Artículo original
Ginecol Obstet Mex. 2021; 89 (3): 194-203.

Perfil de expresión de cuatro miRNAs en el suero de pacientes con endometriosis

Expression profile of four miRNAs in the serum of patients with endometriosis development.

Olga Ramírez-Ordóñez,[1,2] Mercedes Olvera-Valencia,[3] Julio Francisco De la Jara-Díaz,[1] Mauricio Osorio-Caballero,[4] Héctor Flores-Herrera[3]

Resumen

OBJETIVO: Determinar el perfil de expresión del hsa-miR-21, -141, 200b, y -210 en el suero de pacientes con endometriosis, analizar y establecer las posibles diferencias entre quienes tienen y no la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio analítico, longitudinal y prolectivo efectuado en pacientes atendidas en la Clínica de Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes de la Ciudad de México entre febrero de 2018 y agosto de 2019. Criterios de inclusión: pacientes con y sin diagnóstico de endometriosis. A cada una se le extrajeron 5 mL de sangre para la obtención del suero; a las pacientes con endometriosis se les reprogramó para electrofulguración y nueva toma de sangre a la semana. Del suero se extrajo el RNA total y la expresión de los miRNAs se obtuvo mediante el ensayo de retrotranscripción y PCR. A la banda de expresión se le determinó la densidad óptica. Para el análisis estadístico se utilizó *t* de Student; se consideró significativo el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS: El hsa-miR-21 y hsa-miR-200b aumentaron significativamente en las pacientes con endometriosis. Las pacientes que recibieron electrofulguración tuvieron disminución significativa en la expresión del hsa-miRNA-21 ($p = 0.002$), -141 ($p = 0.03$), y -210 ($p = 0.009$) *versus* a quienes no se realizó elecrofulguración.

CONCLUSIONES: Las expresiones de hsa-miR-21 y hsa-miR-210b aumentaron significativamente en las pacientes con endometriosis por lo que estos miRNAs podrían utilizarse como posibles biomarcadores no invasivos; se han implicado en diversas vías de señalización inflamatoria, apoptosis y en la diferenciación de la respuesta inmunológica.

PALABRAS CLAVE: Endometriosis; hsa-miRNA; suero; retrotranscripción; reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract

OBJECTIVE: To determine the expression profile of hsa-miR-21, -141, 200b, and -210 in the serum of patients with endometriosis.

MATERIALS AND METHODS: Analytical, longitudinal, and prolective study carried out in 21 patients who attended the Assisted Reproduction Clinic of the National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes" of Mexico City between February 2018 and August 2019. The inclusion criteria were: patients without and with a diagnosis of endometriosis confirmed by laparoscopy. Five milliliters of blood were taken from each one to obtain serum and the patients with endometriosis were reprogrammed to perform electrofulguration and a week later, 5 mL of blood was taken again. The total RNA was extracted from the serum and the expression of the miRNAs was carried out by means of the reverse transcription assay (RT), and the polymerase chain reaction (PCR). The expression band was determined the optical

[1] Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México.
[2] Hospital Star Médica, Centro de Reproducción Gestare, Chihuahua, Chihuahua.
[3] Departamento de Inmunobioquímica, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México.
[4] Departamento de Salud Sexual y Reproductiva, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México.

Recibido: octubre 2020
Aceptado: diciembre 2020

Correspondencia
Héctor Flores Herrera
h.flores@inper.gob.mx

Este artículo debe citarse como:
Ramírez-Ordóñez O, Olvera-Valencia M, De la Jara-Díaz JF, Osorio-Caballero M, Flores-Herrera H. Perfil de expresión de cuatro miRNAs en el suero de pacientes con endometriosis. Ginecol Obstet Mex. 2021; 89 (3): 194-203.
https://doi.org/10.24245/gom.v89i3.4818

density. Statistical analysis was performed using the t-Student test and the value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS: The hsa-mirR-21 and miR-200b were significantly increased in patients with endometriosis. In patients with electrofulguration, they showed a significant decrease in the expression of hsa-miRNA-21 ($p = 0.002$), -141 ($p = 0.03$), and -210 ($p = 0.009$) with respect to patients who did not the elecrofulguration procedure was performed.

CONCLUSIONS: The expression of hsa-miR-21 and hsa-miR-200b increased in patients with endometriosis, suggesting their use as biomarkers.

KEYWORDS: Endometriosis; has-miRNA; Serum; Reverse transcriptase; Polymerase chain reaction.

ANTECEDENTES

La endometriosis es la implantación de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina[1,2] que produce inflamación y dolor pélvico, dismenorrea, dispareunia e infertilidad.[3,4] Su incidencia se estima en 6 a 10% de mujeres en edad reproductiva, con importantes consecuencias en la calidad de vida y la fertilidad.[5,6]

Puesto que la laparoscopia es el procedimiento que confirma la endometriosis se le considera el patrón de referencia.[7] Es un procedimiento mínimamente invasivo, que requiere anestesia general y habilidad quirúrgica con riesgo de complicaciones operatorias.[8,9] Hace poco se demostró la expresión de pequeños RNAs no codificantes denominados microRNAs (miRNAs) que regulan la expresión genética por modulación postranscripcional[10,11] que juegan un papel decisivo en la proliferación, diferenciación[12,13] y migración celular.[14] Los miRNAs tienen buena estabilidad en diferentes fluidos corporales[15,16] lo que ha permitido utilizarlos como biomarcadores de endometriosis.[12,17,18]

Ohlsson y colaboradores[19] analizaron, en tejido endometrial de pacientes con endometriosis y mediante un procedimiento laparoscópico, la expresión diferencial de 22 miRNAs de los que 14 aumentaron (hsa-miR-145, -143, -99a, -99b, -126, -100, -125b, -150, -125a, -223, -194, -365, -29c, y -1) y 8 disminuyeron su expresión (hsa-miR-196b, -20a, -34c, -424, -142, 200b, -141, y -200a). Los autores demostraron, en ensayos *in silico* (evaluación con el empleo de modelos de cómputo avanzados), que las pacientes con endometriosis tienen variaciones en la expresión de los miRNAs implicados en la regulación de diversas proteínas asociadas con la migración celular (c-Jun), angiogénesis y expresión epigenética (HDAC4, DNMT3A), y en el crecimiento y proliferación celular (E2F3).[19] Además, está demostrado que estos miRNAs están implicados en la señalización de proteínas de estrés celular,[20] quimiocinas,[21] NFKβ,[22] MAPK,[23] y PKC.[24]

Suryawanshi y colaboradores[25] evaluaron, en el plasma de pacientes con endometriosis y cáncer de ovario, la expresión de 23 hsa-miRNAs. En las pacientes con endometriosis encontraron aumento en la expresión de 3 miRNAs (hsa-miR-362, -1978, y -4284). Este perfil de expresión cambia en las pacientes con endometriosis y cáncer de ovario (hsa-miR-21, -1977, -4284). Se han asociado tres miembros de la

familia del hsa-miR-200 con cáncer de endometrio[26] y de ovario.[27,28] La detección de miRNAs circulantes en el plasma y otros fluidos permite utilizarlos como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de endometriosis.

Para este estudio se seleccionaron cuatro hsa-miRNAs asociados con endometriosis y respuesta inflamatoria (hsa-miR-2, -210y -141)proliferación celular y permeabilidad vascular (hsa-miR-21, -210), angiogénesis (hsa-miR-141, -200b) y con cáncer de ovario (hsa-miR-21, -200b). La hipótesis de trabajo fue la existencia de variaciones en los niveles de expresión del hsa-miR-21, -210, -200b y -141 en plasma de las pacientes con endometriosis. El objetivo del estudio fue: analizar y establecer las posibles diferencias entre pacientes con y sin endometriosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio analítico, longitudinal y prolectivo efectuado en pacientes atendidas en la Clínica de Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes de la Ciudad de México entre febrero de 2018 y agosto de 2019. Criterios de inclusión: pacientes con diagnóstico de endometriosis valorado por laparoscopia y clasificadas según las directrices de la American Society for Reproductive Medicine,[9] y pacientes sin endometriosis.

Se obtuvo el consentimiento informado firmado de las participantes en el estudio. A cada una se le extrajeron 5 mL de sangre periférica, mediante punción de la vena cefálica y se colectó en tubos de K_2-EDTA (BD Vacutainer). A las pacientes con endometriosis se les reprogramó dos días después para la electrofulguración de los focos endometriósicos y vueltas a citar una semana después de este procedimiento para su valoración y toma de 5 mL de sangre. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos, y se separó el suero para la obtención del RNA total.

Criterios de exclusión: pacientes con cualquier proceso inflamatorio, obesas, con alguna intervención quirúrgica no mayor a 12 meses, cáncer, enfermedad autoinmunitaria o algún padecimiento crónico-degenerativo. Criterios de eliminación: pacientes con expediente clínico incompleto.

Obtención del RNA

Se mezclaron 500 µL de suero del reactivo de TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) y se prosiguió a la obtención del RNA con las recomendaciones de la casa comercial. Al finalizar el procedimiento, los tubos Eppendorf se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y por inversión. Al día siguiente, las muestras se hidrataron con 50 µL de agua milliQ y se determinó la concentración de RNA al medir la relación de $A_{260/280}$ en el espectrofotómetro (NanoDrop One, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Síntesis del cDNA mediante la reacción de la transcriptasa reversa

Para determinar el perfil de expresión de los cuatro miRNA se utilizó el método de transcriptasa reversa. Para la obtención del cDNA se utilizó el equipo Acces RT-PCR System (cat A1250; Promega, Madison WI, USA). En tubos Eppendorf independientes se agregaron 2.5 µL (3 ng) de RNA, 5 µL (1X) buffer AMV-TfI (cat A1260; Promega), 1 µL dNTP (10 mM), 2 µL $MgSO_4$ (50 mM), 10 µL ddH_2O, 1 µL AMV RT, y 1 µL (20 pmol) de la secuencia específica de iniciadores: hsa-miR-21 (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACT), hsa-miR-141 (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCATCT), hsa-miR-200b (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCATCA),

https://doi.org/10.24245/gom.v89i3.4818

hsa-miR-210 (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGCC). La mezcla de reacción se incubó a 55 °C durante una hora y, al finalizar la reacción, se inactivó a 70 °C durante 15 minutos. El cDNA se almacenó a 4 °C hasta su amplificación por PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificaron mediante PCR 2 µL del cDNA de cada muestra, la reacción se efectuó en tubos de 0.2 mL en un termociclador (Techne Touchgene gradient). La mezcla de reacción contenía 5 µL (1X) buffer AMV-TfI (Promega), 1 µL (20 pmol) de las secuencias de los iniciadores hsa-miR-21 (CCGGCCGATCGAATAG), hsa-miR-141 (CGGCCGTAACACTGTCTG), hsa-miR-200b (CGGCCGTAATACTGCCTGG), y hsa-miR-210 (CGGCCGCTGTGCGTGT), y 1 µL de la secuencia universal (GTGCAGGGTCCGAGGT). Las condiciones de PCR fueron: 94 °C durante 30 segundos y 40 ciclos (94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos) y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los amplificados se mezclaron con Tris-ácido acético EDTA 1X (TAE; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y las muestras se analizaron en geles de agarosa al 4.0% con solución amortiguadora de TAE 1x (TAE; BioRad). Los geles se procesaron a 60 V a temperatura constante durante 40 minutos. Por último, los geles se visualizaron en luz ultravioleta (Gel Doc 2000, BioRad), y se captó la imagen para su análisis. La densidad óptica de cada banda se obtuvo mediante el programa de ImageJ (NIH, USA) y se expresó en unidades arbitrarias.

Los datos demográficos (edad de la madre, índice de masa corporal, concentración de hormonas, y expresión de la densidad óptica de los hsa-miRNAs entre los grupos) se analizaron con t de Student (SigmaStat version 10.0, USA). Los resultados se presentan con media ± desviación estándar; se consideró con diferencia estadísticamente significativa el valor menor a 0.05.

RESULTADOS

De acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión, la muestra de estudio se integró con 21 pacientes de las que 11 se asignaron al grupo de endometriosis leve (n = 6) o moderada (n = 5), y el grupo control pacientes sin endometriosis (n = 10). El **Cuadro 1** muestra las características demográficas de los dos grupos de estudio. La edad de las pacientes (p = 0.268), índice de masa corporal (p = 0.392) y los valores de FSH (p = 0.275) y LH (p = 0.549) tomados en la fase folicular temprana no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de

Cuadro 1. Características clínicas de las pacientes estudiadas con y sin endometriosis

Variable	Control (n = 5)	Endometriosis (n = 6)	P
Edad (años)	32.3 ± 4.2	30.1 ± 4.8	0.268
IMC (kg/m²)	25.3 ± 2.6	26.5 ± 3.4	0.392
Tabaquismo, n	2	0	≤ 0.001
Intensidad del dolor (EVA)	1.7 ± 2.1	4.45 ± 3.6	0.045
Grado de endometriosis (rASRM stage)			
I-II, n	N.A	6	
III-IV, n	N.A	5	
FSH (mU/mL)	5.8 ± 3.2	5.8 ± 4.8	0.275
LH (mU/mL)	2.7 ± 1.2	3.8 ± 3.4	0.549
Padecimientos agregados			
RI n	2	3	0.320
HSC n	3	6	≤ 0.001
SOP n	4	0	≤ 0.001

IMC: índice de masa corporal; EVA: escala visual análoga, rASRM: revisión de la American Society of Reproductive Medicine; FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante; RI: resistencia a la insulina; HSC: hipotiroidismo subclínico; SOP: síndrome de ovario poliquístico. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar y la prueba estadística se realizó mediante la prueba de t de Student.

endometriosis *versus* el grupo control (**Cuadro 1**). En las pacientes con endometriosis se encontraron dos grados de severidad agrupados en tipo I-II (6/11) y III-IV (5/11). En cuanto a la intensidad del dolor pélvico, valorado por la escala visual analógica, se encontró aumento significativo de 2.6-veces en las pacientes con endometriosis *versus* el grupo control (p = 0.045; **Cuadro 1**). En estos grupos de estudio se encontraron padecimientos agregados: resistencia a la insulina (p = 0.32; **Cuadro 1**), hipotiroidismo subclínico ($p \leq 0.001$) y síndrome de ovario poliquístico ($p \leq 0.001$).

Perfil de expresión de los miRNAs

La expresión del hsa-miR-21 y hsa-miR-200b aumentó significativamente 1.3 (p =0.008; **Figura 1**) y 1.18-veces (p = 0.032; **Figura 3**) respectivamente en pacientes con endometriosis *versus* el grupo control. El hsa-miR-141 no fue estadísticamente significativo entre ambos grupos (p =0.149; **Figura 2**). Por último, el hsa-miR-210 disminuyó 1.26-veces en las pacientes con evidencia de endometriosis, aunque no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control (p =0.073; **Figura 4**).

En las pacientes con diagnóstico de endometriosis a quienes se practicó el procedimiento de electrofulguración (n = 5) se observó disminución significativa de 1.41, 1.10, y 1.10-veces en el hsa-miR-21 (p = 0.002), -141 (p = 0.03), y -210 (p = 0.009), respectivamente, *versus* las pacientes con endometriosis sin electrofulguración (n = 6; **Cuadro 2**). Por último, el hsa-miR-200b dismi-

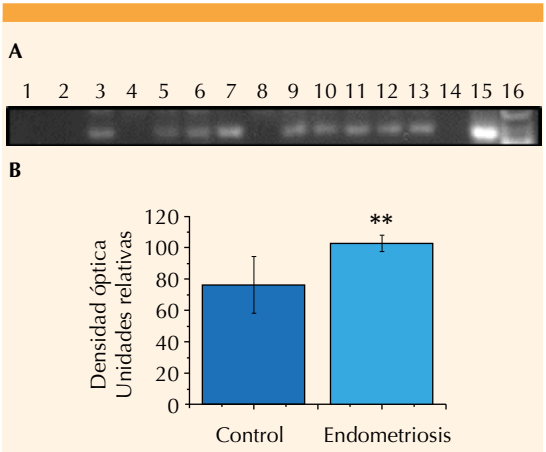


Figura 1. Expresión de PCR del hsa-miR-21. Se muestra la expresión diferencial entre el grupo de pacientes sanas (control), y con endometriosis **(A).** La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La gráfica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión **(B).** Se indica la diferencia estadísticamente significativa **p = 0.008.

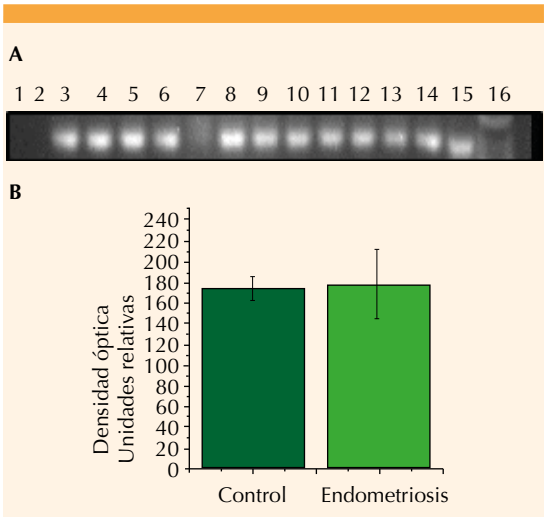


Figura 2. Expresión de PCR del hsa-miR-141. Se muestra la expresión diferencial entre el grupo de pacientes sanas (control), y con endometriosis **(A).** La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La gráfica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión **(B).** No se encontró diferencia estadísticamente entre ambos grupos p = 0.149.

https://doi.org/10.24245/gom.v89i3.4818

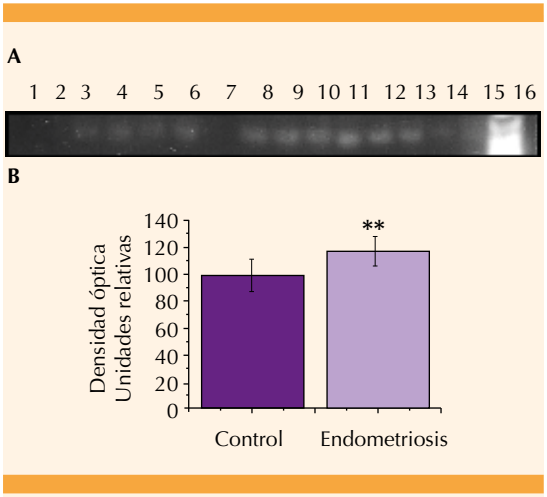


Figura 3. Expresión de PCR del hsa-miR-200b. Se muestra la expresión diferencial entre el grupo de pacientes sanas (control), y con endometriosis **(A).** La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La gráfica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión **(B).** Se indica la diferencia estadísticamente significativa **p = 0.032.

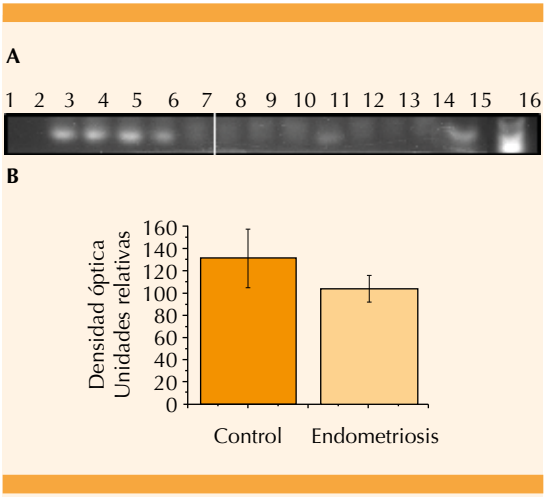


Figura 4. Expresión de PCR del hsa-miR-210. Se muestra la expresión diferencial entre el grupo de pacientes sanas (control), y con endometriosis **(A).** La imagen es representativa y se muestra el control negativo (carril 1), muestras de pacientes del grupo control (carriles 2-9), y la expresión de las pacientes con endometriosis (carriles 10-14), control positivo de carga (carril 15), y marcador de peso molecular (carril 16). La gráfica muestra la densidad óptica (unidades relativas) de las bandas de expresión **(B).** Se indica la diferencia estadísticamente significativa p = 0.073.

nuyó 1.0-veces en las pacientes con fulguración aunque no fue estadísticamente significativo con respecto a las pacientes con endometriosis sin elecrofulguración (p = 0.369; **Cuadro 2**).

En estas 6 pacientes no se realizó electrofulguración conforme al criterio de cada cirujano, por encontrarse los focos endometriósicos en sitios anatómicos de riesgo para la aplicación de energía: vejiga, recto o vasos sanguíneos.

DISCUSIÓN

Se analizaron el nivel de expresión del hsa-miR-21, -210, -200b, -141 y la endometriosis. Los principales hallazgos fueron: *1*) el hsa-miR-21 (**Figura 1**) y el hsa-miR-200b (**Figura 3**) aumentaron su expresión en las pacientes con endometriosis con respecto al grupo control; y *2*) la fulguración reduce significativamente la expresión del hsa-miRNA-21, -141, y -210 con respecto a las pacientes con endometriosis sin fulguración (**Cuadro 2**). El hsa-miR-21 y el

Cuadro 2. Pacientes con endometriosis y con procedimiento de electrofulguración de focos endometriósicos y pacientes sin electrofulguración a lesiones

hsa-miR	Electrofulguración (n = 5)	Sin electrofulguración (n = 6)	p
-21	63.5 ± 11.7	89.5 ± 9.0	0.002
-141	174.6 ± 9.9	186.6 ± 5.2	0.030
-200b	97.4 ± 6.5	101.0 ± 6.0	0.369
-210	99.0 ± 7.1	109.0 ± 2.5	0.009

Los datos se presentan con media ± desviación estándar y la prueba estadística se realizó con t de Student.

hsa-mir-200b promueven diferentes vías de señalización involucradas con la endometriosis. **Cuadro 3**

Está reportado, en tejido endometrial[29] y en el plasma[25] de pacientes con endometriosis el incremento del hsa-miR-21 que modula la función de la proteína ARID1A/BAF250a asociada con la transformación de cáncer ovárico.[30] Se ha determinado que el hsa-miR-21 modula a la proteína Notch1 involucrada con la cascada de señalización inflamatoria.[31] En la población estudiada solo se admitieron pacientes con endometriosis lo que aumentó significativamente la expresión del hsa-mir-21 con respecto al grupo control (**Figura 1**). Se demostró que el hsa-miR-21 se asocia con la modulación del factor de crecimiento endotelial vascular,[32] la secreción de las IL-8,[18,33] IL-1β,[34] y del TNF-α,[35,36] y la activación de la metaloproteasa de matriz extracelular (MMP).[3,37] Este proceso inflamatorio estimula a las células del estroma endometrial, macrófagos y a las células citotóxicas NK a la producción de IL-1β.[38] En el estudio aquí reportado se demostró que la electrofulguración de los focos endometriósicos disminuye la expresión del hsa-miR-21. Faltó evaluar a las citocinas de la respuesta inflamatoria, lo que se hará en otra etapa del estudio.

Rekker y colaboradores[39] demostraron, en el plasma de pacientes con endometriosis, la disminución significativa en la expresión del hsa-miR-200a, -200b, y -141 modificando la transición del epitelio mesenquimal. El modelo de acción entre la familia de hsa-miR-200 y el efecto en el epitelio mesenquimal es mediado por los factores transcripcionales represores (ZEB1, y ZEB2; zinc *finger E-box-binding homeobox)*, y la proteína SIP1 (*smad-interacting protein* 1). La disminución del hsa-miR200 incrementa la expresión del epitelio mesenquimal al bajar

Cuadro 3. Vías de señalización y blancos moleculares del hsa-miR-21 y hsa-miR210b en la endometriosis

hsa-miRNA	Regulación	Función en la endometriosis	Ref
-21	VEGF ↑	Incrementa la permeabilidad vascular y la fosforilación de proteínas de señalización, induce la degradación de la matriz extracelular por la MMP-3 y -9	30
	HIF-1α ↑	Incrementa la apoptosis y proliferación celular, metástasis y tumoración	44, 45
	MMIF ↑	Activa la respuesta inflamatoria de las células T	46
	IL-1β ↑	Modula las células inmunológicas y activa el TNFα de las proteínas degradantes de MMP-3	32
	IL-8 ↑	Recluta células de la respuesta inflamatoria, y promueve la apoptosis en las células endometriales	32
	TNFα ↑	Modula la respuesta inmunológica y es un activador degradante del endotelio por la MMP-3, y -9	18, 31
	MMP-3 ↑	Degrada los componentes de colágeno de la matriz extracelular, se asocia con la metástasis y tumores invasivos	36
-210	TEM ↑	Regula los factores de transición epitelial, y modula la expresión en el epitelio de las proteínas de adhesión celular E-cadherina.	38, 47
	MAPK ↑	Promueve la fosforilación de las proteínas de señalización intracelular de proliferación celular	39
	NFKβ ↑	Promueve la activación de la IL-1β, -8, TNFα, MMPs	40
	IL-1β ↑	Activa la respuesta inflamatoria de macrófagos y promueve la expresión de la proteína NOD2	41

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; HIF-1α: factor inducido por hipoxia; MMIF: factor inhibitorio de migración de macrófagos; MMP-3: metaloproteasa de matriz extracelular; NOD2: dominio de oligomerización a la proteína 2.

https://doi.org/10.24245/gom.v89i3.4818

la expresión de la proteína epitelial de tipo cadherina (E-cad) y favorecer la endometriosis.[40,41] Contrariamente en el estudio reportado en las pacientes con endometriosis se encontró aumento significativo del hsa-miR-200b con respecto al grupo control. Está demostrado que la familia del miR-200 se asocia con la regulación de factores de transcripción involucrados con la transición epitelial-mesenquimal (TEM),[24,42] la proteína cinasa de activación mitogénica y la vasculogénesis,[43] factor nuclear (NF)-Kβ[44] y la producción de IL-1β.[45]

Está demostrado que la fulguración reduce las molestias del dolor pélvico.[46,47] En este estudio en las pacientes a quienes se hizo fulguración de focos endometriósicos se observó una reducción significativa de 1.41-, 1.06-, y 1.1-veces en la expresión del hsa-miR-21, -141 y -210, respectivamente, con respecto a las pacientes con endometriosis a quienes no se les practicó ese procedimiento (**Cuadro 2**). No existen reportes en la bibliografía que indiquen los cambios en la secreción de las proteínas antes y después de la fulguración por lo que será demostrado en otro estudio.

CONCLUSIONES

Con lo aquí descrito se demuestra que las expresiones de hsa-miR-21 y hsa-miR-210b aumentaron significativamente en las pacientes con endometriosis por lo que estos miRNAs podrían utilizarse como posibles biomarcadores no invasivos; se han implicado en diversas vías de señalización inflamatoria, apoptosis y en la diferenciación de la respuesta inmunológica. El mecanismo de acción y la regulación en la expresión de estos miRNAs se tratará en otro estudio.

Agradecimientos

Este estudio se desarrolló con fondos federales del Instituto Nacional de Perinatología mediante el proyecto con número de registro 212250-22661 otorgado a HFH.

REFERENCIAS

1. Bulun SE. Endometriosis. N Engl J Med. 2009; 360 (3):268-79. doi: 10.1056/NEJMra0804690
2. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, et al. Endometriosis. Endocr Rev. 2019;40(4):1048-79. doi: 10.1210/er.2018-00242
3. Jiang L, Yan Y, Liu Z, Wang Y. Inflammation and endometriosis. Front Biosci (Landmark Ed). 2016;21:941-8. doi: 10.2741/4431.
4. Moini A, Malekzadeh F, Amirchaghmaghi E, Kashfi F, Akhoond MR, Saei M, et al. Risk factors associated with endometriosis among infertile Iranian women. Arch Med Sci. 2013;9(3):506-14. doi: 10.5114/aoms.2013.35420. Epub 2013 May 28.
5. Gu ZY, Jia SZ, Leng JH. Establishment of endometriotic models: the past and future. Chin Med J (Engl). 2020;133(14):1703-10. doi: 10.1097/CM9.0000000000000885.
6. Parasar P, Ozcan P, Terry KL. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. Curr Obstet Gynecol Rep. 2017;6(1):34-41. doi: 10.1007/s13669-017-0187-1. Epub 2017 Jan 27.
7. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. Am J Epidemiol. 2004;160(8):784-96. doi: 10.1093/aje/kwh275.
8. Gutt CN, Oniu T, Schemmer P, Mehrabi A, Buchler MW. Fewer adhesions induced by laparoscopic surgery? Surg Endosc. 2004;18(6):898-906. doi: 10.1007/s00464-003-9233-3.
9. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society of Reproductive S. Pathogenesis, consequences, and control of peritoneal adhesions in gynecologic surgery. Fertil Steril. 2008;90(5 Suppl):S144-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.02.031
10. Ferlita A, Battaglia R, Andronico F, Caruso S, Cianci A, Purrello M, et al. Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology. Int J Mol Sci. 2018;19(7):2120. doi: 10.3390/ijms19072120.
11. Takenaka K, Chen BJ, Modesitt SC, Byrne FL, Hoehn KL, Janitz M. The emerging role of long non-coding RNAs in endometrial cancer. Cancer Genet. 2016;209(10):445-55. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.09.005.
12. Luo W, Wu H, Ye Y, Li Z, Hao S, Kong L, et al. The transient expression of miR-203 and its inhibiting effects on skeletal muscle cell proliferation and differentiation. Cell Death Dis. 2014;5:e1347. doi: 10.1038/cddis.2014.289.
13. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function

and inflammation. Semin Cancer Biol. 2008;18(2):131-40. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.01.005. Epub 2008 Jan 15.

14. Guo F, Cogdell D, Hu L, Yang D, Sood AK, Xue F, et al. MiR-101 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and ZEB2 in ovarian carcinoma. Oncol Rep. 2014;31(5):2021-8. doi: 10.3892/or.2014.3106. Epub 2014 Mar 21.
15. Cho S, Mutlu L, Grechukhina O, Taylor HS. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. Fertil Steril. 2015;103(5):1252-60 e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.013. Epub 2015 Mar 13.
16. Zhang L, Li H, Yuan M, Li D, Sun C, Wang G. Serum Exosomal MicroRNAs as Potential Circulating Biomarkers for Endometriosis. Dis Markers. 2020;2020:2456340. doi: 10.1155/2020/2456340
17. Bjorkman S, Taylor HS. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates-dagger. Biol Reprod. 2019;100(5):1135-46. doi: 10.1093/biolre/ioz014.
18. Mari-Alexandre J, Barcelo-Molina M, Belmonte-Lopez E, Garcia-Oms J, Estelles A, Braza-Boils A, et al. Micro-RNA profile and proteins in peritoneal fluid from women with endometriosis: their relationship with sterility. Fertil Steril. 2018;109(4):675-84 e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.11.036. Epub 2018 Mar 28.
19. Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. Mol Endocrinol. 2009;23(2):265-75. doi: 10.1210/me.2008-0387. Epub 2008 Dec 12.
20. McKinnon BD, Kocbek V, Nirgianakis K, Bersinger NA, Mueller MD. Kinase signalling pathways in endometriosis: potential targets for non-hormonal therapeutics. Hum Reprod Update. 2016;22(3):382-403. doi: 10.1093/humupd/dmv060.
21. Tan A, Luo R, Liang H, Li M, Ruan P. Bioinformatics approach reveals the key role of CXC motif chemokine receptor 2 in endometriosis development. Mol Med Rep. 2018;18(3):2841-9. doi: 10.3892/mmr.2018.9275. Epub 2018 Jul 12.
22. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. Reprod Sci. 2015;22(9):1053-9. doi: 10.1177/1933719115592713. Epub 2015 Jul 12.
23. Wang D, Luo Y, Wang G, Yang Q. Circular RNA expression profiles and bioinformatics analysis in ovarian endometriosis. Mol Genet Genomic Med. 2019;7(7):e00756. doi: 10.1002/mgg3.756. Epub 2019 May 29.
24. Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barriere C, Pouly JL, Boespflug-Tanguy O, Penault-Llorca F, et al. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. Mol Hum Reprod. 2004;10(10):719-28. doi: 10.1093/molehr/gah097. Epub 2004 Aug 6.
25. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(5):1213-24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2726. Epub 2013 Jan 29.
26. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. J Cell Mol Med. 2009;13(1):39-53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
27. Kan CW, Hahn MA, Gard GB, Maidens J, Huh JY, Marsh DJ, et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. BMC Cancer. 2012;12:627. doi: 10.1186/1471-2407-12-627.
28. Zuberi M, Mir R, Das J, Ahmad I, Javid J, Yadav P, et al. Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. Clin Transl Oncol. 2015;17(10):779-87. doi: 10.1007/s12094-015-1303-1. Epub 2015 Jun 11.
29. Braza-Boils A, Salloum-Asfar S, Mari-Alexandre J, Arroyo AB, Gonzalez-Conejero R, Barcelo-Molina M, et al. Peritoneal fluid modifies the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis. Hum Reprod. 2015;30(10):2292-302. doi: 10.1093/humrep/dev204. Epub 2015 Aug 25.
30. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. N Engl J Med. 2010;363(16):1532-43. doi: 10.1056/NEJMoa1008433. Epub 2010 Sep 8.
31. Huang J, Qi Z. MiR-21 mediates the protection of kaempferol against hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury via promoting Notch1/PTEN/AKT signaling pathway. PLoS One. 2020;15(11):e0241007. doi: 10.1371/journal.pone.0241007. eCollection 2020.
32. Zhang F, Liu XL, Wang W, Dong HL, Xia YF, Ruan LP, et al. Expression of MMIF, HIF-1alpha and VEGF in Serum and Endometrial Tissues of Patients with Endometriosis. Curr Med Sci. 2018;38(3):499-504. doi: 10.1007/s11596-018-1906-1. Epub 2018 Jun 22.
33. Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis-associated infertility. Gynecol Obstet Invest. 2002;53 Suppl 1:19-25. doi: 10.1159/000049420.
34. Sikora J, Smycz-Kubanska M, Mielczarek-Palacz A, Bednarek I, Kondera-Anasz Z. The involvement of multifunctional TGF-beta and related cytokines in pathogenesis of endometriosis. Immunol Lett. 2018;201:31-7. doi: 10.1016/j.imlet.2018.10.011. Epub 2018 Oct 25.
35. Rossi M, Sharkey AM, Vigano P, Fiore G, Furlong R, Florio P, et al. Identification of genes regulated by interleukin-1beta in human endometrial stromal cells. Reproduction. 2005;130(5):721-9. doi: 10.1530/rep.1.00688
36. Wang XM, Ma ZY, Song N. Inflammatory cytokines IL-6, IL-10, IL-13, TNF-alpha and peritoneal fluid flora were associated with infertility in patients with endometriosis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(9):2513-8. doi: 10.26355/eurrev_201805_14899.
37. Ye H, He Y, Wang J, Song T, Lan Z, Zhao Y, et al. Effect of matrix metalloproteinase promoter polymorphisms on

https://doi.org/10.24245/gom.v89i3.4818

endometriosis and adenomyosis risk: evidence from a meta-analysis. J Genet. 2016;95(3):611-9. doi: 10.1007/s12041-016-0675-5

38. Yang HL, Zhou WJ, Chang KK, Mei J, Huang LQ, Wang MY, et al. The crosstalk between endometrial stromal cells and macrophages impairs cytotoxicity of NK cells in endometriosis by secreting IL-10 and TGF-beta. Reproduction. 2017;154(6):815-25. doi: 10.1530/REP-17-0342. Epub 2017 Oct 2.
39. Rekker K, Saare M, Roost AM, Kaart T, Soritsa D, Karro H, et al. Circulating miR-200-family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. Fertil Steril. 2015;104(4):938-46 e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.029. Epub 2015 Jul 20.
40. Agrawal S, Tapmeier T, Rahmioglu N, Kirtley S, Zondervan K, Becker C. The miRNA Mirage: How Close Are We to Finding a Non-Invasive Diagnostic Biomarker in Endometriosis? A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2018;19(2). doi: 10.3390/ijms19020599.
41. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol. 2008;10(5):593-601. doi: 10.1038/ncb1722. Epub 2008 Mar 30.
42. Matsuzaki S, Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. Hum Reprod. 2012;27(3):712-21. doi: 10.1093/humrep/der442. Epub 2012 Jan 2.
43. Hu W, Xie Q, Xu Y, Tang X, Zhao H. Integrated Bioinformatics Analysis Reveals Function and Regulatory Network of miR-200b-3p in Endometriosis. Biomed Res Int. 2020;2020:3962953. doi: 10.1155/2020/3962953. eCollection 2020.
44. Li M, Ye J, Zhao G, Hong G, Hu X, Cao K, et al. Gas6 attenuates lipopolysaccharideinduced TNFalpha expression and apoptosis in H9C2 cells through NFkappaB and MAPK inhibition via the Axl/PI3K/Akt pathway. Int J Mol Med. 2019;44(3):982-94. doi: 10.3892/ijmm.2019.4275. Epub 2019 Jul 12.
45. Li S, Deng P, Wang M, Liu X, Jiang M, Jiang B, et al. IL-1alpha and IL-1beta promote NOD2-induced immune responses by enhancing MAPK signaling. Lab Invest. 2019;99(9):1321-34. doi: 10.1038/s41374-019-0252-7. Epub 2019 Apr 24.
46. Clark NV, Dmello M, Griffith KC, Gu X, Ajao MO, Cohen SL, et al. Laparoscopic treatment of endometriosis and predictors of major complications: A retrospective cohort study. Acta Obstet Gynecol Scand. 2020;99(3):317-23. doi: 10.1111/aogs.13762. Epub 2019 Nov 25.
47. Flyckt R, Kim S, Falcone T. Surgical Management of Endometriosis in Patients with Chronic Pelvic Pain. Semin Reprod Med. 2017;35(1):54-64. doi: 10.1055/s-0036-1597306.

CITACIÓN ACTUAL

De acuerdo con las principales bases de datos y repositorios internacionales, la nueva forma de citación para publicaciones periódicas, digitales (revistas en línea), libros o cualquier tipo de referencia que incluya número doi (por sus siglas en inglés: Digital Object Identifier) será de la siguiente forma:

REFERENCIAS

1. Yang M, Gou, ZW, Deng CJ, Liang X, et al.* A comparative study of three different forecasting methods for trial of labor after cesarean section. J Obstet Gynaecol Res. 2017;25(11):239-42. https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2015.04..015**

* Cuando la referencia contiene hasta tres autores, éstos se colocarán de forma completa. En caso de 5 autores o más, solo se colocan cuatro, seguidos de la palabra en latín "et al".

** El registro Doi deberá colocarse con el link completo (como se indica en el ejemplo), sin punto final. salvo que así lo señale su cita original.