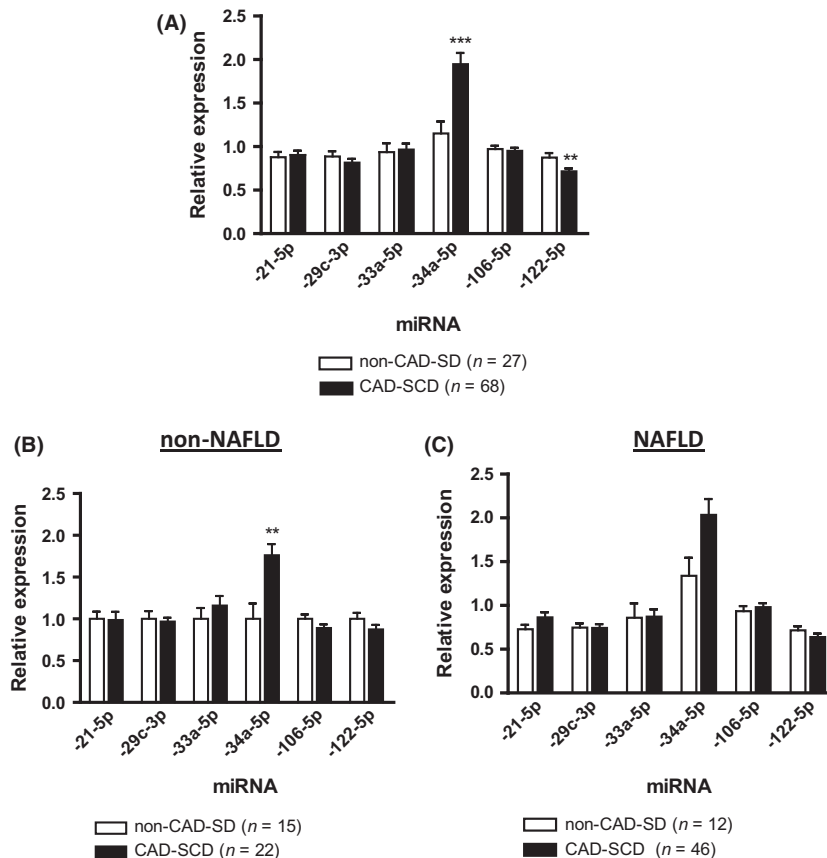
#### Expression of hepatic miRNAs according to the severity of the liver disease

Considering pooled data from CAD-SCD and non-CAD-SD individuals, the presence of NAFLD was associated with altered miRNA levels, namely increased miR-34a-5p and decreased miR-21-5p, -29c-3p, -33a-5p and -122-5p levels (Fig. S1A). However, little impact in this unusual miRNA expression associated with NAFLD was observed with respect to the absence/presence of CAD with the exception of a global increase in miR-34a-5p levels (relative expression 1.0–1.3 in Fig. 2A vs 1.8–2.1 in Fig. 2C respectively). When the severity of the liver disease (no NAFLD, steatosis vs NASH) was analysed a trend towards more deregulated miRNAs in more affected livers was observed for several miRNAs (Figs 2B,D and S1B). Moreover, significant direct (for miR-34a-5p) and inverse (for miR-21-5p, -29c-3p and -122-5p) correlations with the severity of the liver disease

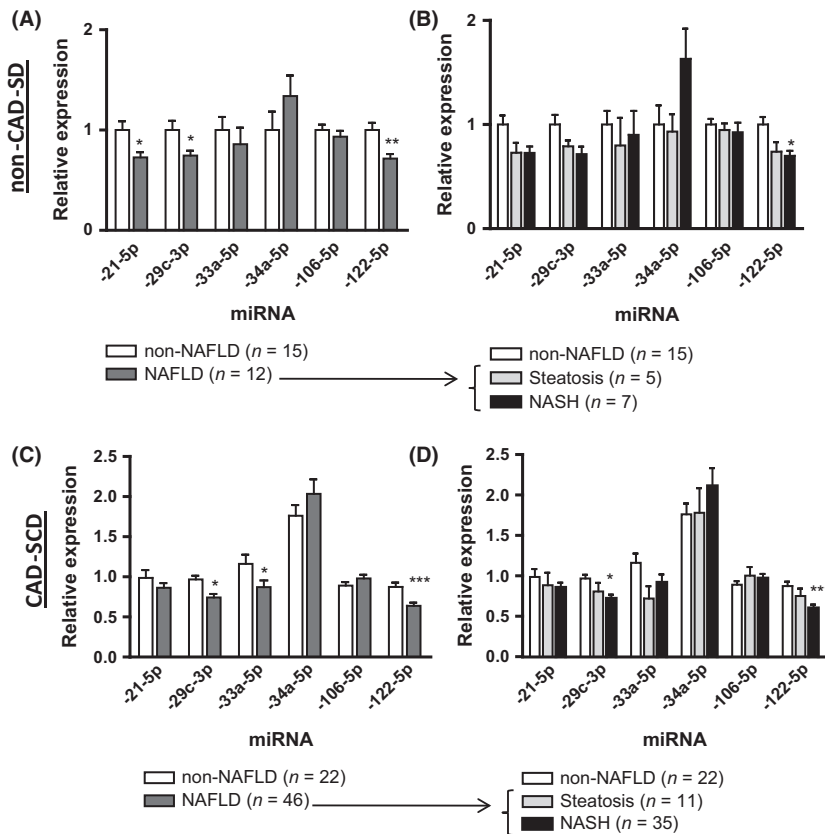
were observed, with a significant overlap though (Fig. 3).

#### Correlations between miRNA expression and cardiovascular risk factors

Tables S1, S2 and Fig. S2 show the correlation analyses between miRNAs levels and quantitative continuous risk factors. miR-29c-3p and miR-122-5p showed a significant inverse correlation with obesity parameters (BMI and AC) both among controls and among patients. However, miR-34a-5p did not correlate with those variables and, instead, it exhibited a direct correlation with age and GGT levels ( $r = 0.460$ ,  $P = 0.016$  and  $r = 0.598$ ,  $P = 0.002$ , respectively) only in controls. An unfavourable lipid profile correlated with several miRNAs being the most interesting findings an inverse correlation between miR-122-5p and T-Ch in controls ( $r = -0.458$ ,  $P = 0.025$ ) and an inverse correlation between miR-122-5p and LDL-ch/HDL-ch ratio ( $r = -0.379$ ,  $P = 0.016$ ) in patients. Finally, with respect to inflammation, a significant direct correlation was noted among patients between hs-CRP levels and miR-34a-5p ( $r = 0.492$ ,  $P < 0.001$ ).



**Fig. 1.** Comparison of hepatic miRNA expression regarding the presence of CAD in the total group (A) and in the subgroups regarding the absence (B) or presence (C) of NAFLD. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig. 2.** Hepatic miRNA expression according to status of the liver disease in patients with CAD (A) and without CAD (C). A detailed analysis dividing the NAFLD patients into steatosis and NASH is provided for CAD-SCD patients (B) and non-CAD-SD individuals (D). \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . When more than two subgroups were considered, the Bonferroni post-hoc test was applied and the non-NAFLD subgroup was used as reference for comparisons.

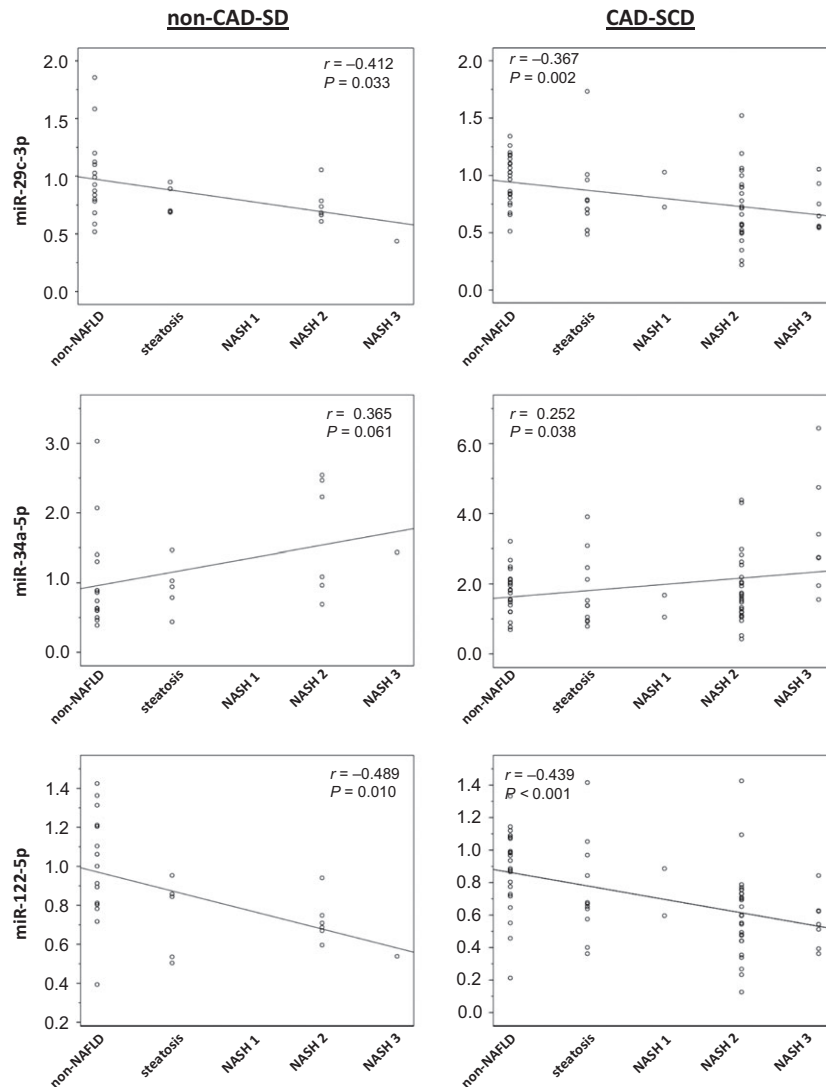
**Discussion**

This study shows for the first time evidence pointing towards hepatic miRNAs as major actors of the interplay between NAFLD and CAD. Specifically in CAD victims without NAFLD, miRNA-34a-5p is the only one significantly deregulated, suggesting that it may promote CAD even before than NAFLD. To our knowledge, our series is the first one to study the presence of NAFLD in middle-aged adult CAD-SCD victims in whom the role of certain miRNAs has also been investigated.

CAD is significantly associated with NAFLD in our study, particularly with more severe liver damage (NASH with higher scores). In keeping with us, similar results have been recently made in clinical series where the diagnosis of NAFLD was based on blood tests and ultrasound imaging without histological confirmation (25–27). NAFLD has also been associated to atherosclerosis in other territories, such as in carotid arteries, where this association was independent of the presence of the classical cardiovascular risk factors (28). In line with most studies (29), we found no differences regarding the prevalence of steatosis among patients and con-

trols in the multivariate analysis of our study, thus reflecting that simple steatosis without inflammation or fibrosis is not a marker of CAD. The scarce available forensic epidemiological data to this respect come from adult forensic autopsies in Iran and Greece, where not only NAFLD and NASH associated to CAD in adults (21, 22) but also to aortic atherosclerosis in children (30).

It has been published that several miRNAs regulate cholesterol homeostasis and fatty acid metabolism and are implicated in CAD, NAFLD and NASH (17, 31–34). Indeed, mice with diet-induced NASH exhibited a characteristic aberrant hepatic miRNAs pattern similar to our results, namely overexpressed miR-34a, miR-155, miR-200b and miR-221 and downexpressed miR-29c, miR-122, miR-192 and miR-203 (35). Herein we report, for the first time in humans, the correlation of the severity of NAFLD with high hepatic miR-34a-5p and low miR-122-5p and -29c-3p levels (Fig. 3) and, furthermore, also with the presence of a diseased coronary tree (Fig. 1). We have also observed that some miRNAs seem to be more implicated in the development of NAFLD than of CAD. It is the case of miR-21-5p, -29c-3p or -122-5p whose downregulation is inde-



**Fig. 3.** Correlations between miRNA expression levels and NAFLD scoring.

pendent of the presence of CAD (Figs 1 and 2). In contrast, miR-34a-5p expression seems to be related to CAD irrespective of the liver status (Figs 1 and 2) and also to the presence and severity of NAFLD (Fig. 3). The fact that in CAD patients miR-34a-5p is already upregulated even though no sign of NAFLD is yet observed at the histological evaluation suggests that the hepatic production of this miRNA may precede the coronary burden. Although the mechanism by which this and other hepatic miRNAs may exert their action in the coronary walls remains largely unknown, several tantalizing hypotheses arise. First, the deregulated hepatic miRNAs could reach the blood stream and exert a direct proatherosclerotic effect on the coronary walls. And second, dyslipidaemia and systemic inflammation may indirectly mediate their effect in CAD promotion, provided the deregulated miRNAs influence in the metabolism of cholesterol and proinflammatory

cytokines before CAD is established. The more relevant associations to this respect include inverse correlations between miR-122-5p and total cholesterol in controls and LDL-Ch/HDL-Ch in patients and also between miR-34a-5p and hs-CRP in patients (Table S2 and Fig. S2). Further studies will be necessary to test these hypotheses.

It has been described that miR-34a-5p, through the SIRT1/p53 pathway, correlate with the degree of NAFLD severity (16) and decreases the phosphorylation of the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCoA), so that the active dephosphorylated form positively influences in the hepatic cholesterol accumulation (16, 36). In our cohort, we have found significant correlation between hepatic miR-34a-5p levels and age in the control group, in keeping with previous reports linking high miR-34a levels with the ageing heart (37). However, miR-34a-5p levels did not significantly corre-

late with age among patients, thus suggesting that in pathological conditions other mechanisms disturb the linearity of that upregulation.

miR-122-5p represents about 70% of total hepatic miRNAs. Controversial results have been published regarding its role in NAFLD. Indeed, we have observed a significant decrease in hepatic miR-122-5p in patients with NAFLD. In agreement with our results, it has been published that it targets hepatic lipogenic genes (16), its hepatic levels inversely correlate with NAFLD or NASH in rats (16, 38, 39) and with NASH in patients (17). Moreover, miR-122-5p silencing reproduced a pattern of hepatic lipogenic mRNA and protein expression that was similar to that observed in human NASH (17). Conversely, other studies have reported that the transient inhibition of miR-122-5p in mice protects against dyslipidaemia (40, 41) and liver steatosis (17, 41). These contradictory results may indicate that it is necessary a long-term miR-122-5p suppression for establishing a liver pathology (17).

Although a deregulated miR-33a-5p expression has been associated to an altered lipid metabolism (42, 43), we could not confirm this point. Moreover, no statistical differences were found in its hepatic levels regarding the presence or absence of CAD (data not shown).

Finally, several papers associated miR-29c-3p hepatic levels with cancer (44, 45) but none have linked this miRNA to CAD, although this association in the herein presented results was weak and only in the extreme groups.

Nowadays, how and when the awareness of NAFLD as a cardiovascular risk factor should be implemented in the clinical arena (in terms of CAD screening) remains to be elucidated. On the contrary, its assessment in the follow up of already diagnosed CAD patients may not be considered suitable since no specific therapeutic approach is warranted for NAFLD.

In terms of *future* daily practice, a new era could be nearby since, as Cecarelli *et al.* suggested (16), the identification of a specific miRNA profile for each stage of NAFLD would represent an important breakthrough for the design of new potential diagnostic or therapeutic tools and might even prevent the development of CAD in NAFLD patients.

In conclusion, the SCD potentially attributable to CAD is associated with a higher prevalence of NAFLD (and NASH) when compared with SD without CAD. The hepatic miRNAs studied appear to be associated to dyslipidaemia, obesity, systemic inflammation and NAFLD severity, being NASH but not steatosis associated to the presence of CAD.

### Limitations

We acknowledge that the absence of systematic data regarding classical cardiovascular risk factors in the autopsy files precluded their inclusion in the multi-

variate analyses. However, their retrospective collection from the relatives is not always amenable and/or accurate. Remarkably, other papers in living patients did systematically check them with similar results in different scenarios. These two considerations blunt this limitation and let us underscore the novelty of our herein reported results in victims of SD. The wide range of time between the last meal and the moment of the exitus on one hand, and the fact that the postmortem lipid profile has not been yet standardized on the other, warrant caution when analysing the correlations with these parameters. Finally, further evidence with a bigger sample size is needed to corroborate our results and elucidate the role of hepatic miRNAs in CAD.

### Acknowledgements

The authors thank Yolanda Abellan and Jennifer Sancho for the technical support to conduct this work.

*Financial support:* This study was supported with grants from the Instituto de Salud Carlos III, FEDER “Union Europea, Una forma de hacer Europa” (RD12/0042/0029, PI011/00091, PI14/01477) and Premio López Borrasca-SETH. ABB is supported by a Sara Borrell Grant (CD13/0005) and JMA by a Predoctoral Grant (FI12/00012).

*Conflict of interest:* The authors do not have any disclosures to report.

### References

1. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, *et al.* Task force on sudden cardiac death of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 2001; **22**: 1374–450.
2. Morentin B, Audicana C. Population-based study of out-of-hospital sudden cardiovascular death: incidence and causes of death in middle-aged adults. *Rev Esp Cardiol* 2011; **64**: 28–34.
3. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol* 2007; **17**: 863–9.
4. deAlwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008; **48**(Suppl. 1): S104–12.
5. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; **40**: 1387–95.
6. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; **37**: 1202–19.
7. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; **45**: 600–6.
8. Targher G, Bertolini L, Padovani R, *et al.* Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; **29**: 1325–30.
9. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; **191**: 235–40.

10. Duseja A, Singh SP, Saraswat VA, *et al.* Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome-Position Paper of the Indian National Association for the Study of the Liver, Endocrine Society of India, Indian College of Cardiology and Indian Society of Gastroenterology. *J Clin Exp Hepatol* 2015; **5**: 51–68.
11. Santos RD, Agewall S. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2012; **224**: 324–5.
12. Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 915–30.
13. Zorio E, Medina P, Rueda J, *et al.* Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009; **7**: 82–90.
14. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281–97.
15. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215–33.
16. Ceccarelli S, Panera N, Gnani D, Nobili V. Dual Role of MicroRNAs in NAFLD. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 8437–55.
17. Cheung O, Puri P, Eicken C, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008; **48**: 1810–20.
18. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; **26**: 202–8.
19. D'Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L, *et al.* Diagnostic potential of plasmatic microRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS ONE* 2013; **8**: e80345.
20. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, *et al.* Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010; **31**: 2765–73.
21. Sotoudehmanesh R, Sotoudeh M, Ali-Asgari A, *et al.* Silent liver diseases in autopsies from forensic medicine of Tehran. *Arch Iran Med* 2006; **9**: 324–8.
22. Zois CD, Baltayiannis GH, Bekiari A, *et al.* Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World J Gastroenterol* 2010; **16**: 3944–9.
23. Goldstein S. The necessity of a uniform definition of sudden coronary death: witnessed death within 1 hour of the onset of acute symptoms. *Am Heart J* 1982; **103**: 156–9.
24. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**: 2467–74.
25. Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; **10**: 646–50.
26. Lin YC, Lo HM, Chen JD. Sonographic fatty liver, overweight and ischaemic heart disease. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 4838–42.
27. Kessler A, Levy Y, Roth A, *et al.* Increased prevalence of NAFLD in patients with acute myocardial infarction independent of BMI. *Hepatology* 2005; **42**: 623A.
28. Li X, Xia M, Ma H, *et al.* Liver fat content is associated with increased carotid atherosclerosis in a Chinese middle-aged and elderly population: the Shanghai Changfeng study. *Atherosclerosis* 2012; **224**: 480–5.
29. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann MB, *et al.* Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol* 2009; **44**: 1236–43.
30. Schwimmer JB, Deutsch R, Behling C, Lavine JE. Fatty liver as a determinant of atherosclerosis. *Hepatology* 2005; **42**: 610A.
31. Hur W, Lee JH, Kim SW, *et al.* Downregulation of microRNA-451 in non-alcoholic steatohepatitis inhibits fatty acid-induced proinflammatory cytokine production through the AMPK/AKT pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; **64**: 265–76.
32. Yamada H, Ohashi K, Suzuki K, *et al.* Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Chim Acta* 2015; **446**: 267–71.
33. Xu Y, Zalzal M, Xu J, *et al.* A metabolic stress-inducible miR-34a-HNF4 $\alpha$  pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. *Nat Commun* 2015; **6**: 7466.
34. Sun C, Huang F, Liu X, *et al.* miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int J Mol Med* 2015; **35**: 847–53.
35. Pogribny IP, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, *et al.* Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Lab Invest* 2010; **90**: 1437–46.
36. Min HK, Kapoor A, Fuchs M, *et al.* Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 2012; **15**: 665–74.
37. Boon RA, Lekushi K, Lechner S, *et al.* MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 2013; **495**: 107–10.
38. Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, *et al.* Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest* 2011; **91**: 283–93.
39. Csak T, Bala S, Lippai D, *et al.* microRNA-122 regulates hypoxia-inducible factor-1 and vimentin in hepatocytes and correlates with fibrosis in diet-induced steatohepatitis. *Liver Int* 2015; **35**: 532–41.
40. Elmen J, Lindow M, Schutz S, *et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008; **452**: 896–9.
41. Esau C, Davis S, Murray SF, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; **3**: 87–98.
42. Fernández-Hernando C, Moore KJ. MicroRNA Modulation of cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31**: 2378–82.
43. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**: 843–54.
44. Bae HJ, Noh JH, Kim JK, *et al.* MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2014; **33**: 2557–67.
45. Wang CM, Wang Y, Fan CG, *et al.* miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **411**: 586–92.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.13097/supinfo](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.13097/supinfo)



Review

# miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis

Josep Mari-Alexandre <sup>1,†</sup>, Dolors Sánchez-Izquierdo <sup>2,†</sup>, Juan Gilabert-Estellés <sup>3</sup>,  
Moisés Barceló-Molina <sup>1</sup>, Aitana Braza-Boïls <sup>1,\*</sup> and Juan Sandoval <sup>4,\*</sup>

Received: 21 December 2015; Accepted: 8 January 2016; Published: 13 January 2016

Academic Editors: Nalini Santanam and William Chi-shing Cho

<sup>1</sup> Unit of Hemostasia, Thrombosis, Atherosclerosis and Vascular Biology, Health Research Institute La Fe, Valencia 46026, Spain; josepmariaalexandre@gmail.com (J.M.-A.); moibarcelo@live.com (M.B.-M.)

<sup>2</sup> Arrays Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia 46026, Spain; Maria.D.Sanchez@uv.es

<sup>3</sup> Maternal Child Area, General Hospital, Valencia 46014, Spain; juangilaeste@yahoo.es

<sup>4</sup> Epigomics Unit, Health Research Institute La Fe, Valencia 46026, Spain

\* Correspondence: a.braza.boils@gmail.com (A.B.-B.); juan.sandoval@uv.es (J.S.);  
Tel.: +34-96-124-6641 (A.B.-B.); +34-96-124-6709 (J.S.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (18–22 nt) that function as modulators of gene expression. Since their discovery in 1993 in *C. elegans*, our knowledge about their biogenesis, function, and mechanism of action has increased enormously, especially in recent years, with the development of deep-sequencing technologies. New biogenesis pathways and sources of miRNAs are changing our concept about these molecules. The study of the miRNA contribution to pathological states is a field of great interest in research. Different groups have reported the implication of miRNAs in pathologies such as cancer, diabetes, cardiovascular, and gynecological diseases. It is also well-known that miRNAs are present in biofluids (plasma, serum, urine, semen, and menstrual blood) and have been proposed as ideal candidates as disease biomarkers. The goal of this review is to highlight the current knowledge in the field of miRNAs with a special emphasis to their role in endometriosis and the newest investigations addressing the use of miRNAs as biomarkers for this gynecological disease.

**Keywords:** non-coding RNA; microRNA; biomarker; endometriosis

## 1. Introduction

Traditionally, in all eukaryotic systems, genes codified proteins, following the central dogma of molecular biology [1] consisting of DNA being transcribed into mRNA and mRNA translated into proteins. The first non-coding RNA (ncRNA) characterized was an alanine tRNA found in baker's yeast in 1965 [2]. Since then, our understanding of the different and capital roles they play in cells and organisms development and functions has enormously increased. ncRNAs are also assumed to be genomic regulators at different levels and, in case of lower level of sequence conservation, are assumed as evolutionary and biodiversity repositories [3].

Nowadays, it is evident that that RNA is not just a simple messenger between DNA and proteins but growing evidence supports new roles for these molecules, such as regulation of genome organization and gene expression. ncRNAs seem to act at many levels playing important roles in epigenetic processes by controlling differentiation and development and they have been related to very different pathologies (Table 1). Short and long ncRNAs are key regulators of gene expression, genome stability, and defense against foreign genetic elements. ncRNAs are encoded in the genome



and never become proteins, demonstrating that the first assumed functions for those molecules have been a lot less than expected [4].

**Table 1.** Classes of non-coding RNAs (ncRNA).

Symbol	Non-Coding RNAs	Functions
tRNA	Transfer RNA	mRNA translation (structural)
rRNA	Ribosomal RNA	mRNA translation (structural)
miRNA	micro RNAs	Post-transcriptional transposon repression
piRNA	Piwi-interacting RNA	DNA methylation, transposon repression
siRNA	Short interfering RNA	RNA interference
snoRNA	Small nucleolar RNAs	RNA modification, rRNA processing
PROMPT's	Promoter upstream transcripts	Associated with chromatin changes
tiRNAs	Transcription initiation RNAs	Epigenetic regulation
lincRNAs	Long intergenic ncRNA	Epigenetic regulators of transcription
rasiRNA	Repeat associated small interfering RNA	Involved in the RNA interference (RNAi) pathway
eRNA	Enhancer-like ncRNA	Transcriptional gene activation
T-UCRs	Transcribed ultraconserved regions	Regulation of miRNA and mRNA levels
NATs	Natural antisense transcripts	mRNA stability
PALRs	Promoter-associated long RNAs	Chromatin changes
tasiRNA	Trans-acting siRNA	Represses gene expression
lncRNA	Long noncoding RNA	Regulation of gene transcription

## 2. Non-Coding RNA Identification: The ENCODE Project

ncRNAs are RNA fragments that are transcribed from DNA but are not translated into proteins. The main function of ncRNAs is to regulate gene expression at the transcriptional and post-transcriptional level. ncRNAs can be divided into structural and functional regulatory ncRNAs and, at the same time, functional ncRNAs can be subdivided into two main groups according their length; the short ncRNAs (<30 nts) and the long ncRNAs (>200 nts). The amount of ncRNAs codified in the human genome is unknown; however, recent bioinformatic studies have described the sequence of thousands of them [5]. ncRNAs genes include those that are extremely high expressed and showing essential cell functions such as Table 1 describes. A huge contribution to the identification of untranslated sequences has been the ENcyClopedia of DNA Elements (ENCODE <http://www.genome.gov/encode/>), released in September 2003. The conclusions from this pilot project were published in June 2007 [6]. ENCODE Project was focused on defining RNA transcripts, transcriptional regulator binding sites, and chromatin states in many cell types by different approaches: (a) genomics, to find functional elements where mutations and knock-down models demonstrate the phenotype associated to the genomic sequence; (b) evolutive conservation, as indicator of functional sequences and (c) biochemical approach in models, to characterize ncRNA activity in specific cell type, condition, and molecular processes [7]. Bioinformatic studies on gene regulation and RNA metabolism have described a new variety of functional non-coding sequences, including promoters, enhancers, silencers, insulators, and ncRNA genes. These non-coding elements are associated with chromatin structures or transcription enhancers displaying, for example, histone modifications, DNA methylation, DNase and transcription factor accessibility [8–13]. Some of them could be considered at some point as 'structural sequences'. YRNAs, for instance, are stem loops essential for DNA replication interacting with chromatin and initiation proteins (including the origin recognition complex) [14,15]. Small RNAs are able to modify chromatin structure and to silence transcription by guiding Argonaute-containing complexes to complementary newly transcribed RNAs scaffolds or to gene promoters [16], mediating histone and DNA methyltransferases recruitment.

### 3. miRNAs

In 1993, a new possibility was included in the genomic and regulatory scheme. Victor Ambros, Rosalind Lee, and Rhonda Feinbaum, during a study of the *lin-4* gene controlling the timing of *Caenorhabditiselegans* larval development, described the first miRNA repressing the *lin-14* gene [17]. miRNAs are small (21–22 nts) ncRNAs that regulate gene expression and play fundamental regulatory roles in many biological processes [18–20]. miRNAs can inhibit the translation of hundreds of mRNAs through sequence specific recognition to the “seed sequence”, and according to the degree of nucleotide complement, will raise the inhibition of translation and/or degradation of target molecule of mRNAs [18–21]. Functional analysis of miRNAs have revealed their significant regulatory influence on the expression of target genes involved in both physiological and pathological conditions including gynecological diseases such as endometriosis [22–28].

### 4. miRNAs Biogenesis

miRNA genes are mainly codified in intergenic or intronic regions of their target genes. In these cases a miRNA gene is transcribed together with its host gene providing a coupled regulation of both. Some pri-miRNA may be codified in the intronic regions of protein and non-protein coding genes or in exons of long non-protein coding RNAs. Consequently, the expression of these miRNAs could be regulated with their host genes [5]. Other miRNA genes show a common promoter forming polycistronic units, containing multiple discrete loops from which mature miRNAs are processed.

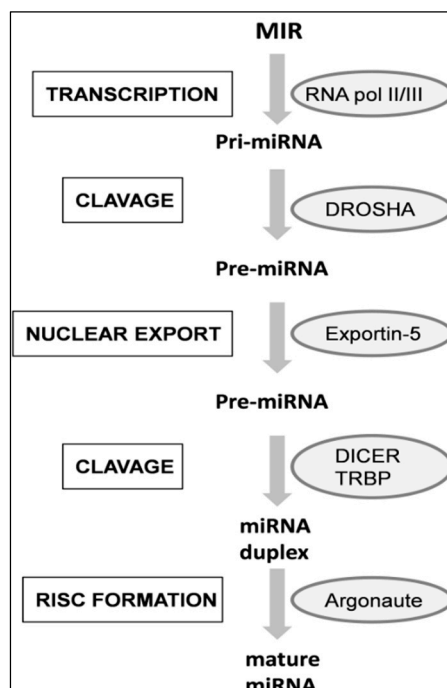
In the canonical miRNA biogenesis pathways described in Figure 1, pri-miRNAs are trimmed by the RNase III Droscha with the help of a double-stranded RNA binding protein: DGCR8. This protein-complex is known as the Microprocessor and yields ~70 nt stem-loop precursors, termed pre-miRNA, with two nucleotides overhanging at the 3' and a 5'-phosphate. The pre-miRNA is then translocated to the cytoplasm by Exportin-5, a Ran-GTP dependent protein [29,30]. From this point on, further steps are common for miRNAs and exogenous siRNAs.

Once in the cytoplasm, the pre-miRNA is trimmed by Dicer, an RNase III enzyme, in combination with TRBP (transactivation Response RNA-Binding Protein) [31]. As a consequence, the loop sequence of the hairpin is released and Dicer renders a ~22 nt RNA-duplex with short 3' overhangs. This step defines the 3' end of the 5' strand and the 5' end of the 3' strand [18]. Then, Dicer transfers the RNA-duplex to an Ago (Argonaute) protein, which forms the nucleus of RISC (RNA-Induced Silencing Complex). At this time, the complex is called the pre-RISC. The mature RISC is achieved once one of the two strands of the duplex is removed; a process termed “strand selection”.

The main determinant of this process seems to be a thermodynamic factor, mainly determined by the first four nucleotides of the duplex. Hence, the end with weaker interactions will preferentially unwind and remain as the “guide strand”, while the so called “passenger strand” will be discarded [30].

The mature RISC complex is able to scan the cytoplasm searching for mRNA able to pair with the loaded miRNA. The miRNA:mRNA pairing is defined by Watson-Crick interactions between the 3' UTR (untranslated region) of the mRNA and a short region of nucleotides in positions 2 to 8 of the miRNA known as the “seed sequence”. It is worthy to mention that beyond this general principle of miRNA:mRNA interaction, miRNA pairing with the 5' UTR has also been defined and observed to be of clinical interest [31] and that additional nucleotides outside the seed sequence can also contribute to determine the mRNA fate [18].

It is important to highlight that the DNA sequence is not always the template for the mature miRNA : 6% of human miRNAs suffer RNA editing. In other words, a single pre-miRNA can become multiple mature miRNAs that differ in their length and sequence, named isomiR. The editing process can alter the “seed sequence” conferring different affinity for other targets, modifying the mRNA target selection [5,32]. In this context, the cell-specific expression of different isomiRs implies different protein expression depending on the cell type conferring the biological significance of these miRNA variants. This phenomenon increases the spectrum of miRNA action.



**Figure 1.** Schematic description of miRNAs biogenesis.

Silencing of mRNAs can be achieved by means of mRNA cleavage or translational repression. Perfect miRNA:mRNA pairing leads to Ago cutting of mRNA approximately at the middle of the miRNA length, whereas imperfect pairing mediates mRNA translational repression by different mechanisms [18].

Apart from the canonical miRNA biogenesis pathway, intronic miRNAs can undergo the “mirtron pathway”. In this non-canonical biogenesis pathway, the spliced intron renders a lariat in which the 3’ branchpoint is ligated to the 5’ end of the intron. Following the action of Ldbr (lariat debranching enzyme) the lariat is converted in a pre-miRNA that can enter the canonical miRNA biogenesis pathway [5,33]. As the vast majority of intronic miRNAs are found on the sense strand it seems plausible that their expression may be related to that of the host mRNA [34,35] in terms of tissue specificity and relative amount [36].

With the avenue of deep-sequencing strategies, the field of miRNAs research has experienced an unprecedented growth in terms of genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants [5]. As a result, several ncRNAs have been identified as sources of miRNAs, including snoRNA, lncRNA, and tRNA genes with Drosha- and/or Dicer-independent biogenesis [5].

## 5. miRNAs Nomenclature

The recent advances in high-throughput sequences applied to the miRNA discovery have enormously challenged criteria for miRNA annotation. Nomenclature rules are currently defined by miRBase 21 [37] and the mature form of the miRNA fit the form hsa-miR-XX-3p/5p, where the prefix refers to the species (e.g., hsa- for Homo sapiens). When it is written in capitalized letters, “MIR”, refers to the gene that encodes them; and pre-miRNA and pri-miRNA are named as “mir-”. Distinct precursor sequences and genomic loci expressing identical mature sequences get names of the form hsa-mir-121-1 and hsa-mir-121-2 and adding letters as suffixes denotes mature sequences closely related (hsa-miR-121a and hsa-miR-121b) named miR families. Cloning studies sometimes identify two mature sequences originated from the same pre-miRNA. The ratio between the two opposite mature strands can vary depending on developmental stage, being differentially expressed in distinct tissues or cell types, as well as in pathological conditions [5,30]. Previous nomenclature

versions identified the less expressed strand as asterisk \* (hsa-miR-XX \*). However, recent studies have demonstrated that both strands are functional and the ratio between strands depends on the cellular type or status, the annotation criteria was appropriately changed to the current 5p-/3p-end. Apart from the aforementioned miRNA nomenclature, miRBase also identifies mature miRNAs with a MIMAT accession number. From our own experience, we do recommend authors to refer to studied miRNAs in their manuscripts with the current -3p or -5p suffix and also to include the miRBase MIMAT reference and oligonucleotide sequence in order to avoid future misunderstanding that further nomenclature modifications could introduce.

In the light of current discoveries in miRNA origins, biosynthetic pathways, and sequence variants, Desvignes and co-workers proposed a revised miRNA nomenclature criterion in the aim of encompassing recent findings in the field. The authors proposed to modify the miRNA nomenclature not only based on biogenesis but also on their function [5].

## 6. Studying miRNAs

In a classic study of miRNAs, the first aim is to assess the miRNA expression profile comparing a pathological group to a control one. The second step in order to corroborate the profiling results is to validate the expression of some of selected miRNAs in a larger cohort of samples. Finally, it would be interesting to prepare functional assays in order to validate the regulation of a specific mRNA translation by the selected miRNA. Summary of technologies applied in miRNA discovering are listed in Figure 2.

The most employed techniques in order to assess miRNA expression profiles are next generation sequencing and microarrays.

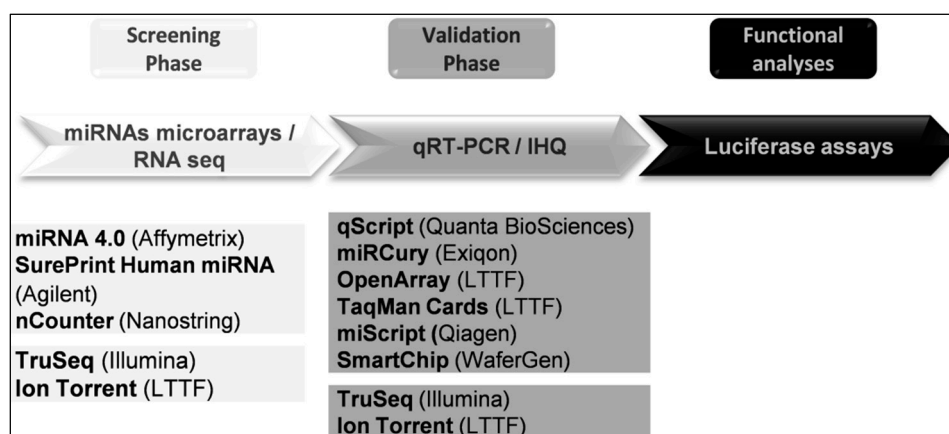


Figure 2. Workflow in a classical study on miRNAs.

### 6.1. RNA Sequencing

Next Generation Sequencing (NGS) was initially developed for sequencing genes faster, cheaper and deeper. The ability to read millions of short fragments of DNA was soon moved into a new methodology, RNAseq, which includes RNA sequencing and quantification. Total RNA from samples is digested and retrotranscribed through ligation of universal primers. cDNA products are then ligated to primer adaptors for NGS and amplified and isolated in single sequencing reactions on a surface containing millions of "nanopore" sequencing reactors. Second generation sequencers are able to detect millions of isolated sequencing reactions and to generate data related to nucleotide sequences and the number of reads of each sequence. The bioinformatic software associated with the NGS sequencer is able to align each short RNA fragment with their corresponding genomic region, building a complete transcript read. Analogous to qPCR, the number of reads obtained in RNAseq protocols is correlated to the original amount of cell RNA together with sequence variant detected

in the alignment. As limitations, the sensibility of NGS is linked to coverage and throughput, so the presence of over-expressed miRNAs can reduce the ability for detecting miRNAs very low expressed.

### 6.2. miRNA Microarrays

Microarrays have been a revolution in genomic and proteomics fields because of their ability to simultaneously detect thousands of molecules. Thereafter, expression assessment moved from particular genes to whole genomic profiles in which miRNA profiles helped to decode the real complexity of pathological models [38]. Microarray technology is based on the link of millions of genomic fragments on a glass support that are used for sample hybridization (Affymetrix, Agilent, Illumina, NanoString). Samples are fluorescently labeled prior to hybridization. Thus, relative signal on each probe reflects the original amount of miRNA in the studied sample. Hundreds of new ncRNAs are described on an annual basis. For this reason, updating and re-designing of non-coding RNA microarray platforms is mandatory. miRNA expression profiles obtained from microarray platforms should be validated by qPCR in a larger number of samples.

Both techniques have demonstrated their ability in measuring a large number of miRNAs, generating a wide amount of results in the discovery phase. However, nowadays the economic cost is still too expensive to employ them in the validation step. Therefore, quantitative PCR is confirmed to be the most accurate technique to validate results from RNAseq or microarrays

### 6.3. Quantitative PCR or Real-Time PCR

Quantitative PCR (qPCR) or Real-Time PCR (RT-PCR) is a fast, easy, and affordable technique for quantification of miRNAs. Different names depend on applications or thermocycler platforms employed. PCR allows working with very few amount of starting RNA. The first step consists in the synthesis of complementary DNA to miRNA through an adapter following a retrotranscription protocol (RT-PCR). The exponential amplification process in RT-PCR is an extremely sensitive and accurate method for detecting molecules at very low level, thus becoming the gold standard method for quantification of miRNAs in biofluids such as plasma or serum. Few limitations can be attributed to this technique, for example, the limited number of molecules detected depending on plate design (96- or 384-well plate). Pre-amplification and amplification increase sensitivity quantification can be biased in low expressed sequences due to diverse protocol steps. On the other hand, normalization can be difficult because, commonly, “housekeeping” molecules that are used as normalizers can be not stably expressed in some models or pathologies. In any case, so far, qPCR is the reference method for expression validation of other techniques in miRNA research [39]. Nowadays, some high-throughput PCR designed plates are called arrays (Applied, Qiagen, Exiqon). These plates include a customized selection of probes ready-to-use in order to quantify a high number of miRNAs from a single sample reducing technical variations.

### 6.4. In Situ Hybridization (ISH) and Live Cell miRNA Detection

Some companies already specialized in miRNA detection have also developed fluorescent or antibody-conjugated colored-coupled probes for *in situ* miRNA detection (Exiqon, Merk-Millipore). These methodologies allow localizing miRNA molecules in cells or tissues, helping to better characterization of its biogenesis, pathways, and activity. Fluorescent-labeled probes show miRNA localization in fixed or live cells and allow, in some assays, to perform flow sorting of cells expressing concrete regulators [40]. During ISH, a locked nucleic acid (LNA) probe hybridizes to the target sequence at elevated temperature, and then the excess probe is washed away. LNA probes are highly sensitive and have been assayed for therapeutically miRNA antisense therapies [41].

## 7. miRNAs as Biomarkers

“Biomarker” definition has been revised by the Biomarker Definitions Working Group in 2001 [42] as “a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indication of normal biologic

processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention". In the "omics" era biomarkers can include clinical scoring systems, proteins, gene expression measurements of mRNA, miRNA, DNA, genetic variants of DNA, or metabolites [43].

With the aim to better understand the pathophysiology of different diseases, several authors have reported miRNA expression profiles characteristic of some pathologies (cardiovascular diseases, cancer, diabetes, sepsis, gynecological diseases) [25,26,28,44,45]. The first approach to define a pathological miRNA expression profile is to assess the miRNA expression pattern in the pathological tissue in order to clarify the molecular mechanisms underlying the disease. In this context, miRNAs have reportedly been found in different body fluids, from urine, serum, and plasma to cerebrospinal fluid [46,47].

The presence of miRNAs in different biofluids could be explained by different mechanisms [39,43,48,49]: (a) passive release of miRNAs as consequence of tissue injury, chronic inflammation, cell apoptosis or necrosis, or from cells with a short half-life, such as platelets; (b) active secretion via cell-derived microvesicles including exosomes microparticles and apoptotic bodies [50–52]; (c) active secretion by cells in miRNA-protein complexes: High Density Lipoprotein (HDL) and Low Density Lipoprotein (LDL) [53] and Ago2 [54]. Interestingly, Arroyo and co-workers suggested that Ago2-associated miRNAs could be ready to regulate gene expression in recipient cells [54]. Mechanisms (b) and (c) could also offer a rationale for the elevated stability of miRNAs in an RNase-rich circulation [49]. In light of this evidence, some authors proposed an hormone-like mechanism of action for these miRNAs [48,49] and a role into cell-to-cell communication [55–58].

Circulating miRNAs, such as the miRNAs released by cancer cells, can bind to Toll-like receptors (TLRs) of immune cells, such as TLR7 in mice or TLR8 in human, to activate NFκB [59,60]. This mechanism could partially explain inflammation related to cancer.

Importantly, Mitchell and co-workers showed the potential of blood miRNAs as biomarkers for prostate cancer [61], paving the way for further characterizations in other pathologies. In addition, the authors demonstrated that miRNAs were protected from endogenous RNase activity [61].

## 8. miRNAs Role in Endometriosis

Different groups, including ours, have studied the potential role of miRNAs in the endometriosis development over years. miRNAs raise as potent regulators of gene expression in the most important systems involved in the pathogenesis of endometriosis. As Figure 3 details, cell survival, matrix remodeling, proliferation, and angiogenesis are essential systems in the pathophysiology of this disease and all of them are potentially regulated by miRNAs [21,22,25,28,62].

## 9. Endometriosis

Endometriosis is a benign estrogen-dependent inflammatory disorder characterized by the presence of endometrial-like tissue outside the uterus. Endometriosis-lesions can be found on the peritoneum (peritoneal lesions), on the ovary either as superficial implants or as endometriotic cysts, and as deeply infiltrative lesions that might extend to the bowel, bladder, and ureter. Pelvic adhesions are often associated with the aforementioned lesions [63]. These lesions are responsible for the main symptoms of endometriosis, pelvic pain and infertility [64]. Whereas innervation at the site of endometriotic lesions is involved in pelvic pain [65], inflammation has been also associated with infertility, what could be explained by a diminished oocyte quality because of their development in an unfavorable environment [66] and also a compromised endometrial receptivity [67].

Endometriosis has been classified as a tumor-like condition by the World Health Organization Histologic Classification of Ovarian Tumors [68]. Indeed, endometriosis shares common features with cancer, as increased local estrogen production, reduced apoptosis, pro-survival, inflammation, tissue invasion, induction of angiogenesis, and dysfunction of immune cells [69]. Since Sampson reported the first case of suspected malignant transformation of ovarian endometriosis [70], several studies have focused on the relationship between endometriosis and gynecological cancers, especially endometrioid and clear cell ovarian carcinoma [71–74]. However, in a recent review, Guo pointed that existing data

is not enough to establish a doubtless causality and highlighted the need for further molecular studies in order to establish an unequivocal phylogenetic relationship between both conditions [69].

Despite its high prevalence and incapacitating symptoms, the exact etiopathogenic mechanism of endometriosis remains unsolved. Burney and Giudice reviewed the theories purposed in recent years with the aim of providing a plausible etiopathogenic mechanism for endometriosis [75]. However, nowadays, the most accepted theory is by far Sampson's retrograde menstruation proposal, which points that during menstruation, endometrial fragments could migrate through fallopian tubes and reach the peritoneum, being capable to attach, survive, and implant at different locations [70]. It has been demonstrated that all these mechanisms responsible for endometriosis development can be regulated by miRNAs as Figure 3 shows.

## 10. Studying New Biomarkers of Endometriosis

The current gold standard for the diagnosis of endometriosis is laparoscopic examination with histological confirmation of glands and/or stroma in the excised lesions [76]. The need for surgical procedure for diagnosis together with the fear of a cancer diagnosis and the assumption of dysmenorrhea as a normal event could explain the aforementioned delay in time to diagnosis [77]. Taking into account that endometriosis has been reported to be progressive in up to 50% of women [78] and more advanced in women with delayed diagnosis [79] efforts are conducted to achieve a noninvasive diagnosis. In this context, several approaches have been undertaken, such as symptom-based tests [80], or blood tests [81–83], but so far neither a non-invasive nor a minimally invasive test has been achieved, remaining as a priority in endometriosis research [84]. Therefore, an ideal test for diagnosis of endometriosis should diagnose patients at initial stages with high sensitivity and specificity.

Due to the anatomical location of this condition, several closely related biofluids have been proposed as a source for noninvasive biomarkers of endometriosis, for instance: urine, plasma/serum, and menstrual blood. In addition, the finding that retrograde menstruation is present in 90% of women but not all of them suffer from endometriosis [67,85] suggests that molecular differences between eutopic endometrium from women with and without endometriosis may exist that lead to the development of the condition in certain women but not in others [67]. As a consequence, if these molecular differences were found to be pathognomonic of the condition they could also provide an opportunity to be considered as biomarkers in biopsied tissues obtained via a minimally invasive procedure.

In the field of miRNAs, differences in miRNA expression between endometriotic lesions and eutopic endometrium from women with endometriosis have been reported [27,86] but few studies have focused in differences between eutopic endometrium from women with and without endometriosis [21,27,87].

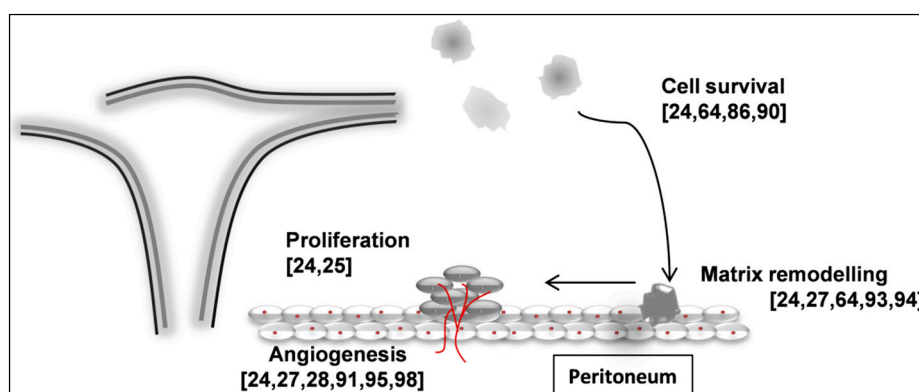
Burney *et al.* published one of the first studies addressing the miRNA expression profile in the endometrium of women with and without endometriosis [21]. In this study, miRNA arrays were performed and after qRT-PCR validation, the authors reported a downregulation of four miRNAs (miR-34c-5p, miR-9, miR-9 \*, miR-34b \*) in the eutopic endometrium from women with endometriosis compared to control endometrium. According to the miRNA regulatory mechanisms, downregulated levels of a miRNA entails the upregulation of its target mRNA translation. Laudanski *et al.* conducted a study enrolling 25 endometriosis-free women and 21 patients with ovarian endometriosis in which the expression of 667 human miRNAs was examined by means of PCR arrays. Validation of the results led to the corroboration that miR-483-5p, a regulator of IGF2, and miR-629-3p, involved in inflammation, were downregulated in the eutopic endometrium of patients in comparison to controls. The authors pointed to the idea that dysregulation of these genes could contribute to the overgrowth of endometrial tissue outside the uterus [87].

Human endometrium is a unique tissue that undergoes complex molecular, cellular, and functional changes on a cyclic basis under ovarian hormone regulation [88–90]. These changes are

essential for uterine receptivity and can be grouped in three distinct phases: proliferative, secretory, and menstrual [90]. Some authors have described that miRNA expression vary across the menstrual cycle [24]. Particularly, miRNAs targeting several cell cycle regulators were over-expressed in the secretory phase [23].

Angiogenesis also plays an important role in the pathogenesis of endometriosis, due that ectopic lesions require neovascularization to proliferate, invade the extracellular matrix and proliferate [27,28,91]. Both Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) and Thrombospondin-1 (TSP-1) represent the most potent pro- and anti-angiogenic factors, respectively, and have been involved in the pathology of endometriosis [92]. Our research group has reportedly observed an increase in the expression of angiogenic and proteolytic factors in endometrial tissues from patients with endometriosis [93,94] and we have suggested that this increase might contribute to the invasive potential of endometrial cells.

The miRNA regulation of angiogenesis has been long reported in several pathologies, including endometriosis [27,28,86,87,95,96]. Two different groups have reported that the angiogenesis regulators, miR-17-5p and miR-20a, are downregulated in the ovarian endometrioma compared to eutopic endometrium [24,87]. The miR-17-92 cluster, also known as oncomir-1, encodes six mature miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a) [97]. Recently, our group has reported that the miR-17-92 cluster increases tumour neovascularization by decreasing TSP-1 expression [98]. Therefore, and due to the miRNA mechanism action, a decrease in miR-17-5p levels involve post-transcriptional upregulation of TSP-1 levels. This mechanism may reduce the angiogenic activity in the ovarian endometrioma; therefore, it could explain the low ability in the extracellular matrix invasion of this tissue observed in these ectopic lesions where frequently the ovarian tissue remains preserved.



**Figure 3.** Main systems affected in endometriosis and the references for the most relevant studies about the role of miRNAs regulating them in this disease in square brackets. Red lines represent new blood vessels in formation and red dots cells nuclei.

## 11. Circulating miRNAs as Biomarkers of Endometriosis

The study of circulating miRNAs as biomarkers of endometriosis is an emerging field of research, and to date only few studies have been published both in serum [82] and plasma [81,83].

Wang *et al.* [99] first performed a circulating miRNA array profiling in two pools of sera from 10 patients with endometriosis and 10 control women. After validation of results from array by qRT-PCR in sera from 60 patients and 25 control women, the authors found that miR-199a and miR-122 levels were upregulated and miR-145 \*, miR-141 \*, miR-542-3p, and miR-9 \* downregulated in samples from patients in comparison to control women and could therefore serve as biomarkers of the disease.

Shortly after, another study in plasma was conducted by Jia *et al.* [81]. 23 women with histologically proven endometriosis and 23 endometriosis-free controls were enrolled in the study and a miRNA microarray profiling was performed. Three out of the six miRNAs selected for validation by



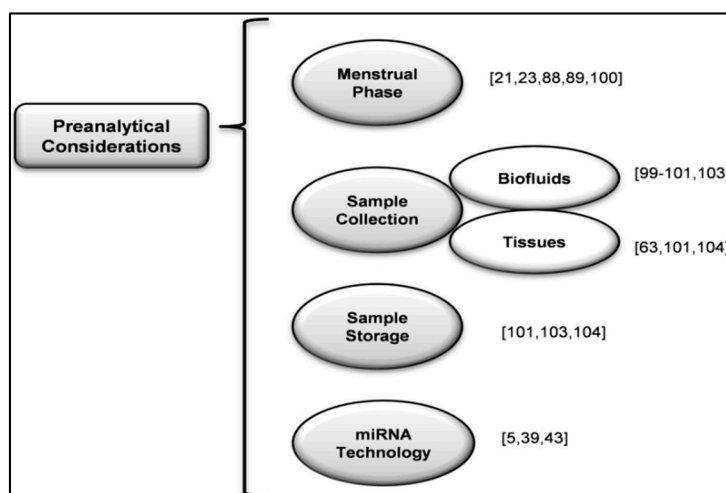
qRT-PCR (miR-17-5p, miR-20a, and miR-22) were proven to be significantly downregulated in patients and useful to discriminate women with endometriosis from patients.

In 2015, two studies have been published, extending the evidence of miRNAs as putative biomarkers of endometriosis in non-invasive biofluids. In the first case, levels of previously endometriosis-associated miRNAs, miR-135a,b and let-7a-f, were quantified in sera of 24 endometriosis patients and 24 control women. By means of a logistic regression approach, researchers found that combining levels of let-7b, let-7d, and let-7f in the proliferative phase obtained the highest area under the curve value in order to discriminate patients with endometriosis from control women. [82]. Of note, several miRNAs were found to be differently expressed depending on the phase of the menstrual cycle in patients but not in controls, in agreement with previous reports [100]. Finally, Rekker *et al* [83] performed the last published study regarding circulating miRNAs as biomarkers of endometriosis. Based on previous literature, authors selected three miRNAs from the miR-200 family (miR-200a-3p, miR-200b-3p, and miR-141-3p) whose expression was assessed in plasma samples from 61 patients and 65 control women. The expression of all three miRNAs was downregulated in patients and miR-200a-3p and miR-141-3p showed the highest potential as noninvasive biomarkers for this benign condition. Remarkably, authors also analyzed variations of the levels of the three miRNAs of interest with time of sampling (morning/evening) finding lower levels in evening samples, perhaps due to circadian fluctuations in their expression. This is an interesting approach and points to the time of sampling as an important factor to be taken into account when performing circulating miRNAs studies.

## 12. Conclusions

Among the epigenetic players, miRNAs have emerged as pivotal post-transcriptional regulators. To do this, these small non-coding RNAs bind to their target mRNAs and inhibit the translation process. The involvement of miRNAs in different pathological conditions has been well established and the miRNA expression profiles have been performed in biopsies from different diseases, including gynecological pathologies as endometriosis. Despite being a benign gynecological pathology, endometriosis deeply impairs the quality of life of affected women in terms of pain and infertility. Nowadays, the gold standard to diagnose endometriosis is laparoscopy. For this reason, several groups including ours are focused on characterizing a non-invasive or semi-invasive biomarker for the diagnosis of endometriosis at initial stages that overcomes the need for the current laparoscopy. Recently, circulating miRNAs have emerged as attractive molecules to be considered as biomarkers [45], although deeper studies are required in order to characterize and validate a miRNA-based diagnostic tool. It is important to highlight the important differences in experimental design and preanalytical protocols among different studies evaluating the same pathology; making it difficult to compare results [40]. For all these reasons, the World Endometriosis Research Foundation (WERF) has published recommendations in order to standardize the data and sample collection, processing and storage [101–104] and reduce the heterogeneity and improve the reproducibility between studies as summarize the Figure 4. It is essential to unify every step in endometriosis research. The first one is data collection; for this purpose the WERF have elaborated a guide for surgical data collection as well as video/photo of symptom documentation [101,102]. Regarding the study of biofluids, the WERF has defined the protocol in order to standardize the biospecimen collection, processing, and storage [103]. Finally, the collection and storage of tissue samples have also been standardized according to the consensus document [104]. All these documents [101–104] allow for unifying the studies performed around the world about endometriosis. The aforementioned guides could be also useful for the study and validation in other diseases; these steps avoid the publication of dissimilar studies performed in the “same” disease but employing different protocols. This could be a simple way to obtain robust conclusions and be able to standardize new biomarkers. However, the study of miRNAs as biomarkers implies additional considerations. As it has been previously described, miRNAs are very stable circulating molecules; however heterogeneity among patients seems to be substantial. This feature is even more evident when results from one study are replicated by other group. Based on our own

experience, pharmacological treatments, clinical conditions, or even diet can affect severely miRNA expression profiles in plasma.



**Figure 4.** Preanalytical considerations for the miRNA study and relevant literature in square brackets in order to obtain robust conclusions in the standardization of new biomarkers in endometriosis.

In conclusion, miRNAs have emerged as new biomarkers valid for diagnostics or prognostics of several diseases. However, standardization in sample and clinical data collection; sample processing and storage; and technical protocols become essential for saving time and money in the assessment of miRNAs as biomarkers.

**Acknowledgments:** This work was supported by FSE, ISCIII and FEDER (PI14/01309 and FI12/00012), RIC (RD12/0042/0029), Aitana Braza-Boïls is a “Sara Borrell” researcher (CD13/0005) and Juan Sandoval is a “Miguel Servet” researcher (CP13/00055), and IIS La Fe (2011-211).

**Author Contributions:** Josep Mari-Alexandre and Dolors Sánchez-Izquierdo have revised the literature, draft the manuscript and prepare some figures. Juan Gilabert-Estellés has written the manuscript. Moisés Barceló-Molina has elaborated some figures and revised the manuscript. Aitana Braza-Boïls and Juan Sandoval conceived and designed the review, written and revised the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **1970**, *227*, 561–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Holley, R.W.; Apgar, J.; Everett, G.A.; Madison, J.T.; Marquisee, M.; Merrill, S.H.; Penswick, J.R.; Zamir, A. Structure of a ribonucleic acid. *Science* **1965**, *147*, 1462–1465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Van Bakel, H.; Nislow, C.; Blencowe, B.J.; Hughes, T.R. Most “dark matter” transcripts are associated with known genes. *PLoS Biol.* **2010**, *18*, e1000371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Phillips, T. Small non-coding RNA and gene expression. *Nat. Educ.* **2008**, *1*, 115.
5. Desvignes, T.; Batze, P.; Berezikov, E.; Eilbeck, K.; Eppig, J.T.; McAndrews, M.S.; Singer, A.; Postlethwait, J.H. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet.* **2015**, *31*, 613–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. The ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **2007**, *447*, 799–816.
7. The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **2012**, *489*, 57–74.
8. Nardone, J.; Lee, D.U.; Ansel, K.M.; Rao, A. Bioinformatics for the “bench biologist”: How to find regulatory regions in genomic DNA. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 768–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Li, C.C.; Ramirez-Carrozzi, V.R.; Smale, S.T. Pursuing gene regulation “logic” via RNA interference and chromatin immunoprecipitation. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 692–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Ozsolak, F.; Poling, L.L.; Wang, Z.; Liu, H.; Liu, X.S.; Roeder, R.G.; Zhang, X.; Song, J.S.; Fisher, D.E. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* **2008**, *15*, 3172–3183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Visel, A.; Rubin, E.M.; Pennacchio, L.A. Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature* **2009**, *10*, 199–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Noonan, J.P.; McCallion, A.S. Genomics of long-range regulatory elements. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2010**, *11*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Christov, C.P.; Gardiner, T.J.; Szüts, D.; Krude, T. Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 6993–7004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhang, A.T.; Langley, A.R.; Christov, C.P.; Kheir, E.; Shafee, T.; Gardiner, T.J.; Krude, T. Dynamic interaction of Y RNAs with chromatin and initiation proteins during human DNA replication. *J. Cell Sci.* **2011**, *15*, 2058–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Roberts, T.C. The MicroRNA biology of the mammalian nucleus. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *19*, e188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *3*, 843–854. [[CrossRef](#)]
17. Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**, *116*, 281–297. [[CrossRef](#)]
18. Eulalio, A.; Huntzinger, E.; Izaurralde, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **2008**, *132*, 9–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bartel, D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* **2009**, *23*, 215–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ambros, V.; Bartel, B.; Bartel, D.P.; Burge, C.B.; Carrington, J.C.; Chen, X.; Dreyfuss, G.; Eddy, S.R.; Griffiths-Jones, S.; Marshall, M.; *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **2003**, *9*, 277–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Burney, R.O.; Hamilton, A.E.; Aghajanova, L.; Vo, K.C.; Nezhat, C.N.; Lessey, B.A.; Giudice, L.C. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with *versus* without endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* **2009**, *15*, 625–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ohlsson-Teague, E.M.; van der Hoek, K.H.; van der Hoek, M.B.; Perry, N.; Wagaarachchi, P.; Robertson, S.A.; Print, C.G.; Hull, L.M. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol. Endocrinol.* **2009**, *23*, 265–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kuokkanen, S.; Chen, B.; Ojalvo, L.; Benard, L.; Santoro, N.; Pollard, J.W. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol. Reprod.* **2010**, *82*, 791–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ohlsson-Teague, E.M.; Print, C.G.; Hull, M.L. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum. Reprod. Update* **2010**, *16*, 142–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gilabert-Estellés, J.; Braza-Boils, A.; Ramon, L.A.; Zorio, E.; Medina, P.; España, F.; Estellés, A. Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2406–2413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ramón, L.A.; Braza-Boils, A.; Gilabert, J.; Chirivella, M.; España, F.; Estellés, A.; Gilabert-Estellés, J. microRNAs related to angiogenesis are dysregulated in endometrioid endometrial cancer. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 3036–3045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Braza-Boils, A.; Marí-Alexandre, J.; Gilabert, J.; Sánchez-Izquierdo, D.; España, F.; Estellés, A.; Gilabert-Estellés, J. MicroRNA expression profile in endometriosis: Its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 978–988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Marí-Alexandre, J.; García-Oms, J.; Barceló-Molina, M.; Gilabert-Aguilar, J.; Estellés, A.; Braza-Boils, A.; Gilabert-Estellés, J. MicroRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thromb. Res.* **2015**, *135*, S38–S40. [[CrossRef](#)]
29. Lund, E.; Güttinger, S.; Calado, A.; Dahlberg, J.E.; Kutay, U. Nuclear export of MicroRNA precursors. *Science* **2004**, *303*, 95–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Meijer, H.A.; Smith, E.M.; Bushell, M. Regulation of miRNA strand selection: Follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1135–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Machlin, E.S.; Sarnow, P.; Sagan, S.M. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *22*, 3193–3198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Neilsen, C.T.; Goodall, G.J.; Bracken, C.P. IsomiRs: The overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet.* **2012**, *28*, 544–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Westholm, J.O.; Lai, E.C. Mirtrons: MicroRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **2011**, *93*, 1897–1904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rodriguez, A.; Griffiths-Jones, S.; Ashurst, J.L.; Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1902–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Baskerville, S.; Bartel, D.P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* **2005**, *11*, 241–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gregory, R.I.; Shiekhattar, R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3509–3512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. A uniform system for microRNA annotation. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 68–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hacia, J.G.; Fan, J.B.; Ryder, O.; Jin, L.; Edgemon, K.; Ghandour, G.; Mayer, R.A.; Sun, B.; Hsie, L.; Robbins, C.M.; *et al.* Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 164–167. [[PubMed](#)]
39. Zampetaki, A.; Mayr, M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb. Haemost.* **2012**, *108*, 592–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Urbanek, M.O.; Nawrocka, A.U.; Krzyzosiak, W.J. Small RNA Detection by in Situ Hybridization Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 13259–13286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Franciscus, A. A Brief History of Hepatitis C. *Hepat. C Support Proj. Fact Sheet* **2015**, *12*, 1–8.
42. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2001**, *69*, 89–95.
43. Mayr, M.; Zampetaki, A.; Willeit, P.; Willeit, J.; Kiechl, S. MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 206–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zorio, E.; Medina, P.; Rueda, J.; Millán, J.M.; Arnau, M.A.; Beneyto, M.; Marín, F.; Gimeno, J.R.; Osca, J.; Salvador, A.; *et al.* Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: From biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2009**, *7*, 82–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wittmann, J.; Jäck, H.M. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1806*, 200–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Weber, J.A.; Baxter, D.H.; Zhang, S.; Huang, D.Y.; Huang, K.H.; Lee, M.J.; Galas, D.J.; Wang, K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 1733–1741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Silva, S.S.; Lopes, C.; Teixeira, A.L.; Carneiro de Sousa, M.J.; Medeiros, R. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci. Int. Genet.* **2015**, *14*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cortez, M.A.; Bueso-Ramos, C.; Ferdin, J.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A.K.; Calin, G.A. MicroRNAs in body fluids: The mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 467–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Shah, M.Y.; Calin, G.A. The Mix of Two Worlds: Non-Coding RNAs and Hormones. *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 2–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hunter, M.P.; Ismail, N.; Zhang, X.; Aguda, B.D.; Lee, E.J.; Yu, L.; Xiao, T.; Schafer, J.; Ting Lee, M.L.; Schmittgen, T.D.; *et al.* Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zerneck, A.; Bidzhekov, K.; Noels, H.; Shagdarsuren, E.; Gan, L.; Denecke, B.; Hristov, M.; Köppel, T.; Jahantigh, M.N.; Lutgens, E.; *et al.* Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* **2009**, *8*, ra81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Vickers, K.C.; Palmisano, B.T.; Shoucri, B.M.; Shamburek, R.D.; Remaley, A.T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 423–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Arroyo, J.D.; Chevillet, J.R.; Kroha, E.M.; Rufa, I.K.; Pritchard, C.C.; Gibson, D.F.; Mitchell, P.S.; Bettegato, C.F.; Pogosova-Agadjanyan, E.L.; Stirewalt, D.L.; *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Prot. Nat. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 5003–5008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Zampetaki, A.; Willeit, P.; Drozdov, I.; Kiechl, S.; Mayr, M. Profiling of circulating microRNAs: From single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *3*, 555–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kosaka, N.; Yoshioka, Y.; Hagiwara, K.; Tominaga, N.; Katsuda, T.; Ochiya, T. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front. Genet.* **2013**, *4*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Turchinovich, A.; Samatov, T.R.; Tonevitsky, A.G.; Burwinkel, B. Circulating miRNAs: Cell-cell communication function? *Front. Genet.* **2013**, *4*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bang, C.; Batkai, S.; Dangwal, S.; Gupta, S.K.; Foinquinos, A.; Holzmann, A.; Just, A.; Remke, J.; Zimmer, K.; Zeug, A.; *et al.* Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 2136–2146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Fabbri, M. TLRs as miRNA Receptors. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 6333–6337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fabbri, M.; Paone, A.; Calore, F.; Galli, R.; Gaudio, E.; Santhanam, R.; Lovat, F.; Fadda, P.; Mao, C.; Nuovo, G.J.; *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2110–E2116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Mitchell, P.S.; Parkin, R.K.; Kroh, E.M.; Fritz, B.R.; Wyman, S.K.; Pogosova-Agadjanyan, E.L.; Peterson, A.; Noteboom, J.; O'Briant, K.C.; Allen, A.; *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Prot. Nat. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 10513–10518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hawkins, S.M.; Creighton, C.J.; Han, D.Y.; Zariff, A.; Anderson, M.L.; Gunaratne, P.H.; Matzuk, M.M. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol. Endocrinol.* **2011**, *25*, 821–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nisolle, M.; Donnez, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.* **1997**, *68*, 585–596. [[CrossRef](#)]
64. Giudice, L.C. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 2389–2398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Berkley, K.J.; Rapkin, A.J.; Papka, R.E. The pains of endometriosis. *Science* **2005**, *308*, 1587–1589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Stille, J.A.; Birt, J.A.; Sharpe-Timms, K.L. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell Tissue Res.* **2012**, *349*, 849–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Giudice, L.C.; Kao, L.C. Endometriosis. *Lancet* **2004**, *364*, 1789–1799. [[CrossRef](#)]
68. Scully, R.E. Classification of human ovarian tumors. *Environ. Health Perspect.* **1987**, *73*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Guo, S.W. Endometriosis and ovarian cancer: Potential benefits and harms of screening and risk-reducing surgery. *Fertil. Steril.* **2015**, *104*, 813–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Sampson, J. Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ. *Arch. Surg.* **1925**, *10*, 1–72. [[CrossRef](#)]
71. Wei, J.J.; William, J.; Bulun, S. Endometriosis and ovarian cancer: A review of clinical, pathologic, and molecular aspects. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2011**, *30*, 553–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Munksgaard, P.S.; Blaakaer, J. The association between endometriosis and ovarian cancer: A review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol. Oncol.* **2012**, *124*, 164–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Worley, M.J.; Welch, W.R.; Berkowitz, R.S.; Ng, S.W. Endometriosis-associated ovarian cancer: A review of pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5367–5379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Siufi-Neto, J.; Kho, R.M.; Siufi, D.F.; Baracat, E.C.; Anderson, K.S.; Abrão, M.S. Cellular, histologic, and molecular changes associated with endometriosis and ovarian cancer. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **2014**, *21*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Burney, R.O.; Giudice, L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* **2012**, *98*, 511–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Dunselman, G.A.; Vermeulen, N.; Becker, C.; Calhaz-Jorge, C.; D'Hooghe, T.; De Bie, B.; Heikinheimo, O.; Horne, A.W.; Kiesel, L.; Nap, A.; *et al.* European Society of Human Reproduction and Embryology. ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 400–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Ballard, K.; Lowton, K.; Wright, J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertil. Steril.* **2006**, *86*, 1296–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Fassbender, A.; Vodolazkaia, A.; Saunders, P.; Lebovic, D.; Waelkens, E.; De Moor, B.; D'Hooghe, T. Biomarkers of endometriosis. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 1135–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. D'Hooghe, T.M.; Debrock, S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum. Reprod. Update* **2002**, *8*, 84–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Nnoaham, K.E.; Hummelshoj, L.; Kennedy, S.H.; Jenkinson, C.; Zondervan, K.T. Developing symptom-based predictive models of endometriosis as a clinical screening tool: Results from a multicenter study. *Fertil. Steril.* **2012**, *98*, 692–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Jia, S.Z.; Yang, Y.; Lang, J.; Sun, P.; Leng, J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 322–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Cho, S.; Mutlu, L.; Grechukhina, O.; Taylor, H.S. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertil. Steril.* **2015**, *103*, 1252–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Rekker, K.; Saare, M.; Roost, A.M.; Kaart, T.; Sõritsa, D.; Karro, H.; Sõritsa, A.; Simón, C.; Salumets, A.; Peters, M. Circulating miR-200-family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertil. Steril.* **2015**, *104*, 938–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Rogers, P.A.; D'Hooghe, T.M.; Fazleabas, A.; Gargett, C.E.; Giudice, L.C.; Montgomery, G.W.; Rombauts, L.; Salamonsen, L.A.; Zondervan, K.T. Priorities for endometriosis research: Recommendations from an international consensus workshop. *Reprod. Sci.* **2009**, *16*, 335–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Halme, J.; Hammond, M.G.; Hulka, J.F.; Raj, S.G.; Talbert, L.M. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* **1984**, *64*, 151–154. [[PubMed](#)]
86. Filigheddu, N.; Gregnanin, I.; Porporato, P.; Surico, D.; Perego, B.; Galli, L.; Patrignani, C.; Graziani, A.; Surico, N. Differential expression of micrnas between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*, 369549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Laudanski, P.; Charkiewicz, R.; Kuzmicki, M.; Szamatowicz, J.; Charkiewicz, A.; Niklinski, J. MicroRNAs expression profiling of eutopic proliferative endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Houshdaran, S.; Zelenko, Z.; Irwin, J.C.; Giudice, L.C. Human endometrial DNA methylome is cycle-dependent and is associated with gene expression regulation. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28*, 1118–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Munro, S.K.; Farquhar, C.M.; Mitchell, M.D.; Ponnampalam, A.P. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *16*, 297–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Harada, T.; Kaponis, A.; Iwabe, T.; Taniguchi, F.; Makrydimas, G.; Sofikitis, N.; Paschopoulos, M.; Paraskevaidis, E.; Terakawa, N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum. Reprod. Update* **2004**, *10*, 29–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Rocha, A.L.; Reis, F.M.; Taylor, R.N. Angiogenesis and endometriosis. *Obstet. Gynecol. Int.* **2013**, *2013*, 859619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Laschke, M.W.; Menger, M.D. *In vitro* and *in vivo* approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum. Reprod. Update* **2007**, *13*, 331–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Gilabert-Estelles, J.; Estelles, A.; Gilabert, J.; Castelló, R.; España, F.; Falcó, C.; Romeu, A.; Chirivella, M.; Zorio, E.; Aznar, J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum. Reprod.* **2003**, *18*, 1516–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Gilabert-Estelles, J.; Ramon, L.A.; Espana, F.; Gilabert, J.; Vila, V.; Réganon, E.; Castelló, R.; Chirivella, M.; Estellés, A. Expression of angiogenic factors in endometriosis: Its relation to fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 2120–2127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Caporali, A.; Emanuelli, C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* **2011**, *55*, 79–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Braza-Boils, A.; Salloum-Asfar, S.; Marí-Alexandre, J.; Arroyo, A.B.; González-Conejero, R.; Barceló-Molina, M.; García-Oms, J.; Vicente, V.; Estellés, A.; Gilabert-Estelles, J.; *et al.* Peritoneal fluid modifies the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis. *Hum. Reprod.* **2015**, *30*, 2292–2302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Olive, V.; Jiang, I.; He, L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 1348–1354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Braza-Boils, A.; Gilabert-Estelles, J.; Ramón, L.A.; Gilabert, J.; Marí-Alexandre, J.; Chirivella, M.; España, F.; Estellés, A. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Wang, W.T.; Zhao, Y.N.; Han, B.W.; Hong, S.J.; Chen, Y.Q. Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 281–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Rekker, K.; Saare, M.; Roost, A.M.; Salumets, A.; Peters, M. Circulating microRNA profile throughout the menstrual cycle. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Becker, C.M.; Laufer, M.R.; Stratton, P.; Hummelshoj, L.; Missmer, S.A.; Zondervan, K.T.; Adamson, G.D.; WERF EPHeC Working Group. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1213–1222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Vitonis, A.F.; Vincent, K.; Rahmioglu, N.; Fassbender, A.; Buck Louis, G.M.; Hummelshoj, L.; Giudice, L.C.; Stratton, P.; Adamson, G.D.; Becker, C.M.; *et al.* World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: II. Clinical and covariate phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1223–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Rahmioglu, N.; Fassbender, A.; Vitonis, A.F.; Tworoger, S.S.; Hummelshoj, L.; D'Hooghe, T.M.; Adamson, G.D.; Giudice, L.C.; Becker, C.M.; Zondervan, K.T.; *et al.* World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: III. Fluid biospecimen collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1233–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Fassbender, A.; Rahmioglu, N.; Vitonis, A.F.; Viganò, P.; Giudice, L.C.; D'Hooghe, T.M.; Hummelshoj, L.; Adamson, G.D.; Becker, C.M.; Missmer, S.A.; *et al.* World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: IV. Tissue collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1244–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Micro-RNA profile and proteins in peritoneal fluid from women with endometriosis: their relationship with sterility

Josep Marí-Alexandre, B.Sc.,<sup>a</sup> Moisés Barceló-Molina, B.Sc.,<sup>a</sup> Elisa Belmonte-López, B.Sc.,<sup>a</sup> Javier García-Oms, M.D., Ph.D.,<sup>b</sup> Amparo Estellés, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Aitana Braza-Boils, Ph.D.,<sup>a</sup> and Juan Gilabert-Estellés, M.D., Ph.D.<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Cardiopatías Familiares, Muerte Súbita y Mecanismos de Enfermedad (CaFaMuSMe) Unit, Health Research Institute La Fe, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>b</sup> Endoscopy and Gynecologic Oncology Unit, Hospital General Universitario, Valencia, Spain; and <sup>c</sup> Department of Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain

**Objective:** To define the microRNA (miRNA) profile and its relationship with cytokines content in peritoneal fluid (PF) from endometriosis patients.

**Design:** Case-control study.

**Setting:** University hospital, research institute.

**Patient(s):** One hundred twenty-six women with endometriosis (EPF) and 45 control women (CPF).

**Main Outcomes Measure(s):** MiRNA arrays were prepared from six EPF and six CPF. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction validation of nine selected miRNAs (miR-29c-3p, -106b-3p, -130a-3p, -150-5p, -185-5p, -195-5p, -451a, -486-5p, and -1343-5p) was performed. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), thrombospondin-1 (TSP-1), urokinase plasminogen activator (uPA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP3), tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1), interleukin (IL)-6, IL-8, IL-17A, macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  (MIP1beta), platelet-derived growth factor  $\alpha$ -polypeptide A, and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) were quantified by ELISA and MILLIPLEX.

**Result(s):** MiRNA arrays showed 126 miRNAs differentially expressed (fold change  $\pm 1.2$ ) (78 down-regulated, 48 up-regulated) in EPF. Validation showed higher levels of miR-106b-3p, -451a, -486-5p, IL-6, IL-8, uPA, and TIMP-1 in EPF. In menstrual phase, EPF presented up-regulation of miR-106b-3p, -130a-3p, -150-5p, -185-5p, -451a, -486-5p, VEGF-A, IL-8, MIF 1 $\beta$ , uPA, and PAI-1 compared with other phases; however, CPF did not. MiRNA-486-5p was up-regulated in sterile EPF compared with sterile controls, and VEGF-A, IL-8, and TIMP-1 were increased in sterile and fertile EPF compared with fertile CPF.

**Conclusion(s):** MiRNAs seem to be involved in the peritoneal alterations in endometriosis, suggesting new mechanisms by which ectopic lesions could implant in endometriosis patients; and to serve as biomarkers for fertility outcome prediction. (Fertil Steril® 2018;109:675-84. ©2017 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Angiogenesis, endometriosis, inflammation, microRNA, peritoneal fluid

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and other readers at <https://www.fertstertdialog.com/users/16110-fertility-and-sterility/posts/24936-25220>

**E**ndometriosis is characterized by the presence of endometrial-like tissues in extrauterine locations, mainly within the peritoneum and ovaries. The management of this disease ranges from medical therapies, which are focused on symptomatology but limit the fertility status, to the surgical approach, which is addressed to

Received October 27, 2017; revised and accepted November 28, 2017; published online March 28, 2018.

J.M.-A. reports grants from Fundación Española de Trombosis y Hemostasia, during the conduct of the study; A.B.-B. reports grants from Roche Pharma Spain, during the conduct of the study. J.G.-E. reports grants from Instituto de Salud Carlos III-Fondos FEDER, during the conduct of the study. M.B.-M. has nothing to disclose. E.B.-L. has nothing to disclose. J.G.-O. has nothing to disclose. A.E. has nothing to disclose.

This work has been supported by "Instituto de Salud Carlos III" and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Unión europea, Una manera de hacer Europa" (PI14/01309, PI17/01945); J.M.-A. is supported by a Fundación Española de Trombosis y Hemostasia (FETH)-2016 Grant and A.B.-B. by Roche Farma España "Stop Brain Drain"-IIS La Fe (2017/0055).

J.M.-A. and M.B.-M should be considered similar in author order.

Reprint requests: Aitana Braza-Boils, Ph.D., University Hospital La Fe, Health Research Institute La Fe, Av. Fernando Abril Martorell 106, Valencia 46026, Spain (E-mail: [aitana\\_braza@iislafe.es](mailto:aitana_braza@iislafe.es)).

Fertility and Sterility® Vol. 109, No. 4, April 2018 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2017 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.036>



eliminate ectopic lesions but implies invasive procedures (1–3). Endometriosis is still one of the most incapacitating diseases for women owing to the classic symptoms (dysmenorrhea, dyspareunia, dyschezia, dysuria) and is one of the most important etiologies of sterility and poor results of assisted reproductive techniques. Consequences of this disease deeply affect women's quality of life and imply an increasing economic and social burden. Simoens et al. (4) calculated the costs related to endometriosis care by means of a prospective, multicenter, questionnaire-based survey in ambulatory care in 12 centers in 10 countries enrolling 909 women, and they concluded that the average annual cost per woman was €9,579. This amount increased in parallel with severity of endometriosis and years of delayed diagnosis.

Despite its high incidence, prevalence, and its incapacitating symptoms, the etiopathogenic mechanisms of this benign gynecologic disease remain under study. Several theories have attempted to explain the biological events that could explain the presence of endometrial-like stroma and glands in the peritoneal cavity (1). Among them, the retrograde menstruation theory, described by Sampson in 1927 (5), is by far the most accepted proposal. According to this, in 90% of women during their menses (6), endometrial fragments migrate through the fallopian tubes and reach the peritoneum. Whereas women without endometriosis eliminate by physiologic mechanisms, patients with endometriosis are incapable of eliminating these fragments, which are able to implant, survive, and proliferate at different locations (3, 5, 6). Because of this, studying the peritoneal microenvironment of women with endometriosis becomes essential, to reveal the biological alterations responsible for the proliferation of endometriotic implants characteristic of patients with endometriosis.

Our research group has reported the regulatory potential of peritoneal fluid (PF) in patients with endometriosis (7–9). In these studies we described, for the first time, the alteration of the angiogenic state of stromal cells after being treated with endometriotic peritoneal fluid (EPF), enhancing the expression of the main angiogenic factors (7, 8) as well as the expression of microRNA (miRNA) regulators of angiogenesis (8, 9). This was performed by means of an *in vitro* model of endometriosis in which primary stromal cells from control women and patients were exposed to PF from controls (CPF) and patients (EPF).

MiRNAs are small noncoding RNAs (21–23 nt) able to inhibit the translation of their target genes by binding to their messenger RNA 3' untranslated region (3, 10). This posttranscriptional regulation occurs in both physiologic and pathologic conditions, including endometriosis (3, 11–15).

The proinflammatory state of EPF is well known, characterized by an enhanced number of peritoneal macrophages, T and B lymphocytes, and platelets (16–18). These cells, among others, are responsible for the elevated levels of such cytokines as vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, IL-17A, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (2, 6, 17, 19–21). Moreover, a higher presence of neutrophil extracellular traps (NETs) has been reported in EPF in comparison with CPF (22).

MiRNAs have been described to be present in all biofluids, including PF, because of their role as intercellular communicators in a paracrine way (23–26). They have even been assessed as predictors of peritoneal metastasis in patients with gastric cancer, owing to their important role as cancer dissemination signals (27).

In the present study we aimed to characterize, for the first time, the miRNA profile in PF from patients with endometriosis, its relationship with the altered proangiogenic and proinflammatory state of the peritoneal microenvironment, and its potential influence on fertility status.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all patients and control women, and the study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain (#2008/0111) and Hospital General Universitario, Valencia, Spain, where patients and controls were recruited (#PBL00093).

### Clinical Groups

Extended inclusion and exclusion criteria are provided in the [Supplemental Material](#), available online.

**Endometriosis patients.** A total of 126 Caucasian women with minimal–mild (stages I–II) or moderate–severe endometriosis (stages III–IV) (28) were studied. Sterility was observed in 54% ( $n = 68$  of 126) of the endometriosis group.

**Control nonendometriosis group.** A total of 45 women without endometriosis were enrolled in the study. Sterility was observed in 49% ( $n = 22$  of 45) of the non-endometriosis group, in which the indication for surgery was diagnostic laparoscopy to examine tubal patency. Control PF from fertile women ( $n = 23$ ) was obtained while they were undergoing laparoscopic tubal sterilization.

The menstrual phase was identified according to sera hormonal analysis on the day of surgery and before the induction of anesthesia. Forty-seven percent of women with endometriosis were in the proliferative phase ( $n = 59$ ), 44% in the secretory phase ( $n = 55$ ), and 9% in the menstrual phase of the cycle ( $n = 12$ ). Whereas 49% of the women without endometriosis were in the proliferative phase ( $n = 22$ ), 42% were in the secretory phase ( $n = 19$ ) and 9% in the menstrual phase of the cycle ( $n = 4$ ).

### Peritoneal Fluid Samples

Blood-contaminated PF samples were excluded. Peritoneal washings were not performed before collection of PFs, nor were anticoagulants used. The PF was immediately cleared of cells and cell debris by centrifugation at  $1,500 \times g$  for 30 minutes at 4°C and stored at –80°C until processing.

A total of 126 PF samples from women with endometriosis (EPF) (mean age 32.4 years; range, 20–47 years) and 45 PF samples from women without endometriosis (CPF) (mean age 36.1 years; range, 28–47) were studied.

## RNA Extraction

Total RNA was extracted from PF samples with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, #217004) according to the manufacturer's recommendations, with minor modifications. MS2 RNA (Roche, #10165948001) and cel-miR-39-3p mimic (Qiagen, #219610) were spiked-in as carrier and exogenous control, respectively. Quality of RNA for miRNA expression arrays was assessed using the Agilent Bioanalyzer 6000 (Agilent Technologies).

## Analysis of miRNA Expression Profiles

MiRNA expression profiles were performed in six PF samples from women with endometriosis (two in each cycle phase) and 6 PF samples from women without endometriosis (two in each cycle phase) paired by age and day of the menstrual cycle. MiRNA expression profiles were performed using GeneChip miRNA 4.0 arrays of the Affymetrix platform according to the manufacturer's protocol. This array contains 2,578 probes for mature human miRNAs and 1,908 probes for their precursors. Arrays were prepared in the Array Service of our institution (IIS La Fe, Valencia, Spain). Data analysis was performed using Partek Genomic Suite software and normalized using the robust multiarray analysis algorithm. Statistical analysis of variance (ANOVA) allowed us to generate a list of differentially expressed miRNAs with  $\pm 1.2$  fold change (FC) and  $P$  values  $< .05$ .

## Validation Phase

To corroborate results obtained from the array by real-time quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR), a validation phase was focused on 9 miRNAs whose targets were implicated in angiogenesis, proteolysis, inflammation, or endometriosis on the basis of previous results from our group (miR-29c-3p, -106b-3p, -130a-3p, -150-5p, -185-5p, -195-5p, -451a, -486-5p, and -1343-5p). Cel-miR-39-3p served as exogenous normalizer. Quantitative RT-PCR was performed by the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR kit (Exiqon) using a LightCycler 480 II thermocycler (Roche Applied Science).

## Protein Quantification

Levels of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), thrombospondin-1 (TSP-1), urokinase plasminogen activator (uPA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) were quantified by commercial ELISAs. Levels of interleukins (IL-6, IL-8, IL-17A), macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  (MIP1 $\beta$ ), platelet-derived growth factor- $\alpha$  polypeptide A (PDGF-AA), and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) were quantified using the MILLIPLEX MAP assay kit (Millipore Canada) in the Milliplex Service from our institution (IIS La Fe, Valencia, Spain). Both techniques were performed according to the manufacturer's instructions. Extended information about ELISA kits can be found in the [Supplemental Material](#).

## Statistical Analysis

All variables were checked for normal distribution by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Differences in the studied variables between two groups were analyzed using the unpaired Student  $t$  test or Mann-Whitney  $U$  test, when appropriate. Differences in the studied variables among several groups were analyzed by a one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, when appropriate.

MiRNA data quantified by real-time qRT-PCR are presented as FC relative to women without endometriosis group (CPF = 1). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

Levels of significance in correlations between variables were calculated by the bivariate Pearson correlation test.  $P$  values of  $< .05$  (two-tailed) were considered significant. All these tests were performed using the statistical package SPSS release 20 for Windows (IBM).

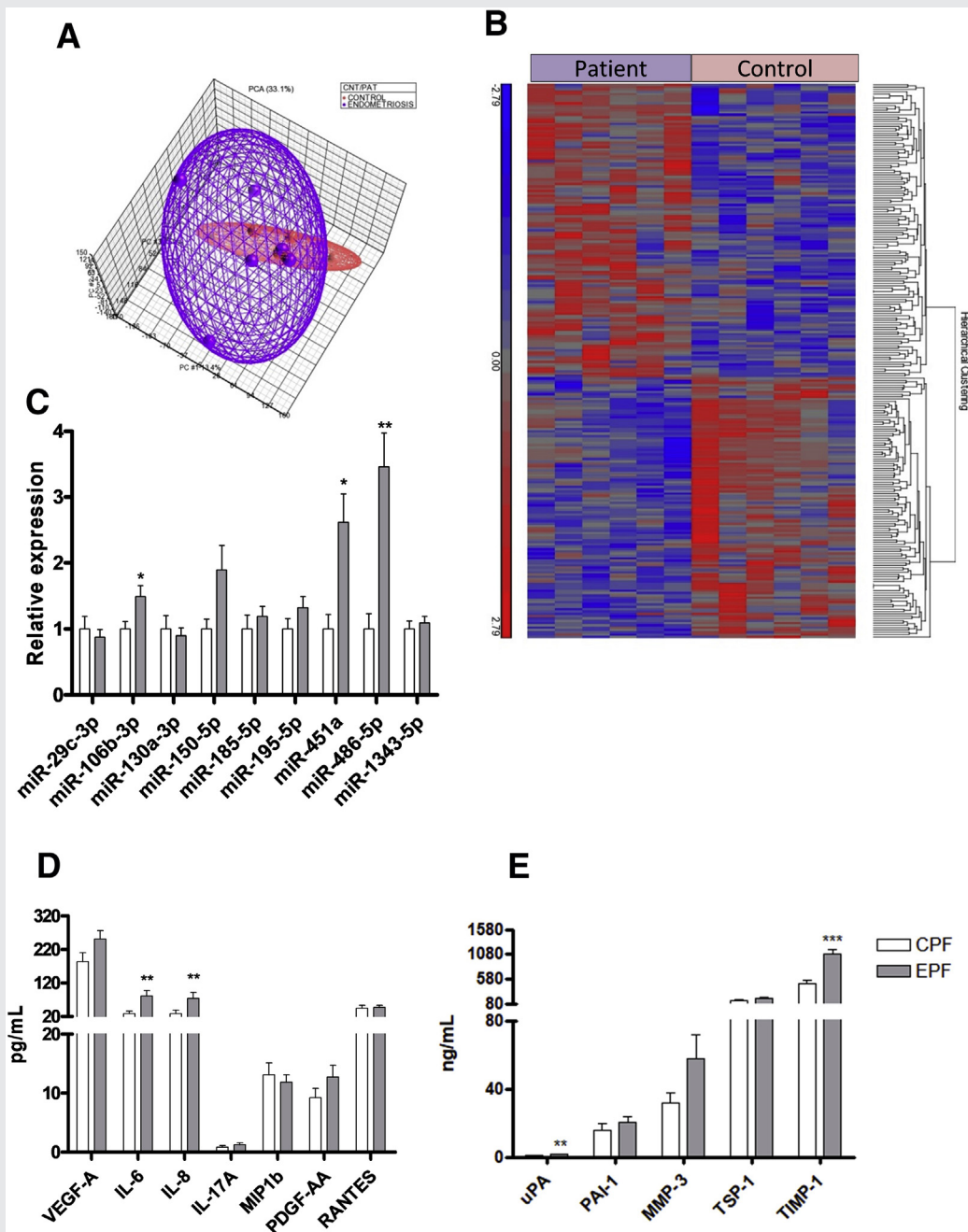
## RESULTS

### Analysis According to the Presence of Endometriosis

**Characteristic miRNA profile in PF from patients with endometriosis.** Profiling of miRNAs was completed in six PF samples from patients (two in each cycle phase) and in PF samples from six control women (two in each cycle phase). Principal component analysis graphically represents similarities and divergences among samples and, when factor "patient" was taken into account, the endometriosis group showed higher dispersion in terms of miRNA content (Fig. 1A). Data were analyzed by ANOVA according to disease status, by which 126 mature miRNAs were found significantly differentially expressed ( $P < .05$ ; FC  $\pm 1.2$ ) (78 down-regulated and 48 up-regulated) between endometriosis patients and control women (Supplemental Table 1). The aforementioned 126 miRNAs were represented by a supervised hierarchical clustering demonstrating a different expression pattern between patients' and controls' PF (Fig. 1B). To better identify the magnitude of change, a volcano plot was performed representing the FC [ $\log_2(\text{ratio endometriosis/control})$ ] vs.  $P$  value of every mature studied miRNA (Supplemental Fig. 1A).

We next performed an "in silico" study to identify both the predicted and/or validated target genes of those miRNAs differentially expressed, to investigate which of these 126 miRNAs might regulate the expression of the most important factors involved in angiogenesis, proteolysis, and inflammation, and which of them could be implicated in endometriosis. This analysis led us to select nine miRNAs for validation by qRT-PCR in a larger cohort of samples. Among the selected miRNAs, three (miR-106b-3p, -451a, and -486-5p) were significantly up-regulated in EPF, and two miRNAs (miR-29c-3p and -1343-5p) were significantly down-regulated (Supplemental Fig. 1A and Supplemental Table 1). Although no significant differences were observed in miRNA arrays, miR-130a-3p, -150-5p, -185-5p, and -195-5p were also selected for qRT-PCR validation on the basis of previous results from our group (9), which demonstrated their down-regulation in stromal cells from endometrium from patients with endometriosis after being treated with EPF.

**FIGURE 1**



MicroRNA and protein levels in CPF and EPF. (A) Principal component analysis comparing miRNA patterns between patients with endometriosis and control women; (B) supervised hierarchical cluster; (C) miRNA levels in EPF and without CPF; (D, E) protein levels in CPF and EPF. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. MicroRNA expression is presented as FC relative to women without endometriosis (CPF = 1). \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$  vs. CPF.

Mari-Alexandre. Peritoneal fluid miRNAs in endometriosis. *Fertil Steril* 2017.

**Validation of selected miRNAs by qRT-PCR.** We detected significantly higher levels of miR-106b-3p, miR-451a, and miR-486-5p in EPF compared with CPF (Fig. 1C). Increased levels of miR-150-5p were also detected, although differences did not reach statistical significance.

**Protein levels in EPF compared with CPF.** Aiming to explore the inflammatory and angiogenic status of the PF in endometriosis patients, the most relevant proinflammatory and angiogenic proteins were quantified in all samples. As shown in Figure 1D and 1E, IL-6, IL-8, uPA, and TIMP-1 levels were



**Validation of miRNA levels in EPF and CPF according to the cycle phases.** No significant differences were observed in CPF miRNA levels through any cycle phase. However, in the menstrual phase, EPF presented significantly higher levels of miR-106b-3p, -130a-3p, -150-5p, -451a, and -486-5p compared with the secretory and proliferative phases. Endometrial PF miR-29c-3p, -185-5p, and -195-5p levels were significantly up-regulated in the menstrual phase in comparison with the secretory phase. Additionally, EPF levels of miR-486-5p in the menstrual phase were significantly higher than levels in CPF (Fig. 2B).

**Protein levels according to the cycle phases.** Whereas VEGF-A, IL-8, MIP1 $\beta$ , uPA, and PAI-1 were significantly up-regulated during the menstrual phase compared with the proliferative phase in EPF, CPF did not significantly modify their levels through these menstrual phases. Moreover, EPF VEGF-A, uPA, PAI-1, and MMP-3 levels in the menstrual phase were significantly higher in comparison with the secretory phase; in contrast, IL-17A was down-regulated. Finally, when EPF was compared with CPF, the cytokines IL-6, IL-8, and IL-17A were significantly different during the proliferative phase (Fig. 3).

### Analysis According to the Endometriosis Severity Stages

Levels of miR-106b-3p, -451a, -486-5p, uPA, PAI-1, TIMP-1, IL-6, and IL-8 were significantly increased in PF from women with moderate–severe endometriosis (stages III–IV) compared with levels in CPF (Supplemental Tables 2 and 3). Moreover, TIMP-1 was also significantly increased in minimal–mild endometriosis (stages I–II) compared with CPF (Supplemental Table 3). Not only were peritoneal levels of IL-6 and IL-8 higher in patients than in controls (Fig. 1D), but their levels were also significantly increased as the disease advanced (Supplemental Table 3). Although it did not reach statistical significance, an important trend to up-regulation with severity of disease was observed for miR-106b-3p and -451a, whose levels increased mainly in the most advanced stage (Supplemental Table 2).

### Analysis According to Fertility Status

All the parameters quantified in PF were also evaluated according to sterility status (Fig. 4, Supplemental Fig. 2).

**MicroRNAs levels according to fertility status.** Levels of miR-106b-3p and miR-486-5p were significantly higher in EPF from sterile patients compared with CPF from sterile control women (Fig. 4A). Moreover, miR-486-5p was significantly higher in EPF from fertile patients compared with CPF from fertile control women.

Whereas some of the studied miRNAs (miR-106b-3p, -150-5p, -451a, and -486-5p) did not differ within the control group by their fertility status, some others, namely miR-185-5p and -195-5p, trended to be up-regulated in PF from both sterile groups (control and endometriosis) compared with fertile groups, although without reaching statistical significance; a similar result was observed for miR-150-5p levels in sterile patients (Fig. 4A).

**Protein levels according to fertility status.** VEGF-A, IL-8, and TIMP-1 levels were significantly increased in both EPF groups (sterile and fertile) compared with CPF from fertile control women. In addition, VEGF-A was also significantly increased in sterile versus the fertile CPF groups (Fig. 4B). When sterile groups were compared, IL-6, IL-8, and TIMP-1 showed significantly higher levels in EPF than in CPF. Interestingly, although PAI-1 was overexpressed in EPF independently of fertility status, only the fertile group was significantly different between EPF and CPF (Fig. 4B).

### Correlations Between Evaluated Parameters

No significant correlations were observed between age of women and any of the studied parameters in either the endometriosis or the control group.

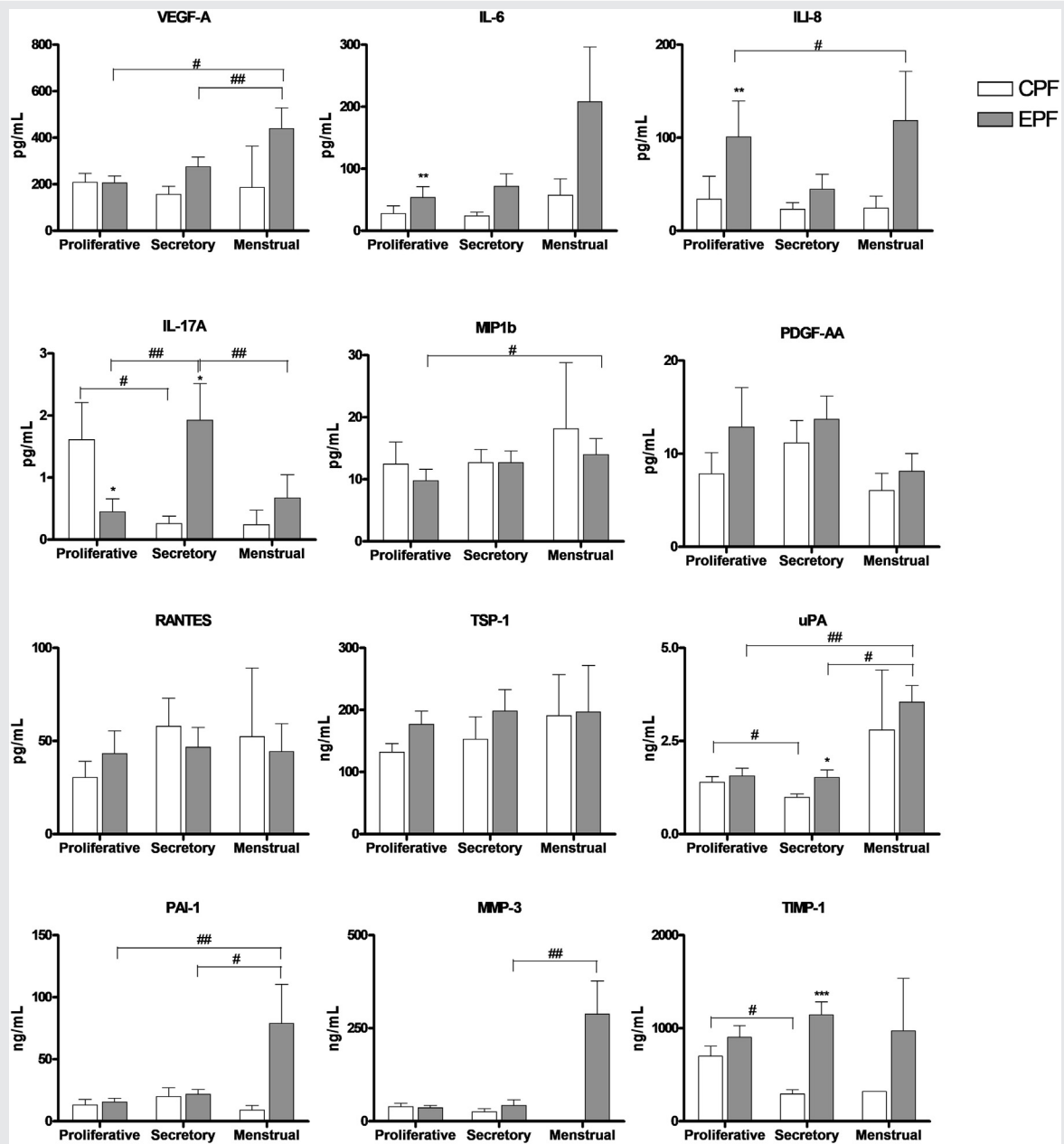
The biggest differences between EPF and CPF were observed in levels of miR-451a and -486-5p; moreover, these miRNAs correlated significantly with RANTES levels (CPF:  $r = 0.688$ ,  $P < .001$  and  $r = 0.581$ ,  $P = .001$ ; EPF:  $r = 0.281$ ,  $P = .019$  and  $r = 0.282$ ,  $P = .022$ , respectively). However, miR-451a and -486-5p levels only correlated significantly with MMP-3 in EPF ( $r = 0.440$ ,  $P = .009$  and  $r = 0.550$ ,  $P = .001$ , respectively). Finally, miR-486-5p levels were significantly correlated with uPA in EPF but not in CPF ( $r = 0.374$ ,  $P = .015$  and  $r = -0.034$ ,  $P = .874$ ).

Although without reaching statistical significance, miR-150-5p showed an important up-regulation in EPF in comparison with CPF. Moreover, as occurred with miR-451a and -486-5p, miR-150-5p levels significantly correlated with RANTES both in CPF and EPF (CPF:  $r = 0.354$ ,  $P = .004$  and  $r = 0.550$ ,  $P = .001$ ; EPF:  $r = 0.440$ ,  $P = .009$  and  $r = 0.550$ ,  $P = .001$ ).

## DISCUSSION

In the present study we have described, for the first time, the characteristic miRNA content in PF from women with endometriosis as well as its relationship with the main proangiogenic and proinflammatory factors. Endometrial PF presented 126 mature miRNAs with significantly different levels compared with CPF (78 down-regulated and 48 up-regulated). For the validation phase in a larger cohort of PFs, we selected five miRNAs whose target genes were related to angiogenesis or inflammation (miR-29c-3p, -106b-3p, -150-5p, -451a, -486-5p, and -1343-5p) (9, 15, 29). Moreover, miR-130a-3p, -185-5p, and -195-5p were also selected for the validation phase, because in a previous study by our group (9) we detected that cultured stromal cells from endometrium from patients significantly reduced the expression of these miRNAs in response to EPF. The analysis of PF showed a significantly higher level of miR-106b-3p, -486-5p, -451a, TIMP-1, IL-6, IL-8, and uPA in EPF compared with CPF. Levels of miR-150-5p were also increased, although differences did not reach statistical significance (Fig. 1C). Regarding miR-451a, Graham's team has recently published two studies showing increased levels of this miRNA in ovarian endometriomas that correlate with lesion size and with its serum levels (30, 31). Provided that PF is mainly composed

FIGURE 3



Protein levels in EPF and CPF, according to cycle phases. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$  vs. CPF same cycle phase. # $P < .05$ ; ## $P < .01$ ; ### $P < .001$  vs. any cycle phase.

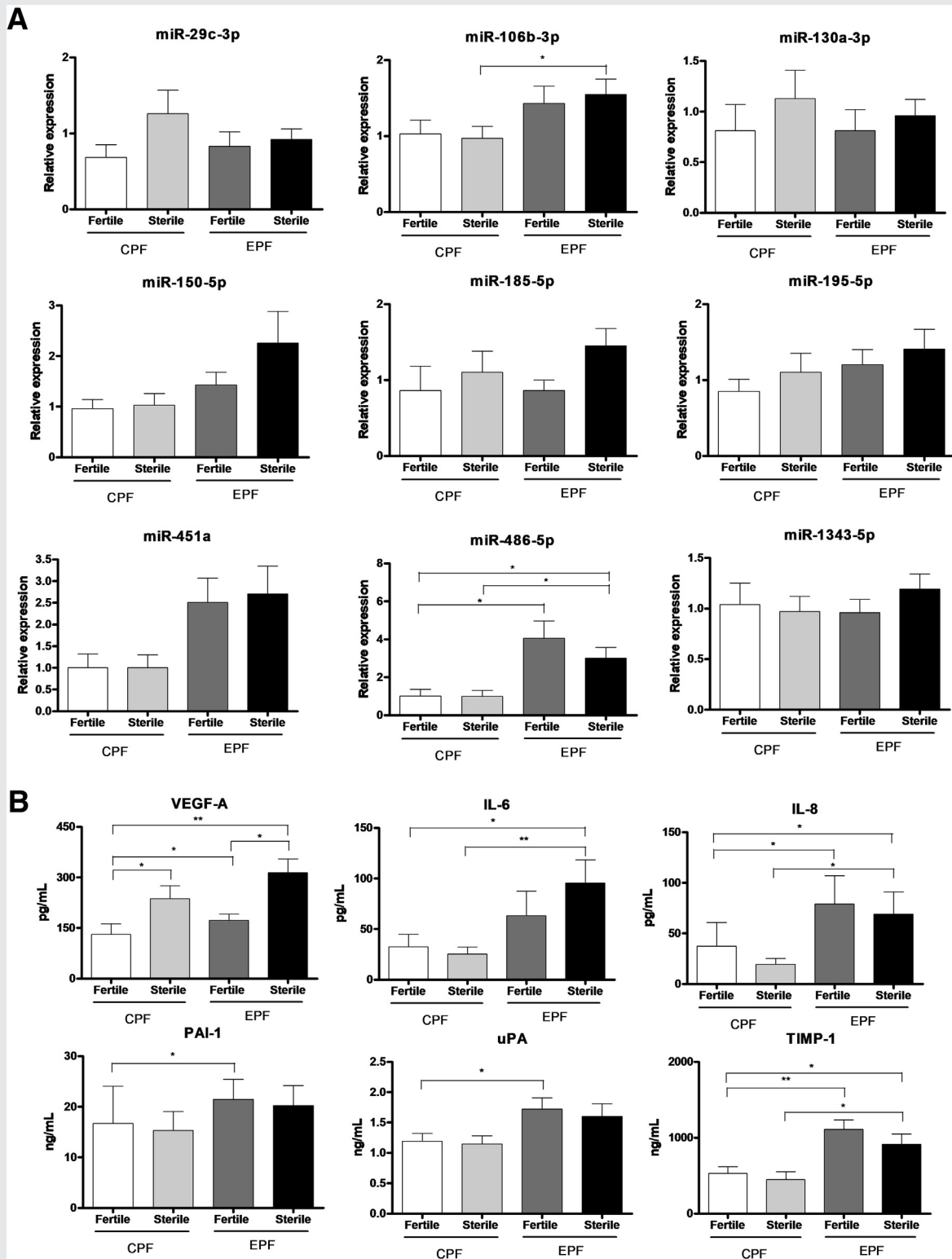
Marí-Alexandre. Peritoneal fluid miRNAs in endometriosis. *Fertil Steril* 2017.

of blood components (32), and usually up-regulated proteins in serum are proportionally up-regulated in PF (33), our results are in accordance with Graham's, suggesting an important role for miR-451a as a mediator of inflammation in the peritoneal microenvironment. Furthermore, miR-451a has been characterized as the most abundant miRNA in plasma and the main miRNA within erythrocytes (34, 35). In concordance with the retrograde menstruation theory (5), blood and endometrial fragments migrate during

menstruation and are deficiently eliminated by the peritoneal microenvironment in patients with endometriosis, remaining and proliferating; it could be an explanation of the observed enhancement of an erythrocyte-specific miRNA in EPF.

The second most abundant miRNA in plasma is miR-486-5p (35), similar to our findings in EPF (data not shown). In 2013 Rekker et al. (35) reported that this miRNA did not modify its levels through the menstrual cycle in plasma

**FIGURE 4**



MicroRNA levels in EPF and CPF, according to fertility status. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. MicroRNA expression is presented as FC relative to women without endometriosis (CPF = 1). \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$  between groups.

Mari-Alexandre. Peritoneal fluid miRNAs in endometriosis. *Fertil Steril* 2017.

from healthy women. Similarly, we have not found differences in miR-486-5p levels in CPF across the menstrual cycle (35). However, our results indicate that miR-486-5p not only is up-regulated in EPF in all three phases compared with CPF, but it also presented different levels in each menstrual phase (Fig. 2). Moreover, miR-486-5p has been defined as an exosomal miRNA with a crucial role in intercellular communication in colorectal cancer (36), which, combined with other miRNAs, could be used as biomarker of disease. Taking these studies into account, our results suggest an interesting role for miR-486-5p as a potential intercellular communicator in endometriosis, which should be closely evaluated in future studies.

In our study, with the exception of only miR-1343-5p, all eight studied miRNAs presented increased levels in EPF in the menstrual phase compared with other phases of the menstrual cycle. Similar findings were observed regarding VEGF-A, IL-8, MIP1 $\beta$ , uPA, PAI-1, and MMP-3 proteins. These findings are in accordance with Sampson's theory (5), because migrated endometrial fragments in the peritoneal cavity require an increased capacity of implantation and vascularization.

Regarding the revised American Society for Reproductive Medicine stages of the disease, most of the miRNAs (miR-106b-3p, -451a, and -486-5p) and proteins (VEGF-A, uPA, PAI-1, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP1 $\beta$ , PDGF-AA, and RANTES) presented higher levels the more advanced the disease, suggesting that the PF might be a potential source of biomarkers (37, 38).

Finally, and taking into consideration the fertility status, whereas the enhancement of miR-106b-3p and -451a levels seemed to be due to endometriosis, miR-185-5p trended to be up-regulated in both sterile groups, suggesting its potential role within endometriosis-related sterility, although additional validations are required. Interestingly, we found VEGF-A levels significantly higher in both sterile groups (EPF and CPF) compared with their corresponding fertile groups. Moreover, EPF from fertile women presented significantly higher levels than CPF from fertile control women. These findings suggest new role of peritoneal VEGF-A not only in endometriosis pathogenesis but also in pregnancy outcome.

In conclusion, we have described, for the first time, a characteristic miRNA profile in PF from patients with endometriosis. Moreover, the validation phase confirmed a significant increase of miR-106b-3p, -451a, and -486-5p in comparison with CPF, independently of fertility status. Interestingly, these miRNAs presented their highest levels in the most advanced stages of the disease, as well as in the menstrual phase in comparison with other phases of the menstrual cycle. In addition, VEGF-A levels, although significantly higher in EPF from sterile women, were significantly up-regulated in both sterile groups (EPF and CPF), suggesting its role as a biomarker for fertility outcome. Summarizing, because of the role of miRNAs as intercellular communicators, these findings may be useful to better understand the peritoneal mechanisms that allow the implantation and survival of endometriotic lesions, although additional experiments are required to validate this hypothesis.

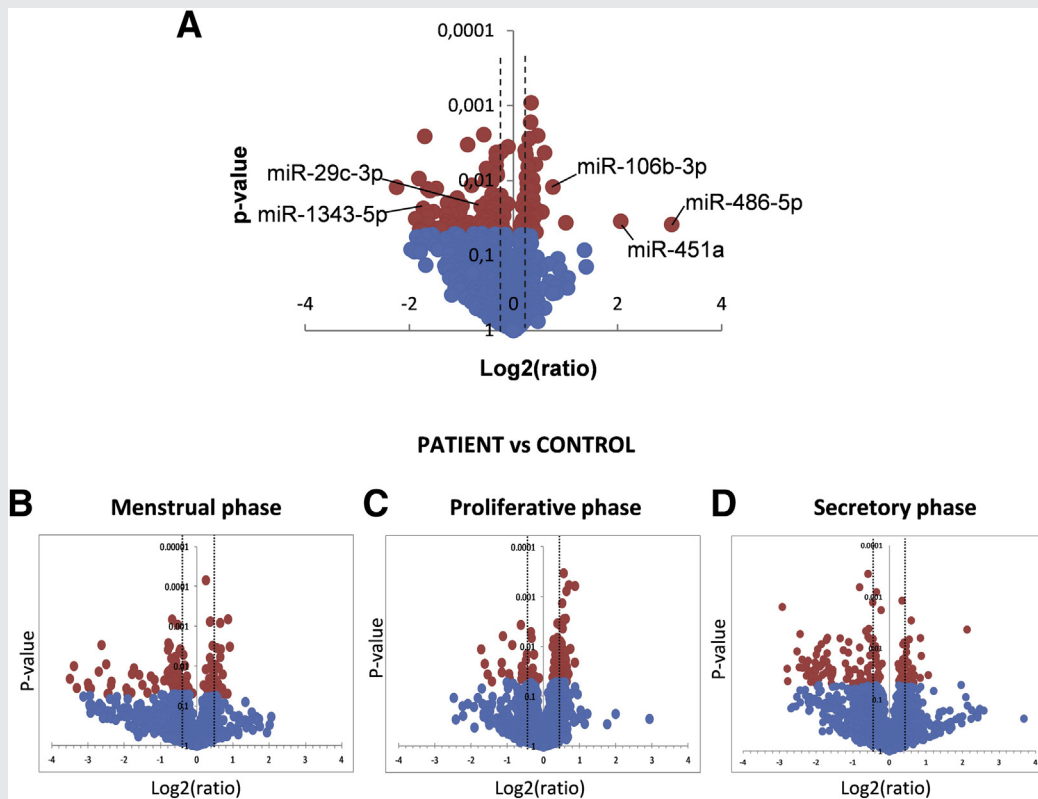
## REFERENCES

1. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98:511–9.
2. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:261–75.
3. Mari-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boils A, Sandoval J. miRNAs Regulation and its role as biomarkers in endometriosis. *Int J Mol Sci* 2016;17:E93.
4. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod* 2012;27:1292–9.
5. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynaecol* 1927;14:422–69.
6. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789–99.
7. Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gómez-Lechón MJ, Gilabert J, Chirivella M, et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010;25:398–405.
8. Braza-Boils A, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gilabert J, Mari-Alexandre J, Chirivella M, et al. Peritoneal fluid reduces angiogenesis related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS One* 2013;8:e62370.
9. Braza-Boils A, Salloum-Asfar S, Mari-Alexandre A, Arroyo B, González-Conejero R, Barceló-Molina M, et al. Peritoneal fluid modifies the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2015;30:2292–302.
10. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33.
11. Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;15:625–31.
12. Ohlsson-Teague E, Van der Hoek K, Van der Hoek M, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson S, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009;23:265–75.
13. 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.
14. Ramón LA, Braza-Boils A, Gilabert J, España F, Chirivella M, Estellés A, et al. microRNAs related to angiogenesis are dysregulated in endometrioid endometrial cancer. *Hum Reprod* 2012;27:3036–45.
15. Braza-Boils A, Mari-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum Reprod* 2014;29:978–88.
16. Berbic M, Fraser IS. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *J Reprod Immunol* 2011;88:149–55.
17. Olkowska-Truchanowicz J, Bocian K, Maksym RB, Biatoszewska A, Włodarczyk D, Baranowski W, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2013;28:119–24.
18. Guo SW, Du Y, Liu X. Platelet-derived TGF- $\beta$ 1 mediates the down-modulation of NKG2D expression and may be responsible for impaired natural killer (NK) cytotoxicity in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2016;31:1462–74.
19. Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: its relation to fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems. *Hum Reprod* 2007;22:2120–7.
20. Rakhila H, Al-Akouma M, Bergeronb ME, Leboeufb M, Lemyreb M, Akoum A, et al. Promotion of angiogenesis and proliferation cytokines patterns in peritoneal fluid from women with endometriosis. *J Reprod Immunol* 2016;116:1–6.
21. Jørgensen H, Hill AS, Beste MT, Kumar MP, Chiswick E, Fedorcsak P, et al. Peritoneal fluid cytokines related to endometriosis in patients evaluated for infertility. *Fertil Steril* 2017;107:1191–9.



22. Berker E, Oehmke F, Tinneberg HR, Preissner KT, Saffarzadeh M. Association of neutrophil extracellular traps with endometriosis-related chronic inflammation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;183:193–200.
23. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733–41.
24. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:467–77.
25. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373–83.
26. Sluijter JPG, Verhage V, Deddens JC, van der Akker F, Doevendans PA. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res* 2014;102:302–11.
27. Tokuhisa M, Ichikawa Y, Kosaka N, Ochiya T, Yashiro M, Hirakawa K, et al. Exosomal miRNAs from peritoneum lavage fluid as potential prognostic biomarkers of peritoneal metastasis in gastric cancer. *PLoS One* 2015;10:e0130472.
28. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817–21.
29. Cosar E, Mamillapalli R, Ersoy GS, Cho S, Seifer B, Taylor HS. Serum microRNAs as diagnostic markers of endometriosis: a comprehensive array-based analysis. *Fertil Steril* 2016;106:402–9.
30. Nothnick WB, Falcone T, Joshi N, Fazleabas AT, Graham A. Serum miR-451a levels are significantly elevated in women with endometriosis and recapitulated in baboons (*Papioanubis*) with experimentally-induced disease. *Reprod Sci* 2017;24:1195–202.
31. Graham A, Falcone T, Nothnick WB. The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival. *Hum Reprod* 2015;30:642–52.
32. Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998;4:741–51.
33. Sipak-Szmigiel O, Włodarski P, Ronin-Walknowska E, Niedzielski A, Karakiewicz B, Stuczanowska-Głąbowska S, et al. Serum and peritoneal fluid concentrations of soluble human leukocyte antigen, tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in patients with selected ovarian pathologies. *J Ovarian Res* 2017;10:25.
34. Teruel-Montoya R, Kong X, Abraham S, Ma L, Kunapuli SP, Holinstat M, et al. MicroRNA expression differences in human hematopoietic cell lineages enable regulated transgene expression. *PLoS One* 2014;9:e102259.
35. Rekker K, Saare M, Roost AM, Salumets A, Peters M. Circulating microRNA profile throughout the menstrual cycle. *PLoS One* 2013;8:e81166.
36. Yan S, Han B, Gao S, Wang X, Wang Z, Wang F, et al. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8:60149–58.
37. Fassbender A, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L. Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res Int* 2015;2015:130854.
38. O DF, El Aalamat Y, Waelkens E, De Moor B, D'Hooghe T, Fassbender A. Multiplex immunoassays in endometriosis: an array of possibilities. *Front Biosci* 2017;22:479–92.

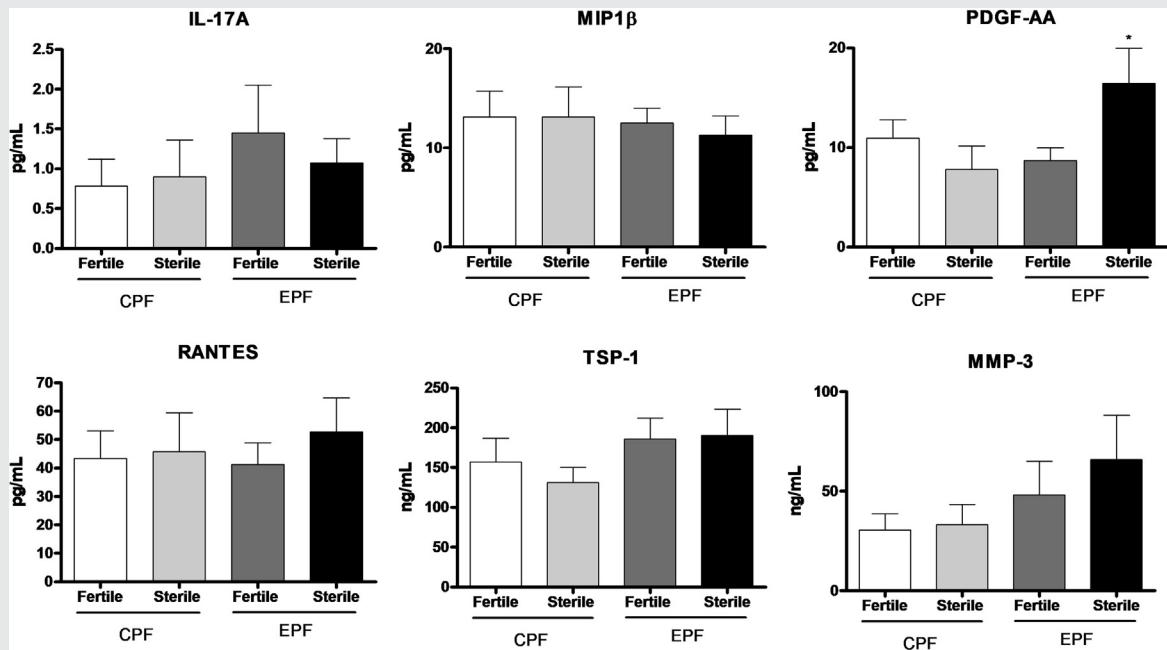
## SUPPLEMENTAL FIGURE 1



Vulcano plots from miRNA arrays performed in EPF and CPF. **(A)** Vulcano plot representing different expression levels between controls and patients. **(B–D)** Vulcano plots representing miRNA differently expressed between EPF and CPF in each menstrual phase. Red dots:  $P < .05$ ; blue dots:  $P > .05$ . Broken lines represent  $FC \pm 1.2$ .

Mari-Alexandre. Peritoneal fluid miRNAs in endometriosis. *Fertil Steril* 2017.

**SUPPLEMENTAL FIGURE 2**



Protein levels in EPF and CPF, according to fertility status. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$  between groups.

Mari-Alexandre. Peritoneal fluid miRNAs in endometriosis. *Fertil Steril* 2017.

Original article

# Thickness and an Altered miRNA Expression in the Epicardial Adipose Tissue Is Associated With Coronary Heart Disease in Sudden Death Victims



Josep Marí-Alexandre,<sup>a,◇</sup> Moises Barceló-Molina,<sup>a,◇</sup> Jorge Sanz-Sánchez,<sup>b</sup> Pilar Molina,<sup>a,c</sup> Jennifer Sancho,<sup>a,c</sup> Yolanda Abellán,<sup>a,c</sup> María Luisa Santaolaría-Ayora,<sup>d</sup> Juan Giner,<sup>a,c</sup> Luis Martínez-Dolz,<sup>b</sup> Amparo Estelles,<sup>a</sup> Aitana Braza-Boils,<sup>a,\*</sup> and Esther Zorio<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Cardiopatías Familiares, Muerte Súbita y Mecanismos de Enfermedad (CaFaMuSMe), Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>c</sup>Servicio de Patología, Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Valencia, Spain

<sup>d</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, Spain

## Article history:

Received 7 September 2017

Accepted 4 December 2017

Available online 10 February 2018

## Keywords:

Epicardial fat

MicroRNA

Coronary heart disease

Sudden death

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** An increased epicardial adipose tissue (EAT) thickness has become a new risk factor for coronary heart disease (CHD). We aimed to study the role of EAT dysfunction as a CHD marker by focusing on its thickness and microRNA (miRNA) expression profile, and the potential factors possibly influencing them.

**Methods:** One hundred and fifty-five CHD sudden cardiac death victims and 84 non-CHD-sudden death controls were prospectively enrolled at autopsy. A representative subset underwent EAT thickness measurements and EAT miRNA expression profiling.

**Results:** Epicardial adipose tissue thickness was increased and allowed an accurate diagnosis of patient status (among other measurements, EAT score area under the curve 0.718,  $P < .001$ ). Epicardial adipose tissue from patients showed 14 up- and 14 down-regulated miRNAs and miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -125a-5p, 628-5p, -1303 and -4286 were validated by quantitative real-time polymerase chain reaction. Patients exhibited higher EAT levels of miR-34a-3p and -34a-5p than controls (with a positive trend considering EAT from coronaries without stenosis, with stable stenosis and complicated plaques) and correlated with age only in controls. The mild positive correlation between liver and EAT miR-34a-5p levels in patients ( $r = 0.295$ ,  $P = .020$ ) dramatically increased in EAT from complicated plaques ( $r = 0.799$ ,  $P = .017$ ). Similar correlations were observed for high-sensitivity-C-reactive protein levels and miR-34a-5p levels both in EAT and liver extracts.

**Conclusions:** Increased age-independent levels of miR-34a-3p and -34a-5p characterize the EAT miRNA expression profile of CHD regardless of EAT thickness, anthropometric parameters, and the presence of underlying atherosclerotic plaques.

© 2018 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## El grosor y una expresión de miARN alterada en la grasa epicárdica se asocian con enfermedad coronaria en víctimas de muerte súbita

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** El aumento de la grasa epicárdica (GE) es un nuevo factor de riesgo de enfermedad coronaria (EC). El estudio se propone profundizar en el papel de la GE como marcador de EC centrándose en su espesor, el perfil de expresión de los microARN (miARN) y los factores que podrían influir en ello.

**Métodos:** Se recogieron prospectivamente 155 autopsias de víctimas de muerte súbita cardiaca por EC y 84 de controles con muerte súbita no debida a EC. En un subgrupo se analizaron el espesor de la GE y su patrón de expresión de miARN.

**Resultados:** El grosor de GE estaba incrementado y brindaba buena precisión para discriminar a los pacientes (entre otras mediciones, área bajo la curva de la puntuación de GE, 0,718;  $p < 0,001$ ). La GE de los pacientes presentó 14 miARN suprarregulados y 14 infrarregulados, y se validaron por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -125a-5p, 628-5p, -1303 y -4286.

## Palabras clave:

Grasa epicárdica

MicroARN

Enfermedad coronaria

Muerte súbita

\* Corresponding author: Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Avda. Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain.

E-mail addresses: zorio\_est@gva.es (E. Zorio), aitana\_braza@iislafe.es (A. Braza-Boils).

◇ Both authors contributed equally to this work as first authors.

Las proporciones de miR-34a-3p y -34a-5p en la GE de los pacientes fueron mayores que en los controles (con progresión entre la GE de coronarias sin estenosis, con estenosis estables y con placas complicadas) y solo se correlacionaron con la edad en los controles. La discreta correlación del miR-34a-5p en el hígado y la GE de los pacientes ( $r = 0,295$ ;  $p = 0,020$ ) aumentó llamativamente al considerar exclusivamente la GE de placas complicadas ( $r = 0,799$ ;  $p = 0,017$ ). Se observaron correlaciones similares con la proteína C reactiva ultrasensible y el miR-34a-5p en las muestras de GE e hígado. **Conclusiones:** El patrón de expresión de miARN en la GE de la EC típicamente muestra un aumento de miR-34a-3p y -34a-5p que es independiente de la edad, el grosor de la GE, las mediciones antropométricas y la presencia de lesiones coronarias subyacentes.

© 2018 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Abbreviations

CHD: coronary heart disease  
 EAT: epicardial adipose tissue  
 miRNA: microRNA  
 NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease  
 SCD: sudden cardiac death  
 SD: sudden death

## INTRODUCTION

Sudden cardiac death (SCD) is the leading cause of adult sudden unexpected nontraumatic deaths in Western countries. It is usually the first manifestation of cardiovascular disease,<sup>1</sup> with an estimated incidence of 1.40–6.68 per 100 000 inhabitants per year.<sup>1</sup> Coronary heart disease (CHD) is its most prevalent cause in industrialized countries, accounting for 60% to 80% of the SCDs.<sup>2,3</sup>

Epicardial adipose tissue (EAT) thickness has been recently proposed as a new cardiovascular risk factor.<sup>4–6</sup> It is regarded as brown/beige adipose tissue and exhibits a particular transcriptional activity including expression of proinflammatory and antifibrinolytic adipokines.<sup>7–10</sup> It is located between the myocardium and the visceral pericardium, mostly concentrated along the main coronary arteries. Thus, its close spatial relationship with these structures provides the rationale for suspecting that either paracrinally or vasocrinally EAT could promote CHD and possibly its destabilization.<sup>11</sup>

Other ectopic fats, such as those associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), have also been associated with cardiovascular risk factors, CHD, and cardiovascular events.<sup>12–15</sup> Of note, NAFLD has been associated with EAT thickness<sup>16,17</sup> and CHD<sup>17</sup> but little is known about the underlying mechanisms, which remain independent from cardiovascular risk factors including metabolic syndrome.<sup>17</sup>

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs widely expressed in healthy and diseased tissues. They may play a key role both as effectors of deregulated pathways (amenable as therapeutic targets) and as useful biomarkers. Some of them have been related to dyslipidemia,<sup>18,19</sup> adipogenesis,<sup>20,21</sup> NAFLD (notably miR-34a<sup>22,23</sup>), and a wide range of cardiac disorders.<sup>24</sup> Recently, 2 articles described a miRNA proinflammatory signature involving the insulin signaling pathway in the EAT from CHD patients.<sup>25,26</sup> Very valuable and brand new data were reported but certain issues remained unexplored. One example is the variability of EAT miRNA expression depending on the presence and stability of atherosclerotic plaque. Another instance is the possibility that the increased EAT thickness could explain its increased miRNA levels in CHD patients. Our study aimed to fill these knowledge gaps to further characterize the distribution and depth of EAT and its miRNA expression profile as a marker of CHD

in SCD victims. First, our patient group comprised not only stable but unstable coronary lesions. Second, in addition to miRNAs analyses, systematic EAT measurements were made to assess their correlation with CHD and miRNAs levels. Third, the EAT miRNA expression profiles were studied according to the presence/absence of underlying significant stenosis. Fourth, we studied the relationship between liver and EAT miR-34a-5p. Finally, the sample size of the present report consisted of at least twice as many individuals as previous studies.<sup>25,26</sup>

## METHODS

### Clinical Groups

One hundred and fifty-five cases of SCD due to CHD (CHD-SCD, patients) and 84 cases of non-CHD unexpected sudden deaths (non-CHD-SD, controls) with negative toxicological studies were prospectively enrolled from 2008 to 2013. The definition of sudden death (SD) followed international recommendations.<sup>1</sup> Coronary heart disease due to SCD autopsies identified at least 1 significant coronary stenosis (> 75%) and/or complicated plaques (with erosion, rupture, thrombosis and/or intraplaque hemorrhage) and/or acute or healed histologic signs of myocardial infarctions.<sup>27</sup> Non-CHD-SD controls comprised 38 noncardiac SDs and 46 non-ischemic SCDs (myocarditis and primary cardiomyopathies). Premortem clinical information, circumstances of death, autopsy examination including body mass index, abdominal circumference, heart and liver examination and routine toxicological analyses satisfied current guidelines.<sup>27</sup>

Our protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the human research committee of our institution. Patients and controls were dead at the time of enrollment and all the biological samples analyzed had been obtained at the forensic autopsy required by Spanish Laws in cases of out-of-hospital unexpected SDs. Thus, no written informed consent was obtained.

### Analytical Parameters

Whenever possible, analytical parameters were quantified in postmortem peripheral blood. Total cholesterol, triglycerides, and GGT were determined by enzymatic and high-density lipoprotein cholesterol with direct methods (Architect 16000 Abbott Diagnostic). When triglycerides were < 300 mg/dL, low-density lipoprotein cholesterol was calculated with the Friedewald formula. Very low-density lipoprotein cholesterol was obtained from triglycerides/5. Lipoprotein(a) and apolipoprotein A and B were measured using kinetic nephelometry (Immage Nephelometer, Beckman Coulter Inc., Brea, California, United States) and high-sensitivity C-reactive protein levels with kinetic turbidimetric methods (Immage Nephelometer).

**Table 1**  
General Parameters in CHD-SCD Patients Versus Non-CHD-SD Controls

	CHD-SCD patients (n = 155)	Non-CHD-SD controls (n = 84)	P, P <sup>a</sup>
Postmortem interval, h	22.9 ± 12.2 (n = 155)	24.0 ± 9.7 (n = 84)	.649
Coronary arteries with significant stenosis		–	–
0 vessel	1%		
1 vessel	26%		
2 vessels	33%		
3 vessels	40%		
	(n = 119)		
Complicated plaque <sup>b</sup>	34%	–	–
	(n = 119)		
Age, y	48.2 ± 7.2 (n = 155)	38.6 ± 11.5 (n = 84)	< .001, < .001
Males	137 (88%) (N = 155)	58 (69%) (N = 84)	< .001, .005
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.7 ± 5.4	26.5 ± 4.7	.003
> 30 kg/m <sup>2</sup>	52/143 (36%) (n = 139)	13/73 (18%) (n = 72)	.005
AC, cm	98.3 ± 14.3 (n = 144)	90.4 ± 11.9 (n = 71)	< .001, .008
EAT thickness (mm) at the			
RV anterior wall	3.0 [2.0-5.0]	2.0 [1.0-4.0]	.013
RV posterior wall	5.0 [4.0-8.0]	4.0 [3.0-6.0]	.013
RV posterior wall	0.0 [0.0-2.0]	0.0 [0.0-2.0]	.842
LV anterior wall	2.00 [0.00-3.25]	1.00 [0.00-2.5]	.003
LV lateral wall	1.0 [0.0-2.0]	0.0 [0.0-1.0]	.070
LV posterior wall	0.0 [0.0-2.0]	0.0 [0.0-2.0]	.824
Right AV groove	15.0 [10.3-20.0]	12.0 [2.0-15.0]	< .001
Left AV groove	11.9 ± 4.8	9.7 ± 5.8	.006, .004
Anterior IV groove	9.9 ± 4.4 (n = 130)	7.3 ± 4.5 (n = 73)	< .001, .026
EAT score, mm	53.0 ± 18.2 (n = 130)	39.6 ± 16.1 (n = 73)	< .001
Plasma parameters			
Total cholesterol, mg/dL	196.2 ± 55.7	164.6 ± 53.9	.004
LDL-C, mg/dL	98.4 ± 47.1	80.5 ± 52.1	.181
Very LDL-CI, mg/dL	82.9 ± 37.4	71.4 ± 22.1	.088
HDL-C, mg/dL	36.7 ± 12.3	38.9 ± 12.8	.347
Triglycerides, mg/dL	418.6 ± 188.5	357.8 ± 110.5	.075
Lipoprotein(a), mg/dL	22.9 [6.7-50.4]	10.2 [4.3-36.9]	.216
Lipoprotein(a) > 30, mg/dL	51/125 (40.8%)	12/34 (35.3%)	.561
hs-CRP, U/L	3.51 [1.5-8.0] (n = 125)	1.55 [0.49-3.63] (n = 34)	.002

AC, abdominal circumference; AV, atrioventricular; BMI, body mass index; CHD, coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; EAT score, total sum of the epicardial adipose tissue thickness measurements in each individual; HDL-C, high-density lipoproteins cholesterol; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IV, interventricular; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; LV, left ventricular; RV, right ventricular; SCD, sudden cardiac death; SD, sudden death.

Unless otherwise indicated, values are expressed as mean ± standard deviation or median [range].

<sup>a</sup> Regression model (conditional forward method) including age, sex, BMI, abdominal circumference, right AV groove, RV anterior wall, RV lateral wall, left AV groove, LV anterior wall, IV septum along the anterior descending coronary artery, EAT score, total cholesterol and hs-CRP.

<sup>b</sup> Complicated plaques included atherosclerotic plaque rupture, erosion, thrombosis and/or intraplaque hemorrhage.

### Epicardial Adipose Tissue Thickness

During the macroscopic examination of the heart, cross-sectional cuts were made at every 0.5 cm starting at the apex, always parallel to the atrioventricular grooves, to register the maximal EAT thickness at each site (Figure 1 of the supplementary material). The total sum of the EAT thicknesses in each

individual was termed EAT score, and was regarded as an estimate of the total amount of EAT in the heart.

### Tissue Sample Collection for miRNA Analyses

Epicardial adipose tissue samples in patients were obtained mainly from coronary arteries with significant stenosis, some from

the vicinity of complicated plaques and some from coronary arteries without stenosis, whereas in controls EAT extracts always came from coronary arteries without stenosis. Samples, immediately rinsed in cold phosphate-buffered saline to eliminate blood contamination, were stored in RNA later (Ambion, Austin, Texas, United States) at  $-20^{\circ}\text{C}$  until their study. Fresh liver samples were collected and processed as previously described.<sup>15</sup>

### RNA Extraction

Total RNA was extracted from EAT using the mirVana-Paris miRNA isolation kit (Ambion), according to the manufacturer's protocol. The RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, United States). Ribonucleic acid quality for miRNA expression arrays was assessed using the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States).

### miRNA Expression Profiles

Ribonucleic acid for microarray analyses included 3 EAT samples of controls (in particular, 1 EAT sample next to the healthy left anterior descending artery from each control) and 3 EAT samples from patients (from coronary arteries with significant stable stenosis, in particular 2 from the left anterior descending artery and 1 from the right coronary artery). They were performed at the Array Service of our institution (*Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain*) with the GeneChip miRNA 3.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, California, United States), which contains probes of 1733 mature human miRNAs (miRBase version 17).

Data analysis was performed by using PARTEK Genomic Suite software (PARTEK, St. Louis, Missouri, United States) and normalized using a Robust Multiarray Analysis algorithm. A list of miRNAs with significant differences ( $\pm 1.5$ -fold change;  $P$  value  $< .05$ ) between patients and controls was obtained. Bioinformatic tools (mirbase.org, microrna.org, targetscan.org, and Diana tools) enabled us to choose 7 miRNAs among those differently expressed, whose targets were involved in atherosclerosis, lipid metabolism, or adipocyte pathophysiology: miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -125a-5p, -628-5p, -1303 and -4286.

### miRNA Quantification by Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction in Epicardial Adipose Tissue and Liver Samples

Our selected miRNAs were validated in 28 EAT samples from 28 controls and 186 EAT samples from 99 patients (1 EAT sample from a coronary artery with significant stable stenosis was collected in 78 patients, 1 EAT sample from a complicated plaque in the 21 remaining patients, and finally 1 EAT sample from a coronary artery without atherosclerotic plaques in 87 of the aforementioned patients). Since the levels of the small nuclear RNA RNU6B were highly variable in our real-time quantitative real-time polymerase chain reaction runs, we selected the miRNA-363-3p instead as endogenous control, with stable expression in our arrays and quantitative real-time polymerase chain reaction runs. Hepatic miR-34a-5p was quantified in liver samples from 23 controls and 62 patients from whom paired EAT samples had been obtained (1 EAT sample from a coronary artery without significant stenosis was collected in each of the 23 controls, 1 EAT sample from a coronary artery with a significant stable stenosis in 54 patients, 1 EAT sample from a complicated plaque in the 8 remaining patients, and finally 1 EAT sample from a coronary artery without atherosclerotic plaques in 55 of the aforementioned patients).

Quantitative real-time polymerase chain reaction quantifications were performed using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Vedbaek, Denmark) and a Light Cycler 480 II instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) following the manufacturer's instructions.

### Statistical Analysis

Qualitative variables are expressed as percentages and were compared with the chi-square test. Depending on the normality of the test, continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, mean  $\pm$  standard error of the mean or median and range [percentile 25-percentile 75] and were compared with the Student  $t$  test, ANOVA or the Mann-Whitney  $U$  test, where applicable. miRNA quantification is presented as fold change relative to the results obtained in EAT from healthy coronaries in controls. Correlations were determined using the Spearman rho test or the Pearson

**Table 2**

Correlations Between EAT Measurements and Epidemiologic, Anthropometric and Analytical Parameters in CHD-SCD Patients ( $n = 130$ ) and non-CHD-SD Controls ( $n = 73$ )

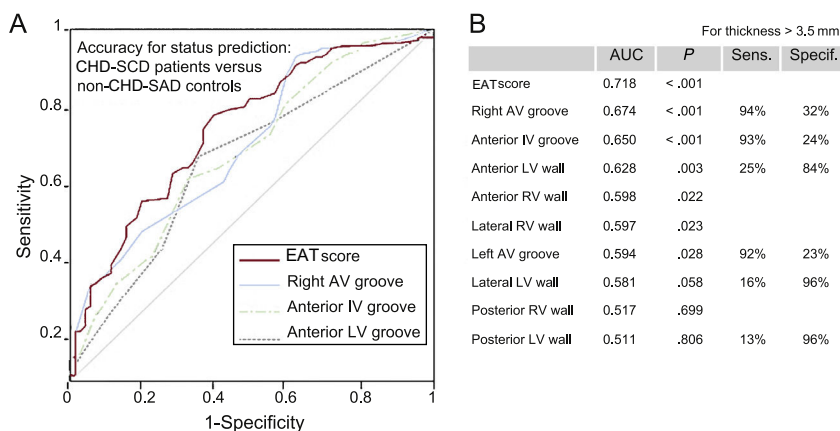
		Right AV groove $r$ ( $P$ )	Anterior RV wall $r$ ( $P$ )	Lateral RV wall $r$ ( $P$ )	Left AV groove $r$ ( $P$ )	Anterior LV wall $r$ ( $P$ )	Anterior IV groove $r$ ( $P$ )	EAT score $r$ ( $P$ )
Age	Patients	0.269 (.022)	0.553 ( $< .001$ )	0.228 (.054)	0.201 (.091)	0.308 (.009)	0.179 (.133)	0.395 (.001)
	Controls	0.099 (.267)	0.251 (.004)	0.176 (.046)	0.082 (.358)	0.136 (.124)	0.117 (.189)	0.254 (.004)
BMI	Patients	0.217 (.083)	0.420 (.738)	0.320 (.009)	0.182 (.147)	-0.038 (.764)	0.065 (.605)	0.279 (.027)
	Controls	0.214 (.019)	-0.022 (.808)	0.182 (.045)	0.164 (.172)	-0.011 (.903)	0.174 (.056)	0.185 (.043)
AC	Patients	0.228 (.072)	0.930 (.467)	0.255 (.044)	0.309 (.014)	-0.054 (.667)	0.064 (.618)	0.288 (.025)
	Controls	0.245 (.007)	0.061 (.507)	0.227 (.012)	0.223 (.014)	0.051 (.582)	0.179 (.151)	0.268 (.003)
TC	Patients	0.283 (.171)	0.214 (.305)	0.258 (.214)	0.277 (.180)	-0.045 (.833)	0.370 (.068)	0.312 (.129)
	Controls	-0.021 (.829)	-0.072 (.459)	-0.121 (.208)	-0.034 (.728)	0.123 (.202)	-0.122 (.206)	-0.115 (.235)
hs-CRP	Patients	0.263 (.203)	0.386 (.057)	0.327 (.110)	0.088 (.677)	0.099 (.638)	0.304 (.139)	0.364 (.073)
	Controls	0.016 (.870)	0.087 (.378)	0.100 (.309)	0.073 (.455)	-0.98 (.315)	-0.047 (.629)	0.086 (.380)

AC, abdominal circumference; AV, atrioventricular; BMI, body mass index; CHD, coronary heart disease; EAT score, total sum of the epicardial adipose tissue thickness measurements in each individual; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IV, interventricular; LV, left ventricular; RV, right ventricular; SCD, sudden cardiac death; SD, sudden death; TC, total cholesterol.

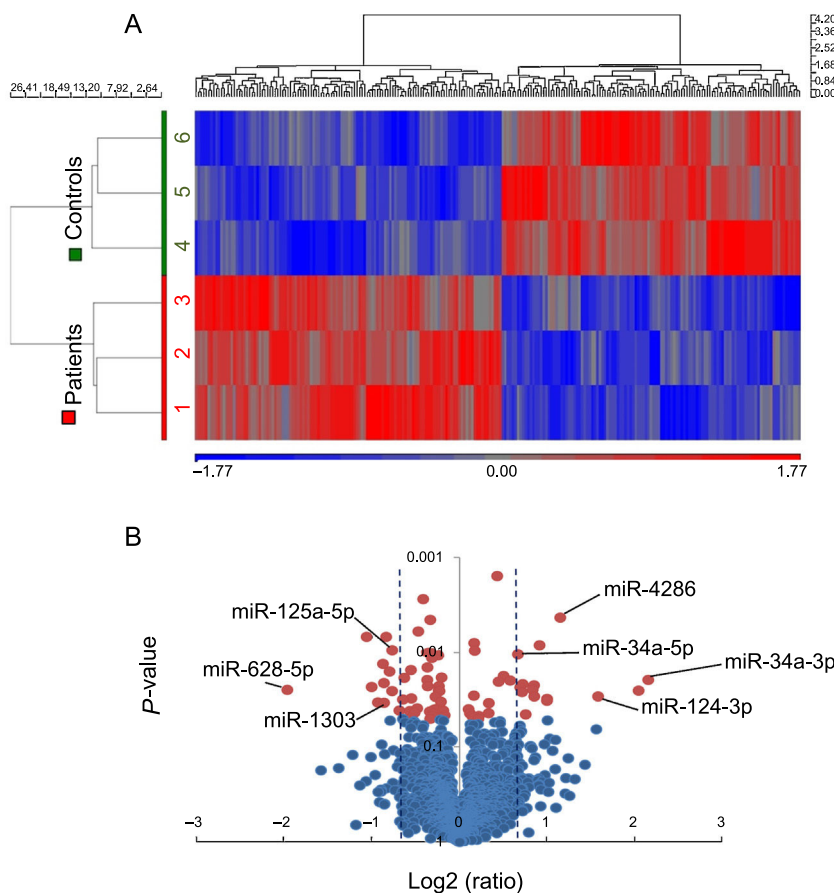
Statistical significance ( $P < .05$ ) was assessed by Pearson correlation.

correlation coefficient, where applicable. To assess the performance of the classifiers, receiver operating characteristic curves were drawn. A *P* value < .05 was considered statistically significant. The statistical

analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences Release 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, United States).



**Figure 1.** Accuracy of EAT measurements for status prediction in CHD-SCD patients (n = 130) and non-CHD-SD controls (n = 73). A: only AUC with the most statistically significant *P* values and their reference line are shown. B: all AUC are listed with the most useful combination of sensitivity and specificity for each EAT measurement (cutoff point > 3.5 mm). AUC, area under the curve; AV, atrioventricular; CHD, coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; EAT score, total sum of the EAT thickness measurements in each individual; IV, interventricular; LV, left ventricular; SCD, sudden cardiac death; SD, sudden death. Sens., sensitivity; Specif., specificity. Statistical significance (*P* < .05) was assessed by the receiver operating characteristic method.



**Figure 2.** miRNA expression profile in EAT samples from 3 CHD-SCD patients and 3 non-CHD-SD controls. A: unsupervised hierarchical clustering showing different miRNAs expression patterns (red for up-regulated miRNAs, blue for down-regulated miRNAs). B: Volcano plot representing the magnitude of the changes of those miRNAs differentially expressed ( $\pm 1.5$  fold change, *P* < .05, shaded lines). CHD, coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; miRNA, microRNA; SCD, sudden cardiac death; SD, sudden death. Statistical significance (*P* < .05) was assessed by ANOVA.



**Table 3**

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction miRNA Levels in EAT Extracts From non-CHD-SD Controls and CHD-SCD Patients, in the Latter Attending to the Presence/absence of Underlying Stable Atherosclerotic Stenosis and Unstable Plaques

miRNA	EAT from arteries without plaque in non-CHD-SD controls (n = 28)	EAT from arteries without plaque in CHD-SCD patients (n = 87)	EAT from arteries with plaque in CHD-SCD patients (n = 78)	EAT from arteries with complicated plaques in CHD-SCD patients (n = 21)
-34a-3p	1.00 ± 0.11	2.02 ± 0.17 <sup>a,b</sup>	1.97 ± 0.15 <sup>a,b</sup>	2.76 ± 0.61 <sup>c</sup>
-34a-5p	1.00 ± 0.14	1.83 ± 0.15 <sup>a,b</sup>	1.74 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.58 <sup>c</sup>
-124-3p	1.00 ± 0.08	0.92 ± 0.07	0.98 ± 0.07	0.95 ± 0.19
-125a-5p	1.00 ± 0.11	1.26 ± 0.10	0.99 ± 0.09	1.30 ± 0.19
-4286	1.00 ± 0.11	1.40 ± 0.15	1.13 ± 0.19	1.05 ± 0.24
-628-5p	1.00 ± 0.14 (n = 26)	1.32 ± 0.13 (n = 85)	1.22 ± 0.14 (n = 77)	1.25 ± 0.18 (n = 20)
-1303	1.00 ± 0.13 (n = 14)	1.11 ± 0.09 (n = 47)	1.23 ± 0.15 (n = 41)	0.93 ± 0.19 (n = 14)

CHD-SCD, sudden cardiac death due to coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; miRNA, microRNA; non-CHD-SD, sudden death due to noncoronary heart disease causes.

Data are expressed as mean ± standard error of the mean. miRNA expression is presented as fold change relative to levels in EAT from arteries without plaque in non-CHD-SD controls.

Any group vs control:

<sup>a</sup>  $P < .01$ .

<sup>b</sup> Regression model (conditional forward method) including age, sex, body mass index, abdominal circumference, EAT score and total cholesterol.  $P < .05$ .

<sup>c</sup>  $P < .05$ .

## RESULTS

### Study Population

No significant differences were observed in postmortem intervals. The general characteristics of patients and controls are presented in Table 1. Compared with controls, patients were older, mainly men and exhibited higher values for anthropometric values, total cholesterol, and high-sensitivity C-reactive protein. Complicated atherosclerotic plaques were seen in 34% of the patients and this situation was only associated with age ( $46.2 \pm 8.4$  vs  $48.6 \pm 6.1$ , for patients with and without complicated plaques,  $P = .002$ ).

### Epicardial Adipose Tissue Thickness

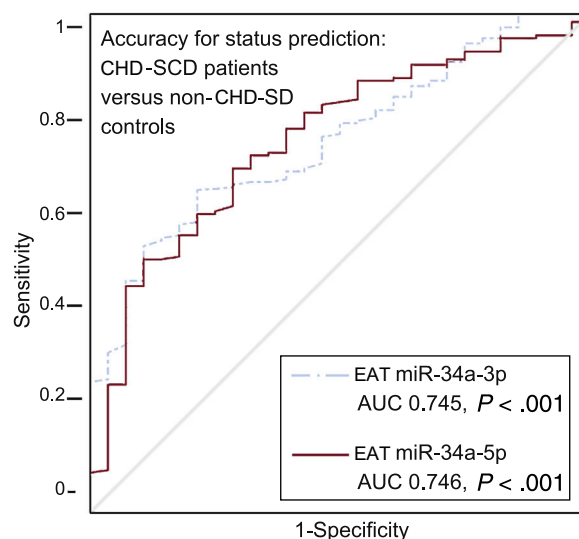
Patients exhibited a thicker EAT than controls at different sites (Table 1). On adjustment in a multivariate model with age, sex, body mass index, and abdominal circumference, only EAT thickness at the left atrioventricular and the anterior interventricular grooves remained significantly increased. The thickest EAT was observed at the atrioventricular grooves in both groups.

Epicardial adipose tissue thickness at each site significantly correlated with the total EAT score (Figure 2 of the supplementary material). At different sites of the right ventricle and atrioventricular grooves, EAT thickness often showed a mild positive correlation with age, body mass index and abdominal circumference, which was rare for EAT at left ventricular locations (Table 2).

Epicardial adipose tissue thicknesses discriminated well between patients and controls (Figure 1). The best area under the curve was observed for the EAT score followed by the right atrioventricular groove and the anterior interventricular groove. They exhibited high sensitivity but low specificity for the cutoff of 3.5 mm and inverse estimates were found for the anterior, posterior and lateral left ventricular walls.

### miRNA Expression Profiles in Epicardial Adipose Tissue

miRNA expression profile in patients and controls clustered separately (Figure 2A). Twenty-eight mature miRNAs were found to be significantly deregulated: 14 up- and 14 down-regulated in patients (Table 1 of the supplementary material). To validate these results, 7 miRNAs were selected among them regarding their potential targets (lipid metabolism, adipocyte physiopathology or other related pathways involved in atherosclerosis and plaque destabilization), namely miR-34a-3p, -34a-5p, -124-3p, -4286, -125a-5p, -628-5p, and -1303 (Figure 2B).



**Figure 3.** Accuracy of EAT miRNA-34a-3p and miRNA-34a-5p levels for status prediction in CHD-SCD patients (n = 186) and non-CHD-SD controls (n = 28). ROC curves for miRNA with statistically significant results and their reference line are provided. AUC, area under the curve; CHD, coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; miRNA, microRNA; ROC, receiver operating characteristic; SCD, sudden cardiac death; SD, sudden death. Statistical significance ( $P < .05$ ) was assessed by the ROC method.

## Validation Phase of Selected miRNAs

Higher levels of miR-34a-3p and -5p were found in EAT from patients than in controls, irrespective of the presence or absence of atherosclerotic plaques nearby (Table 3). When specifically addressed in patients, no differences were identified in any of the miRNAs analyzed regarding the presence or absence of coronary stenosis underneath. However, a trend toward a greater deregulation of miR-34a-3p and -34a-5p in EAT adjacent to complicated atherosclerotic plaques was observed (Table 3). The accuracy for prediction of the clinical group (patients vs controls) was statistically significant for EAT miR-34a-3p and -34a-5p (Figure 3).

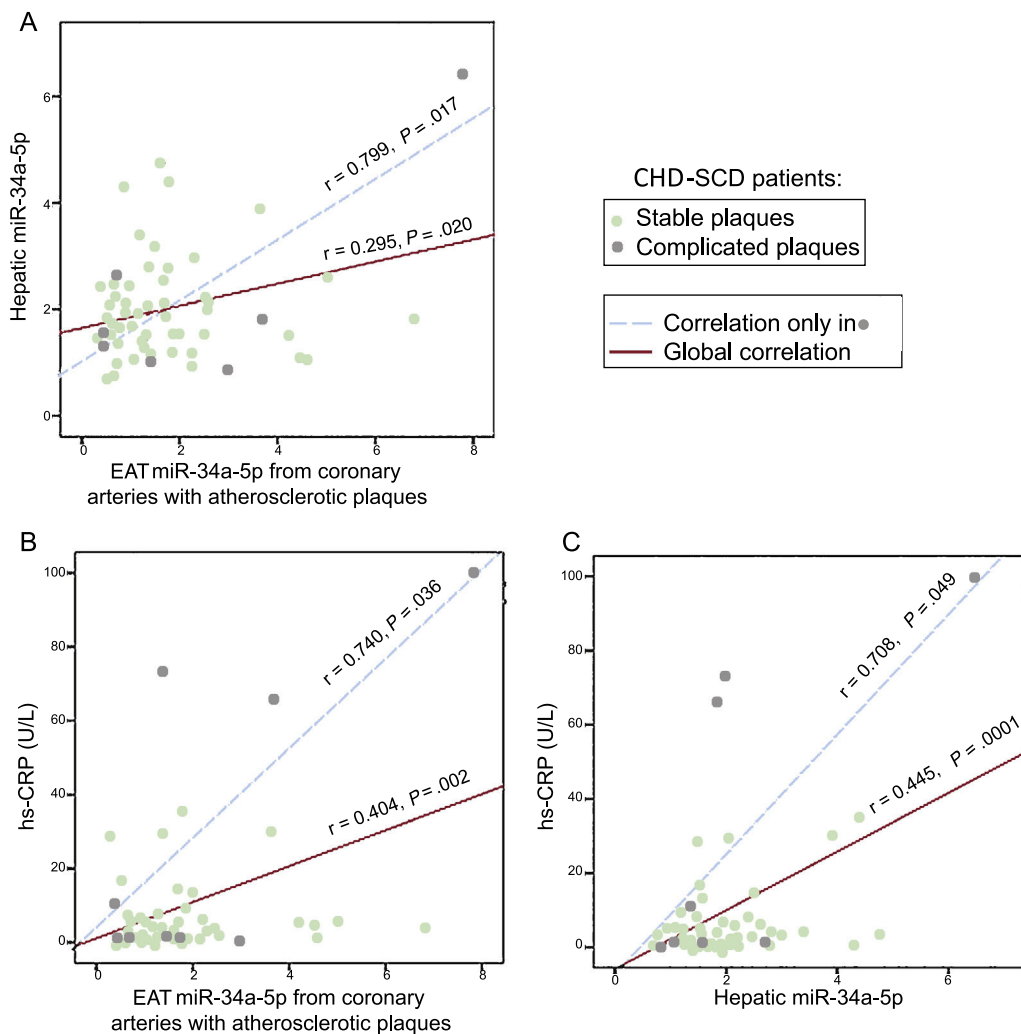
Only in the control group, EAT miR-34a-3p and -34a-5p significantly correlated with age and miR-34a-3p, -34a-5p and -124-3p also correlated with the EAT score and several individual EAT thickness measurements (Table 2 of the supplementary material). No other potentially relevant ( $r > 0.5$ ) and statistically significant correlations were observed in controls or patients.

We previously reported increased hepatic miR-34a-5p levels in SD victims with CHD and/or NAFLD<sup>15</sup> and in the present study we assessed them simultaneously in liver and EAT extracts of controls

and patients. We found a mild and significant correlation between miR-34a-5p levels in liver and in EAT close to coronary stenosis in patients, which markedly increased in the subgroup of EAT samples from complicated plaques (Figure 4A). Furthermore, we explored the relationship of high-sensitivity C-reactive protein and miR-34a-5p assessed either in EAT samples or in liver specimens from the same patients (Figure 4B and C). Again, the mild significant correlations observed in the EAT adjacent to atherosclerotic plaques grew stronger when only EAT from complicated atherosclerotic plaques was analyzed. In contrast, no significant correlations were found in EAT from coronary arteries without stenosis from the same patients or in EAT from controls (data not shown).

## DISCUSSION

The series presented here confirms knowledge that CHD-SCD predominates in men who are older and exhibit a more unfavorable anthropometric profile (higher body mass index and abdominal circumference) compared with victims of non-CHD-SD. More importantly, we have explored the role of EAT in CHD from a double innovative perspective, in terms of anatomical thickness and physiopathological effect mediated by miRNAs.

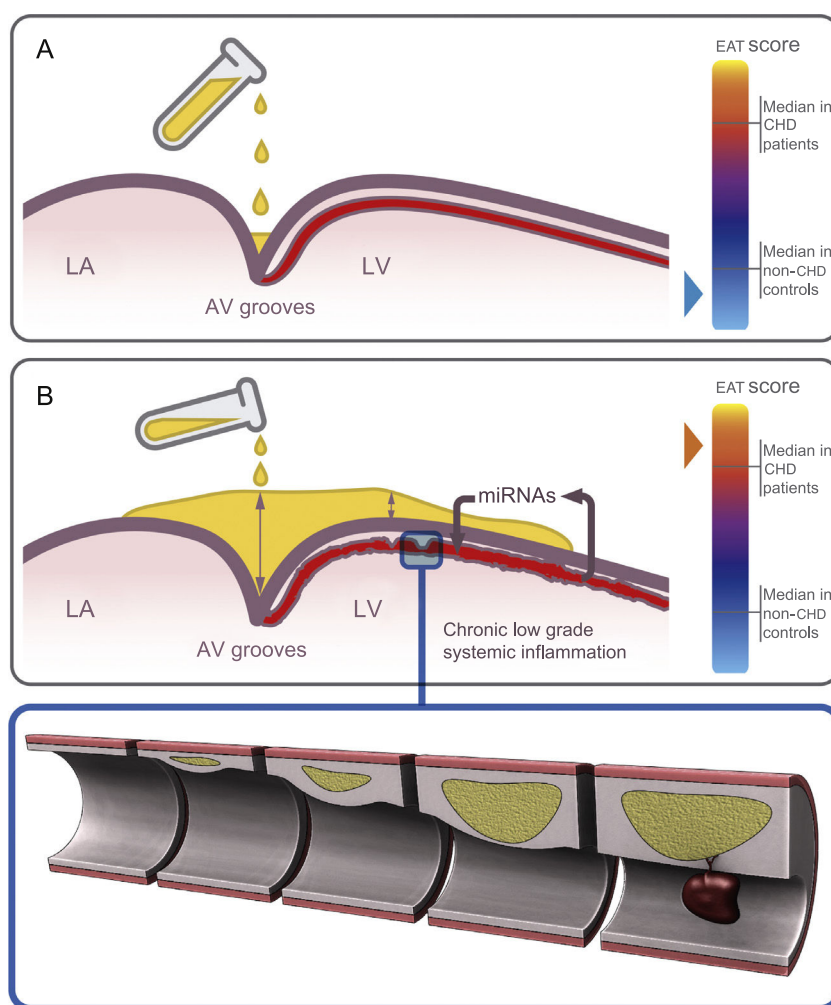


**Figure 4.** Correlations between EAT and hepatic miR-34a-5p levels and between each of them and hs-CRP in CHD-SCD patients ( $n = 78$ ). Epicardial adipose tissue was obtained from diseased coronary arteries. A: correlation between EAT and liver miR-34a-5p levels. B: correlation between EAT miR-34a-5p and hs-CRP levels. C: correlation between hepatic miR-34a-5p and hs-CRP levels. CHD, coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; SCD, sudden cardiac death; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein. Statistical significance ( $P < .05$ ) was assessed by Pearson correlations.

Epicardial adipose tissue thickness at different sites was significantly increased in patients compared with controls in the uni- and multivariate model even though some important analytical parameters (total cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein levels) lost their statistical significance in the multivariate model (Table 1). We report, for the first time, a good accuracy of the postmortem EAT thickness in almost all locations to predict CHD as the cause of death (Figure 1). In keeping with previous knowledge,<sup>4</sup> we suggest that fat does not homogeneously accumulate in the heart; indeed deposits predominate at the AV grooves, where there is more room to be filled (Figure 5). However, the finding of EAT on the left ventricular surface outside the grooves is clearly abnormal. Thus, we found high sensitivity with low specificity for EAT thickness at the AV grooves and opposite estimates for EAT thickness at the left ventricular surface (Figure 1), in keeping with previous echocardiographic reports.<sup>28</sup>

The chronic low-grade inflammation that characterizes CHD may induce a different miRNA expression profile in EAT.<sup>29,30</sup> To our knowledge, only 2 studies have assessed the role of EAT miRNAs in

stable CHD based on a reduced number of samples obtained during bypass grafting or valvular heart surgery.<sup>25,26</sup> Each study identified a specific miRNA profile in CHD patients but no correlations with EAT thickness and no subanalyses concerning the stability of the plaques underlying EAT were performed. Like other authors,<sup>31</sup> we obtained good-quality postmortem EAT samples. Our results confirm that CHD is associated with a deregulated miRNA EAT expression pattern (Figure 2). Gross differences in the setting of our study and the 2 previous ones<sup>25,26</sup> explain the differences in the identified miRNAs. Our series shows for the first time that the linear association in controls between EAT thickness and age with miRNAs levels is lost when CHD is established (Table 2 of the supplementary material). The shift in miRNA profile may probably be gradual due to the increasing levels of miR-34a-3p and -34a-5p in EAT from healthy coronary arteries of controls, from patients without stenosis, surrounding stable stenosis or complicated plaques (without statistical differences in the 2 latter groups, Table 3). Thus, we have proven that whenever EAT changes toward a more unfavorable profile, the miR34a-3p and -34a-5p levels increase so much that age and EAT thickness eventually lose their



**Figure 5.** Hypothesis for the region-dependent EAT accumulation and its role in the heart. Fat deposits start at the grooves and then extend to the RV and finally LV surfaces. A: schematic view of the initial EAT deposition at the AV grooves in a control, with a low EAT score. B: at an advanced deposition stage, EAT accumulates not only at the grooves (with a maximal depth) but also on the anterior interventricular groove and the LV surface in a CHD patient, with a high EAT score. Chronic low-grade systemic inflammation induces an altered miRNA expression profile in the EAT surrounding coronary arteries which promotes atherosclerosis and destabilization of the plaques. AV, atrioventricular; CHD, coronary heart disease; EAT, epicardial adipose tissue; EAT score, total sum of the EAT thickness measurements in each individual; LA, left atrium; LV, left ventricular; RV, right ventricular.

previous influence on them. Furthermore, we suggest that miRNA deregulation in EAT might precede CHD development in the underlying coronary arteries, as a sign of a latent systemic disease because EAT from coronary arteries without significant stenosis in patients was also altered in comparison with controls (Table 3, Figure 5).

Diabetes mellitus was not included in the multivariate model. One reason is that it was not available from the forensic files. In addition, glycemia in the biochemical study was not sufficiently accurate (it depends on the time lapse from the last meal, highly variable in SD victims). Hyperglycemia-induced alteration in miRNA EAT expression profile has been recently reported,<sup>32,33</sup> and we acknowledge that our differences in miRNA expression profile could partially be due to differences in glycemic metabolism.

The reduced number of patients with complicated plaques precludes firm conclusions but definitely points toward EAT miRNA expression as another player in the destabilization of atherosclerotic plaques. New prospective studies focusing on complicated plaques will overcome this limitation.

Finally, as a step further in our previous observations,<sup>15</sup> our novel finding of a positive correlation between miR-34a-5p levels in EAT and liver samples from patients and of both with high-sensitivity C-reactive protein levels, supports the deleterious effect of systemic inflammation as a promoter of NAFLD and CHD and may also help to explain the mechanism by which inflammation triggers destabilization in atherosclerotic coronary plaques (Figure 4).

## CONCLUSIONS

In brief, EAT thickness is increased in CHD-SCD victims, does not correlate with analytical parameters and, when located on the left ventricular surface, exhibits good specificity for the identification of CHD and poorly correlates with age and anthropometric variables. This tissue displays a deregulated miRNA expression profile in CHD patients, which is thickness-independent, also affects EAT from coronary arteries without stenosis, and parallels systemic inflammation supporting the concept of atherosclerosis as a systemic disease. Finally, a trend toward greater deregulation close to complicated plaques warrants confirmation in the future.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank José Ramón Sanz and the *Asociación Valenciana de Cardiopatías Familiares y Muerte Súbita* for their technical assistance.

## FUNDING

This work was supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III*, European Regional Development Funds “European Union. A way of making Europe” (RD12/0042/0029, PI14/01477 and La Fe Biobank PT17/0015/0043), and “Premio Borrasca” (*Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia*). A. Braza-Boils is supported by Roche “Stop Brain Drain”-*Instituto de Investigación Sanitaria La Fe* (2017/0055) and J. Marí-Alexandre by a *Fundación Española de Trombosis y Hemostasia*-2016 Grant.

## CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

## WHAT IS KNOWN ABOUT THE TOPIC?

- Epicardial adipose tissue may change its metabolic behavior under pathogenic circumstances. Coronary arteries are surrounded by EAT. An increased EAT thickness and also the presence of NAFLD have emerged as new cardiovascular risk factors for CHD, although the precise underlying mechanisms remain unknown. miRNAs regulate physiologic and pathologic pathways. Liver miR-34a-5p is up-regulated when NAFLD and/or CHD is present.

## WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- The miRNA expression profile in EAT from CHD-SCD victims is deregulated. The high miR-34-3p and -34-5p levels observed in patients are not related to age, EAT thickness or anthropometric parameters and show a positive trend considering EAT from coronary arteries with increasing atherosclerotic burden. Patients exhibit a significant correlation of miR-34a-5p levels in EAT and liver extracts, and also of high-sensitivity C-reactive protein and EAT miR-34a-5p, especially when EAT is close to a complicated plaque. More mechanistical studies focusing on the deleterious role of EAT in CHD promotion and destabilization are needed.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary material associated with this article can be found in the online version available at <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.12.007>.

## REFERENCES

1. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J*. 2015;36:2793–2867.
2. Morentin B, Audicana C. Population-Based Study of Out-of-Hospital Sudden Cardiovascular Death: Incidence and Causes of Death in Middle-Aged Adults. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:28–34.
3. Lewis ME, Lin FC, Nanavati P, et al. Estimated incidence and risk factors of sudden unexpected death. *Open Heart*. 2016;3:e000321.
4. Sinha SK, Thakur R, Jha MJ, et al. Epicardial adipose tissue thickness and its association with the presence and severity of coronary artery disease in clinical setting: a cross-sectional observational study. *J Clin Med Res*. 2016;8:410–419.
5. Mangili LC, Mangili OC, Bittencourt MS, et al. Epicardial fat is associated with severity of subclinical coronary atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2016;254:73–77.
6. Mahabadi AA, Lehmann N, Kälshch H, et al. Association of epicardial adipose tissue with progression of coronary artery calcification is more pronounced in the early phase of atherosclerosis: results from the Heinz Nixdorf recall study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:909–916.
7. Sacks HS, Fain JN, Bahouth SW, et al. Adult epicardial fat exhibits beige features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1448–E1455.
8. Gaborit B, Ventecléf N, Ancel P, et al. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res*. 2015;108:62–73.
9. Iacobellis G, Bianco AC. Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22:450–457.
10. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108:2460–2466.

11. Nakanishi K, Fukuda S, Tanaka A, et al. Persistent epicardial adipose tissue accumulation is associated with coronary plaque vulnerability and future acute coronary syndrome in non-obese subjects with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014;237:353–360.
12. Hu KC, Wang HY, Liu SC, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: updates in noninvasive diagnosis and correlation with cardiovascular disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:7718–7729.
13. Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens. *Diabet Med*. 2007;24:1–6.
14. Petta S, Argano C, Colomba D, et al. Epicardial fat, cardiac geometry and cardiac function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: association with the severity of liver disease. *J Hepatol*. 2015;62:928–933.
15. Braza-Boils A, Marí-Alexandre J, Molina P, et al. Deregulated hepatic microRNAs underlie the association between non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *Liver Int*. 2016;36:1221–1229.
16. Kim BJ, Kim HS, Kang JG, Kim BS, Kang JH. Association of epicardial fat volume and nonalcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome: From the CAESAR study. *J Clin Lipidol*. 2016;10:1423–1430.
17. Wolff L, Bos D, Murad SD, et al. Liver fat is related to cardiovascular risk factors and subclinical vascular disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016;17:1361–1367.
18. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010;328:1570–1573.
19. Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:86–92.
20. Ling H, Li X, Yao CH, et al. The physiological and pathophysiological roles of adipocyte miRNAs. *Biochem Cell Biol*. 2013;91:195–202.
21. Romao JM, Jin W, Dodson MV, Hausman GJ, Moore SS, Guan LL. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp Biol Med*. 2011;236:997–1004.
22. Liu XL, Pan Q, Zhang RN, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2016;22:9844–9852.
23. Salvoza NC, Klinzing DC, Gopez-Cervantes J, Baclig MO. Association of circulating serum miR-34a and miR-122 with dyslipidemia among patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2016;11:e0153497.
24. Zorio E, Medina P, Rueda J, et al. Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2009;7:82–90.
25. Vacca M, Di Eusanio M, Cariello M, et al. Integrative miRNA and whole-genome analyses of epicardial adipose tissue in patients with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2016;109:228–239.
26. Liu Y, Fu W, Lu M, Huai S, Song Y, Wei Y. Role of miRNAs in epicardial adipose tissue in CHD patients with T2DM. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1629236.
27. Basso C, Aguilera B, Banner J, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch*. 2017;471:691–705.
28. Hirata Y, Yamada H, Kusunose K, et al. Clinical utility of measuring epicardial adipose tissue thickness with echocardiography using a high-frequency linear probe in patients with coronary artery disease. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28:1240–1246.
29. Xu S, Chen P, Sun L. Regulatory networks of non-coding RNAs in brown/beige adipogenesis. *Biosci Rep*. 2015;35:e00262.
30. Trajkovski M, Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24:442–450.
31. Chandrasekaran S, Bonchev D. Network topology analysis of post-mortem brain microarrays identifies more Alzheimer's related genes and microRNAs and points to novel routes for fighting with the disease. *PLoS One*. 2016;11:e0144052.
32. Ocloń E, Latacz A, Zubeł-Łojek J, Pierzchała-Koziec K. Hyperglycemia-induced changes in miRNA expression patterns in epicardial adipose tissue of piglets. *J Endocrinol*. 2016;229:259–266.
33. Blumensatt M, Fahlbusch P, Hilgers R, et al. Secretory products from epicardial adipose tissue from patients with type 2 diabetes impair mitochondrial  $\beta$ -oxidation in cardiomyocytes via activation of the cardiac renin-angiotensin system and induction of miR-208a. *Basic Res Cardiol*. 2017;112:2.