



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

MEDIKUNTZA  
ETA ERIZAINNTZA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE MEDICINA  
Y ENFERMERÍA

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Medikuntzako Gradua / Grado en Medicina

# MicroRNAs libres y asociados a vesículas extracelulares como biomarcadores diagnósticos no invasivos del endometrio implantativo

Egilea / Autor:

Jone Ibáñez Pérez

Zuzendaria / Director:

Roberto Matorras Weinig

Leioa, 2023ko apirila-ren 24a / Leioa, 24 de abril de 2023

## **ÍNDICE**

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. INFERTILIDAD .....	1
1.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA) .....	1
1.2.1. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) / Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	2
1.2.2. Transferencia embrionaria (TE) .....	3
1.3. IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.....	3
1.3.1. Embrión competente .....	4
1.3.2. Endometrio receptivo.....	6
1.3.2.1. Análisis de la biopsia endometrial .....	7
1.3.2.2. Análisis del fluido endometrial.....	8
1.3.3. Comunicación embrión-endometrio .....	9
1.3.3.1. Vesículas extracelulares (VEs).....	9
1.3.3.2. microRNAs.....	11
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	12
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1. MUESTRAS DE FLUIDO ENDOMETRIAL.....	13
4.1.1. Aprobación ética .....	13
4.1.2. Población de estudio .....	13
4.1.3. Criterios de inclusión.....	13
4.1.4. Participantes.....	13
4.1.5. Recogida, preparación y almacenamiento de las muestras.....	15
4.1.6. Preparación endometrial antes de la transferencia embrionaria .....	16
4.2. VITRIFICACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES.....	16
4.3. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	16
4.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE RNA.....	17
4.5. SÍNTESIS DE cDNA Y ENSAYO TaqMAN DE miRNAs .....	17
4.6. ENSAYO DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR).....	18

4.7.	SECUENCIACIÓN DE RNA PEQUEÑOS <i>SMALL RNA-SEQ</i> .....	19
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	19
4.9.	ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS miRNAs.....	19
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
5.1.	OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE FE Y LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE VEs BASADA EN LA TÉCNICA PBP .....	20
5.1.1.	Optimización de la obtención y el procesamiento de las muestras de FE .....	20
5.1.2.	Optimización de la técnica de aislamiento de VEs basada en la precipitación con polímeros (PBP).....	23
5.2.	COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS Y SELECCIÓN DE UNA METODOLOGÍA ROBUSTA PARA ANALIZAR MICRORNAs LIBRES Y ASOCIADOS A VEs PROCEDENTES DEL FE EN ENTORNOS CLÍNICOS.....	26
5.2.1.	Resultados de la comparación de las diferentes metodologías y el análisis mediante <i>Small RNA-seq</i> .....	27
5.2.2.	Resultados del experimento de reproducibilidad técnica .....	28
5.3.	APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS SELECCIONADAS EN UN CONJUNTO DE MUESTRAS (COHORTE DE DESCUBRIMIENTO) CON DIFERENTES RESULTADOS DE IMPLANTACIÓN PARA DISEÑAR UN MODELO PREDICTIVO DEL ENDOMETRIO IMPLANTATIVO .....	28
5.3.1.	Resultados del análisis del RNA mediante <i>Small RNA-seq</i> .....	29
5.3.2.	Resultados del análisis de abundancia diferencial de miRNAs.....	30
5.3.3.	Resultados del modelo predictivo de endometrio implantativo por qPCR.....	30
5.4.	VALIDACIÓN DE LOS MODELOS PREDICTIVOS EN UNA NUEVA COHORTE INDEPENDIENTE (COHORTE DE VALIDACIÓN) DE MUJERES CON DIFERENTES RESULTADOS DE IMPLANTACIÓN .....	31
5.4.1.	Resultados de validación del modelo 1 (PBP-M).....	32
5.4.2.	Resultados de la validación del modelo 2 (PBP-N).....	32
5.5.	RESULTADOS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS miRNAs VALIDADOS CON LAS VEs Y SU FUNCIÓN BIOLÓGICA EN EL PROCESO DE IMPLANTACIÓN .....	34
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero aprovechar esta oportunidad para dar las gracias a todas las personas que me han ayudado a realizar este trabajo.*

*Al Dr. Roberto Matorras, jefe de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Cruces, por la oportunidad ofrecida para llevar a cabo este trabajo de fin de grado.*

*Al Dr. Juan Manuel Falcón, jefe del Laboratorio de Exosomas y la Plataforma de Metabólica del CIC bioGUNE, por la ayuda ofrecida para llevar a cabo este trabajo de fin de grado.*

*A todo el equipo de la Unidad de Reproducción Humana del hospital de Cruces. En especial, a las biólogas, la Dra. María Díaz y a Lucía Lainz y a las ginecólogas, a la Dra. Begoña Prieto, a María Iglesias, a Aintzane Rabanal y a Miren Díez, por su ayuda en la recogida de muestras. También quiero dar las gracias a las pacientes que han participado en el estudio.*

*A todos los miembros del Laboratorio de Exosomas y la Plataforma de Metabólica. En especial, al Dr. Félix Royo y a la Dra. Esperanza González, por enseñarme las técnicas y protocolos necesarios para llevar a cabo este trabajo.*

## **PUBLICACIONES**

Los experimentos de optimización de la obtención y procesamiento de las muestras y los de optimización de la técnica de aislamiento basada en polímeros mostrados en este TFG (sección 5.1) no han sido publicados previamente. Los resultados obtenidos de estos experimentos han sido imprescindibles para llevar a cabo el resto de los experimentos que han dado lugar a la publicación de un artículo científico, una solicitud de patente y a la elaboración de mi tesis doctoral.

### Publicación:

- **Ibañez-Perez J**, Díaz-Nuñez M, Clos-García M, Lainz L, Iglesias M, Díez-Zapirain M, Rabanal A, *et al.* microRNA-based signatures obtained from endometrial fluid identify implantative endometrium. *Hum Reprod.* 2022;37(10):2375-91.

### Patente:

- Solicitud de patente europea nº EP21383049.0 para "miRNA signature for the identification of the receptive endometrium", en nombre de Asociación centro de investigación cooperativa en biociencias-CIC bioGUNE, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Administración general de la comunidad autónoma de Euskadi y Reprodalia, S.L.

### Tesis doctoral:

- Ibañez Pérez, J. Free and extracellular vesicle-associated microRNAs from endometrial fluid as non-invasive diagnostic biomarkers of implantative endometrium. Barakaldo; Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU. 2022.

## ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS

a-GnRH	Análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (a-GnRH).
AUC	Área bajo la curva (AUC por sus siglas en inglés).
cDNA	ADN complementario (cDNA por sus siglas en inglés).
Curva ROC	Curva de características operativas del receptor (ROC por sus siglas en inglés).
DCT-M	Extracción directa de RNA con el kit mirVana PARIS.
DCT-N	Extracción directa de RNA con el kit de purificación de RNA de plasma/suero de Norgen.
DNA	Ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés).
DS	Desviación estándar.
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE, por sus siglas en inglés).
FE	Fluido endometrial.
FET	Transferencia embrionaria de embriones vitrificados (FET por sus siglas en inglés).
FIV	Fecundación <i>in vitro</i> .
FSH	Hormona estimulante del folículo (FSH por sus siglas en inglés).
hCG	Gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés).
HMG	Gonadotropina menopaúsica humana (HMG por sus siglas en inglés).
IC	Intervalo de confianza.
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI por sus siglas en inglés).
IMC	Índice de masa corporal.

LH	Hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés).
microRNA	Ácido ribonucleico pequeño (microRNA por sus siglas en inglés).
miR	microRNA maduro.
miRNA	microRNA.
PBP	Precipitación basada en polímeros.
PBP-AF	Protocolo de precipitación basada en polímeros para el líquido amniótico.
PBP-CSF	Protocolo de precipitación basada en polímeros para el líquido cefalorraquídeo.
PBP-M	Enriquecimiento de VEs con el método PBP y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS.
PBP-N	Enriquecimiento de VEs con el método PBP y extracción de RNA con el kit de purificación de RNA Norgen Plasma/Suero.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (PBP por sus siglas en inglés).
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés).
RNA	Ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés).
Small RNA-seq	Secuenciación de RNA pequeños (Small RNA-seq por sus siglas en inglés).
TE	Transferencia embrionaria.
TRA	Técnicas de reproducción asistida.
UC-M	Enriquecimiento de VEs mediante ultracentrifugación y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS.
VEs	Vesículas extracelulares.
WOI	Ventana de implantación (WOI por sus siglas en inglés).

## RESUMEN

Aumentar las tasas de implantación embrionaria se ha convertido en uno de los mayores retos de las técnicas de reproducción asistida. La implantación es un proceso complejo que requiere una sincronía entre el desarrollo del embrión y el endometrio, pero también una adecuada comunicación entre ambos. Los microRNAs (miRNAs) libres o asociados a vesículas extracelulares (VEs) del fluido endometrial (FE) se han descrito como mediadores de la comunicación embrión-endometrio. Por eso creemos que el análisis de miRNAs libres y asociados a VEs procedentes del FE podría utilizarse para desarrollar una metodología no invasiva que permitiera reconocer el endometrio implantativo. En este estudio prospectivo, en primer lugar, se optimizaron diferentes métodos para el análisis de VEs y miRNAs utilizando el FE de una cohorte de puesta a punto (n = 72). Dos de los métodos consistían en una extracción directa de RNA mientras que en los otros tres se realizó un enriquecimiento de VEs antes de la extracción de RNA. El RNA se analizó mediante *Small RNA-seq* y qPCR y se determinó que los métodos más eficientes eran los protocolos que utilizaron el enriquecimiento de VEs mediante la precipitación basada en polímeros (PBP-M y PBPB-N). A continuación, los métodos seleccionados se probaron en dos grupos de mujeres con diferente resultado de implantación (ciclo implantativo n= 45 y ciclo no implantativo n=45) y se analizaron los miRNAs diferencialmente expresados. Finalmente, se logró obtener dos modelos predictivos del endometrio implantativo (p valor <0,05) basados en tres miRNAs. El modelo 1 (PBP-M) utilizó los miRNAs hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-148b-3p, y el modelo 2 (PBP-N) utilizó hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-99b-5p. Además, se realizó un análisis funcional de estos miRNAs que mostró una fuerte asociación con procesos clave de la implantación embrionaria. En conclusión, gracias a este estudio se han descrito dos métodos no invasivos para analizar miRNAs procedentes del FE que podrían aplicarse en la práctica clínica para evaluar el estado del endometrio antes de realizar la transferencia embrionaria y así evitar la pérdida de embriones al ser transferidos a un endometrio que no está listo para que ocurra la implantación.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. INFERTILIDAD

La infertilidad es una enfermedad compleja que afecta aproximadamente a 1 de cada 8 parejas que se encuentran en edad fértil (1) y se describe como "una enfermedad del aparato reproductor definida por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico tras 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección" (2). Esta definición implica dos tipos de infertilidad: (i) infertilidad primaria: cuando una persona/pareja nunca ha logrado un embarazo o (ii) infertilidad secundaria: cuando se ha logrado al menos un embarazo previo (2).

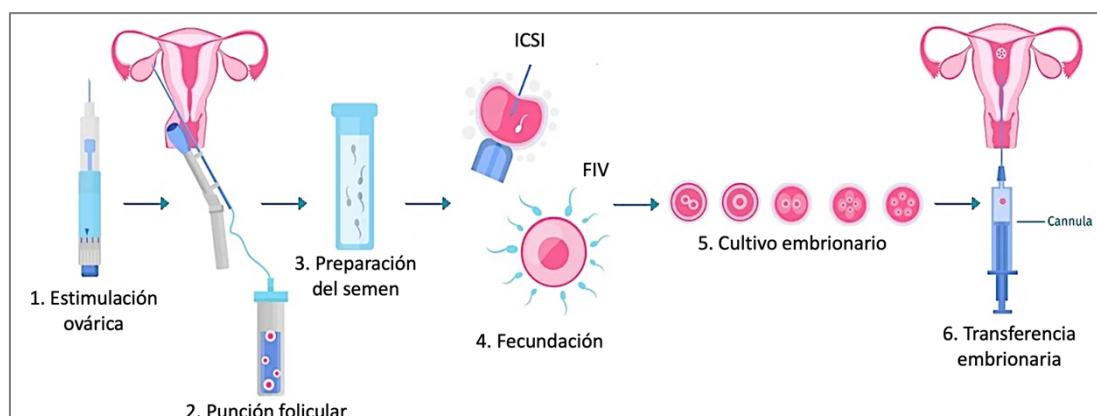
En las últimas décadas la tasa de infertilidad se ha ido incrementando, en gran parte, debido a los cambios en el estilo de vida y al retraso en la edad en el que se plantea la reproducción. Todo esto ha hecho que cada vez se recurra más a las técnicas de reproducción asistida (TRA) para lograr un embarazo (3).

### 1.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)

Las TRA incorporan una amplia gama de tecnologías que se utilizan para aumentar la probabilidad de conseguir un embarazo (4). En la mayoría de los casos, el proceso diagnóstico o las características individuales (mujeres sin pareja masculina, pacientes sin función ovárica, mala calidad del semen, etc.) permiten a los médicos determinar cuál de las técnicas disponibles sería la más adecuada como primera línea de tratamiento, y así, ofrecer la relación más apropiada entre beneficios, complejidad, costes y riesgos (5). Entre las TRA más utilizadas se encuentran la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, por sus siglas en inglés) (6). El último registro de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE, por sus siglas en inglés) mostró que en Europa se realizan al año 1.007.598 de ciclos FIV-ICSI. Sin embargo, y a pesar de que las TRA han mejorado sustancialmente en los últimos años, las tasas de embarazo por transferencia siguen siendo bajas (6). En Europa la tasa de embarazo se encuentra entono al 35%, mientras que en España es algo mejor, aunque en la mayoría de los casos no supera el 60% (6).

### 1.2.1. Fecundación *in vitro* (FIV) / Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Las técnicas de FIV e ICSI habitualmente siguen el mismo protocolo y la diferencia entre las dos técnicas radica en la manera en la que se fecunda el óvulo (**Figura 1**) (7,8). En ambos casos el primer paso es la estimulación ovárica controlada, cuyo objetivo es obtener un número razonable de ovocitos manipulando farmacológicamente el ciclo ovárico fisiológico para inducir un desarrollo folicular múltiple (7,8). Para ello es necesario someter a la mujer a una frenación hipofisiaria con análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas ( $\alpha$ -GnRH) y estimular el desarrollo folicular con la hormona estimulante del folículo (FSH) y con frecuencia con acción LH (hormona luteinizante o gonadotropina menopáusica humana (HMG))(7). En una segunda fase, cuando el diámetro de los folículos estimulados se sitúa entre 17 y 19 mm se induce la maduración ovocitaria con gonadotropina coriónica humana (hCG) (o agonistas GnRH) y 36 horas después se realiza una punción-aspiración folicular eco-guiada bajo sedación para la obtención de los ovocitos (7). Tras la obtención de los ovocitos se procede a la fecundación. Durante un ciclo de FIV, los ovocitos y el semen se recuperan y se incuban juntos en una placa de laboratorio para facilitar la fecundación espontánea. En cambio, la ICSI implica una intervención más activa y consiste en inyectar un solo espermatozoide en el citoplasma del ovocito con la ayuda de una micropipeta para fecundarlo (8). Tras la fecundación, los embriones se cultivan durante 3-5 días antes de realizar la transferencia embrionaria (TE) (8).



**Figura 1. Procedimiento FIV/ICSI.** Fuente: <https://www.news-medical.net/health/Stages-of-IVF.aspx>

### **1.2.2. Transferencia embrionaria (TE)**

La TE puede realizarse en el mismo ciclo en el que se ha realizado la fecundación (transferencia en fresco) o puede postponerse mediante la congelación de los embriones (transferencia de embriones vitrificados (FET por sus siglas en inglés)). En la transferencia en fresco el embrión se transfiere 3-5 días después de la fecundación y habitualmente se añade progesterona en la segunda fase para suplementar el estrógeno y la progesterona de los folículos ováricos que ayudan a preparar el endometrio para la implantación. Por el contrario, en la FET el embrión puede transferirse meses o años más tarde y suele ser necesaria la suplementación con estrógenos y progesterona para preparar el endometrio antes de realizar la TE (9,10).

En general, la selección de la TE en fresco o la FET debe considerarse de forma individual. La FET es una práctica que se realiza cada vez con más frecuencia (10) y resulta apropiado aplicarla en pacientes con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, hiperrespondedoras, aquellas sometidas a cribado genético preimplantacional (PGS) o para embriones procedentes de ciclos previos de FIV/ICSI (9).

La TE es el paso más ineficiente de las TRA y a pesar de todas las mejoras que se han realizado a lo largo de los años, menos del 60% de los embriones que se transfieren al útero implantan (6).

### **1.3. IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**

El proceso de la implantación embrionaria en los ciclos de FIV/ICSI ha sido ampliamente estudiado con el objetivo de entenderlo y tratar de mejorarlo (11,12). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, menos del 60% de los embriones que se transfieren al útero implantan (6). Por este motivo, aumentar las tasas de implantación embrionaria se ha convertido en uno de los mayores retos de las TRA. En los últimos años se ha descrito que el éxito de la implantación no solo requiere de una adecuada sincronía entre el desarrollo del endometrio y el embrión, sino que también de una adecuada comunicación entre el embrión y el endometrio (11–14).

Por lo tanto, se ha descrito que una implantación exitosa requiere de:

- (i) Un embrión competente (15).
- (ii) Un endometrio receptivo (16).
- (iii) Una adecuada comunicación embrión-endometrio (11).

### 1.3.1. Embrión competente

Habitualmente en la práctica clínica, a partir de un único ciclo de FIV/ICSI, se producen varios embriones y es crucial seleccionar los embriones más viables para realizar la TE y lograr un embarazo (8). La selección embrionaria se lleva a cabo en el laboratorio y puede basarse en distintos aspectos como las características morfológicas y la dinámica del desarrollo mediante tecnología “*time-lapse*”(17), el consumo metabólico (18,19), o el análisis genético preimplantacional (20), aunque no todos los métodos están disponibles en todos los laboratorios de reproducción asistida.

El método de selección embrionaria más ampliamente utilizado se basa en combinar la morfología y la dinámica del desarrollo mediante tecnología “*time-lapse*” para calificar a los embriones y asignarles una categoría en función de los resultados obtenidos (21). La categoría que se les asigna a los embriones se utiliza para predecir el potencial para alcanzar el estadio de blastocisto (embrión de 5 o 6 días de desarrollo), la tasa de implantación y la de tasa embarazo de cada uno de los embriones (21).

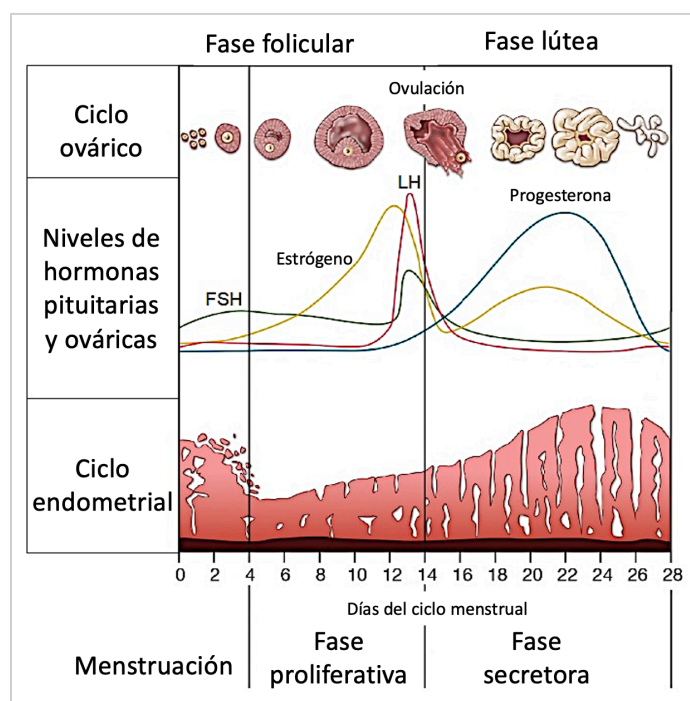
Existen diferentes nomenclaturas para la clasificación de los embriones, entre las que destacan los criterios de evaluación establecidos en el consenso de Estambul sobre evaluación embrionaria (21). En España, siguiendo dichas recomendaciones, la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) propuso una escala de clasificación en la que a cada embrión se le asigna una calidad en función de la probabilidad que tenga para implantar, siendo los embriones de calidad “A” los que más probabilidad tiene de implantar y los de calidad “D” los que menos (**Figura 2**) (22). Sin embargo, y como se ha explicado anteriormente, aunque se realice la TE con embriones de buena calidad (A o B) menos del 60% implantan (6).

		TROFOECTODERMO			
		A	B	C	D
MASA CELULAR INTERNA	A				
	B				
	C				
	D				

**Figura 2. Clasificación ASEBIR de los blastocistos.** Evaluación de la calidad del blastocisto según su masa celular interna y la calidad del trofoectodermo. ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. Categoría A: embrión de calidad óptima con máxima capacidad de implantación. Categoría B: embrión de buena calidad con alta capacidad de implantación. Categoría C: embrión regular con probabilidad media de implantación. Categoría D: embrión de mala calidad con baja probabilidad de implantación, en esta categoría se encuentran embriones con diversas anomalías que hacen que su probabilidad de implantación sea prácticamente nula. Fuente: Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Gobalo, 3a ed. Madrid, 2015, (22).

### 1.3.2. Endometrio receptivo

El endometrio experimenta cambios cíclicos en respuesta a las hormonas esteroideas ováricas durante el ciclo menstrual (23). El ciclo endometrial comienza con la fase menstrual y se continúa con la fase proliferativa donde ocurre la proliferación y la diferenciación de las células endometriales (24). Tras la ovulación da lugar al comienzo de la fase secretora (25). En esta fase el endometrio adquiere un fenotipo adhesivo que permite que ocurra la implantación embrionaria, esto es, se transforma en un endometrio receptivo (14,16). Sin embargo, el endometrio sólo se encuentra receptivo durante un breve periodo de tiempo dentro de la fase secretora conocido como la “ventana de implantación” (“*Window of implantation*” (WOI) por sus siglas en ingles), entre los días 20 y 24 del ciclo menstrual (26), aproximadamente 5-9 días después de la ovulación (27) (**Figura 3**).



**Figura 3. Cambios ováricos, endometriales y hormonales durante el ciclo menstrual.** Durante el ciclo menstrual se producen simultáneamente dos sub-ciclos, ambos regulados hormonalmente: el ciclo ovárico y el endometrial (23). El ciclo ovárico se divide en dos fases, la fase folicular (días 1-14) y la fase lútea (días 15-28), y la ovulación se produce el día 14 (24). Por otro lado, el ciclo endometrial tiene tres fases, la menstruación (días 1-5), la fase proliferativa (días 6-14) y la fase secretora (días 15-28) (25). En la parte superior de la figura se muestran los cambios que se producen en el ovario durante los días del ciclo. En el centro se muestra la gráfica con los niveles de hormonas pituitarias (LH y FSH) y hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) durante las diferentes fases del ciclo. En la parte inferior se muestra una imagen en la que se puede apreciar el incremento en el grosor del endometrio a medida que avanza el ciclo endometrial el cual coincide con el aumento de hormonas ováricas. **LH:** hormona luteinizante. **FSH:** hormona foliculo estimulante. Fuente: Clayton, 2019 (28).

La determinación de la WOI en los ciclos de FIV/ICSI ha sido ampliamente estudiado con el objetivo de conocer la regulación, función y composición del endometrio y poder determinar si el endometrio está preparado o no para que ocurra la implantación. Habitualmente en la práctica clínica se realiza un control ecográfico del grosor endometrial y cuando el endometrio se encuentra trilaminar y adquiere un grosor de entre 8 y 14 mm se programa la transferencia embrionaria (29,30). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en esta “situación óptima” menos del 60% de los embriones transferidos implantan (6).

En los últimos años la receptividad endometrial ha sido el foco de numerosos proyectos de investigación con el objetivo de mejorar las tasas de implantación embrionarias en las TRA (31,32). A pesar de los resultados obtenidos, se ha avanzado poco en la traducción del conocimiento en pruebas predictivas o tratamientos clínicamente significativos, por lo que todavía es necesario identificar nuevos biomarcadores que ayuden a determinar el momento óptimo para realizar la TE. Entre los métodos adicionales que se están desarrollando para evaluar el estado del endometrio antes de realizar la TE se encuentran el análisis de la biopsia endometrial y el análisis del fluido endometrial.

#### 1.3.2.1. Análisis de la biopsia endometrial

La receptividad endometrial ha sido objeto de estudio durante muchos años y uno de los primeros en analizarla fue el grupo de Noyes *et al.* (33). En 1953, establecieron los criterios de Noyes basándose principalmente en el estudio de biopsias endometriales durante el ciclo menstrual para caracterizar cada una de las fases. Así, clasificaron la fase proliferativa en temprana, media y tardía, además, describieron los cambios histológicos que se producían durante la fase secretora y establecieron el término de endometrio receptivo (33). Con el desarrollo de las "-ómicas" (transcriptómica, proteómica, lipidómica...), además de obtener datos histológicos, fue posible obtener datos moleculares para cada fase del ciclo (31,34). Estas técnicas de alto rendimiento han permitido examinar los cambios en la expresión génica durante el ciclo menstrual (35–37), el perfil de expresión génica de la WOI (38), las modificaciones transcriptómicas durante el ciclo (39–41) y el contenido proteómico (42–44) y lipidómico (45,46) de las muestras endometriales obtenidas en diferentes momentos.

Estos avances han permitido desarrollar biomarcadores para determinar el estado del endometrio y saber si se encuentra receptivo o no. Sin embargo, el análisis de la biopsia endometrial es un procedimiento invasivo que no permite realizar la TE en el mismo ciclo en el que se ha obtenido la muestra (47), y los resultados se extrapolan al siguiente ciclo para realizar la TE.

#### 1.3.2.2. Análisis del fluido endometrial

El fluido endometrial (FE) es un fluido biológico complejo presente en la cavidad uterina que es fuente de numerosas moléculas secretadas por el endometrio (48,49). Se ha descrito que el contenido del FE puede modular la homeostasis y la receptividad endometrial (50), y además se ha comprobado que desempeña un papel muy importante en la comunicación embrión-endometrio dado que es necesario para mantener al embrión e iniciar el proceso de implantación (50).

La recogida del FE se realiza mediante aspiración y se obtiene un pequeño volumen comprendido entre 5-50  $\mu$ L (48). Una de las ventajas que tiene la aspiración del fluido endometrial es que al tratarse de una técnica no invasiva la TE puede realizarse en el mismo ciclo en el que se ha recogido la muestra (47-49). Está demostrado que la aspiración del FE inmediatamente antes de la TE no afecta a las tasas de implantación embrionaria (47,51).

Al análisis del FE como fuente de biomarcadores no invasivos está cobrando fuerza en el estudio de la receptividad endometrial, varios estudios han analizado las secreciones uterinas durante el ciclo endometrial, haciendo hincapié en la búsqueda de biomarcadores durante la WOI (52-55). Algunos estudios han encontrado proteínas expresadas diferencialmente entre las distintas fases del endometrio (52-54) y otros autores también han descrito diferentes patrones de expresión transcriptómica a lo largo del ciclo menstrual (56). En esta línea, el análisis lipidómico del FE se ha descrito como una herramienta emergente para predecir la receptividad endometrial (57). Sin embargo, en la mayoría de los casos, para definir el endometrio como "receptivo" se han utilizado métodos histológicos, lo que no ha permitido realizar la TE en el mismo ciclo en el que se ha obtenido la muestra.



La única manera de confirmar que un endometrio es receptivo es tomando la muestra de FE en el mismo ciclo en el que se ha producido el embarazo. Por ello, ha surgido un nuevo concepto para estudiar el endometrio desde el punto de vista reproductivo: **endometrio implantativo** (58–60). El término "endometrio implantativo" hace referencia al endometrio en el cual ha ocurrido la implantación embrionaria en el mismo ciclo en el que se ha obtenido la muestra de FE (59). Son poco los investigadores que han estudiado el endometrio implantativo, pero los resultados han sido positivos, lo que apoya el análisis del FE como fuente de biomarcadores no invasivos del endometrio implantativo (58–66).

### **1.3.3. Comunicación embrión-endometrio**

Una adecuada comunicación embrión-endometrio es crucial para el éxito de la implantación embrionaria (50,67) y comienza cuando el embrión entra en el útero y se pone en contacto con el microambiente uterino (50). El FE contiene nutrientes, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas secretadas principalmente por el endometrio que desempeñan un papel importante como primera línea de comunicación célula a célula (50,67). Entre los componentes que juegan un papel importante como primera línea de comunicación se encuentran las vesículas extracelulares (VEs) y los microRNAs (miRNAs).

#### **1.3.3.1. Vesículas extracelulares (VEs)**

Las VEs son estructuras delimitadas por una membrana lipídica que secretan todos los tipos de células al medio extracelular (68). La composición y el contenido de las VEs se modifica en función de la fisiopatología celular, por lo que el análisis de estas vesículas proporciona información sobre el estado de la célula de origen (68). Esta característica ha hecho que las VEs se conviertan en una fuente de biomarcadores muy importante (69,70). Además, el análisis de las VEs ofrece muchas ventajas; la membrana lipídica hace que las VEs sean más resistentes y proporciona una mayor protección al contenido molecular interno, además, la presencia de proteínas en la membrana permite la identificación específica del tipo de vesícula y también el origen celular (71–73) (**Figura 4**).

En los últimos años se ha incrementado el estudio de las vesículas extracelulares (VEs) como modelo de comunicación célula-célula (74) y la presencia de VEs en el microambiente uterino ha ido cobrando importancia como moléculas clave en el proceso de implantación (75,76). Varios estudios han analizado la presencia de las VEs durante el ciclo menstrual y han determinado que la secreción es dependiente de las hormonas y que el contenido de las VEs cambia en función de la fase endometrial (77,78). Otros estudios han analizado la relación de las VEs con la implantación embrionaria en modelos “in vitro” y han demostrado que las VEs secretadas por el endometrio son captadas por los embriones y la liberación de su contenido, en concreto la liberación de miRNAs, es capaz de aumentar la capacidad adhesiva de los embriones, lo que mejora su capacidad de implantar (56,79).

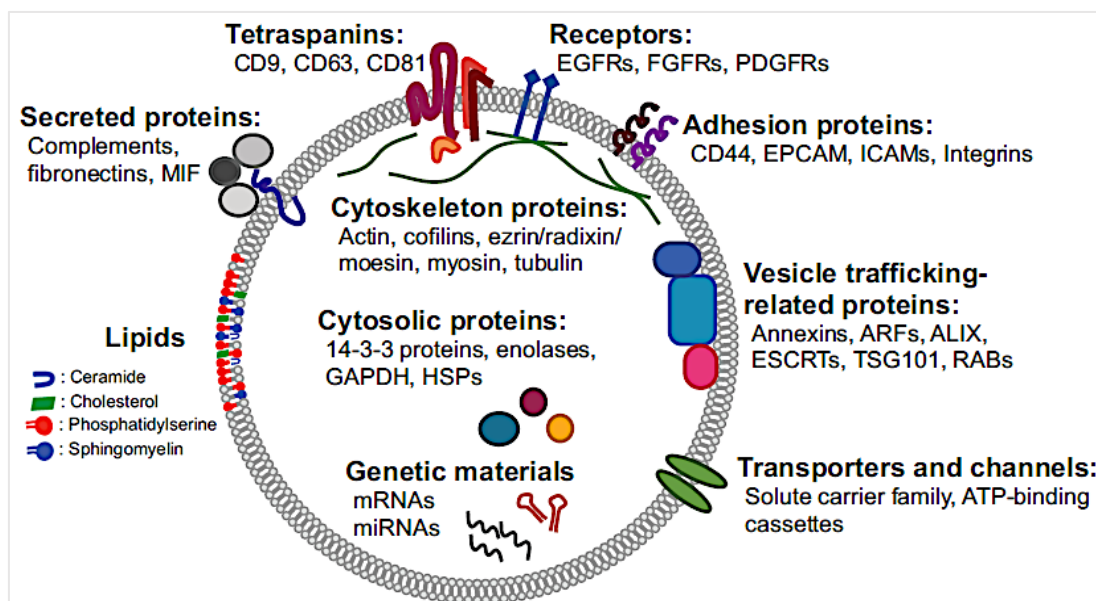


Figura 4. Composición de las vesículas extracelulares (VEs). Fuente: Choi *et al.*, 2015 (73).

### 1.3.3.2. microRNAs

Los microRNA (miRNA) son un tipo de RNA no codificante que regula aproximadamente el 50% de los genes humanos (80). Los miRNA comprenden una gran familia de RNA de 18-22 nucleótidos de longitud que se han descubierto como reguladores clave de los genes a nivel postranscripcional (81). La utilidad de los miRNAs extracelulares como potenciales biomarcadores está siendo ampliamente estudiada ya que han demostrado ser estables (protegidos de las ribonucleasas) en diferentes fluidos biológicos, además, su expresión es reproducible y presentan una alta especificidad tisular entre individuos (82,83). Los mecanismos por los que los miRNAs están protegidos frente a la actividad ribonucleasa endógena se deben a que los miRNAs están asociados a proteínas tanto libres en los fluidos como protegidos dentro de las VEs (84,85).

La importancia de los miRNAs durante el desarrollo embrionario se debe a que regulan la proliferación y diferenciación celular (81). Además, algunos de estos miRNAs se han asociado con las vesículas extracelulares (VEs), también presentes en el FE (56,79,86). Por lo tanto, el aislamiento de VEs de fluidos biológicos y el análisis de su contenido de miRNAs ha ido cobrando fuerza como procedimiento novedoso para el descubrimiento de biomarcadores no invasivos (87).

## **2. HIPÓTESIS**

Los microRNAs libres y asociados a vesículas extracelulares del fluido endometrial podrían utilizarse como biomarcadores no invasivos del endometrio implantativo.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

Definir, mediante una metodología no invasiva, una firma de microRNAs que permita identificar un endometrio implantativo.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Optimizar la obtención de las muestras de FE y la técnica de aislamiento de VEs basada en la precipitación con polímeros (PBP).**
2. Comparar diferentes métodos y seleccionar una metodología robusta para analizar microRNAs libres y asociados a vesículas extracelulares procedentes del fluido endometrial en entornos clínicos (66,88).
3. Aplicar la metodología seleccionada en un conjunto de muestras (cohorte de descubrimiento) con diferentes resultados de implantación para diseñar un modelo predictivo del endometrio implantativo (66,88).
4. Validar los modelos predictivos en una nueva cohorte independiente (cohorte de validación) de mujeres con diferentes resultados de implantación (66,88).
5. Investigar la asociación de los microRNAs validados con las vesículas extracelulares y su función biológica en el proceso de implantación (66,88).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. MUESTRAS DE FLUIDO ENDOMETRIAL**

#### **4.1.1. Aprobación ética**

La aprobación ética del estudio se obtuvo del Comité de Ética y del Comité de Revisión Institucional del Hospital Universitario de Cruces (CEI E21/63) y todas las participantes dieron su consentimiento por escrito respecto a su participación.

#### **4.1.2. Población de estudio**

La población objeto de estudio estuvo constituida por una cohorte de 162 mujeres que acudieron a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Cruces (País Vasco, España) desde enero de 2018 hasta febrero de 2021 (66,88).

#### **4.1.3. Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión para la cohorte de puesta a punto fueron: i) Edad entre 18 y 37 años. ii) Duración del ciclo entre 27 y 29 días. iii) Ausencia de trastornos ovulatorios, miomas, endometriosis, pólipos, cicatrices uterinas o hidrosalpinx. iv) Ecografía uterina y ovárica normales. v) Hormona antimülleriana > 0,4 ng/ml. vi) Ausencia de antecedentes de infecciones ginecológicas, trastornos inmunitarios o cirugía ginecológica. Los criterios de inclusión para las cohortes de descubrimiento y validación también incluían: vii) FET en día 5 de embriones de buena calidad (tipos A y B de la clasificación ASEBIR, (22)). viii) Transferencia de 1 o 2 embriones procedentes de ovocitos propios (66,88).

#### **4.1.4. Participantes**

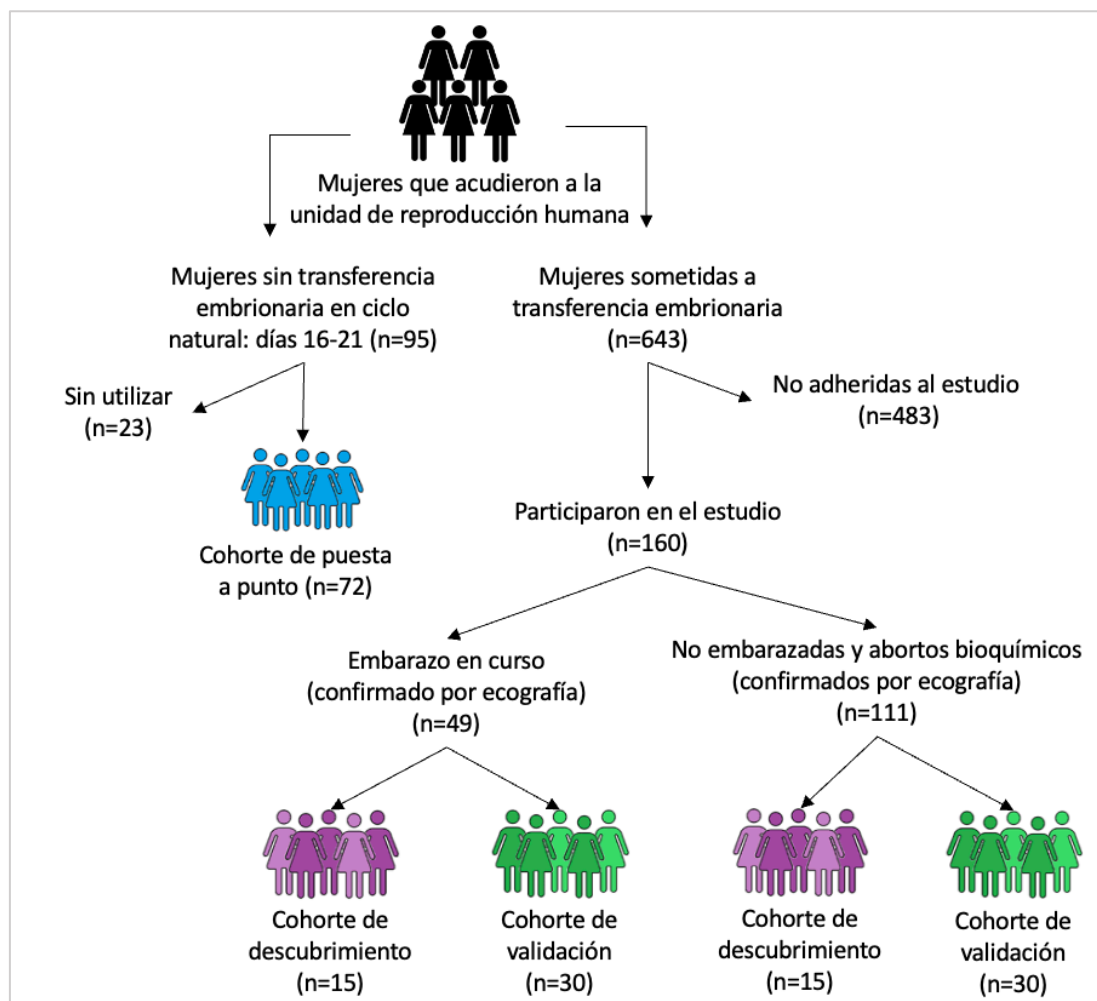
Para generar la cohorte de puesta a punto se recogieron muestras de mujeres que acudieron a la consulta antes de iniciar cualquier tratamiento de fertilidad. Las muestras se obtuvieron durante un ciclo natural, entre 16 y 21 días después del inicio de la menstruación. Para generar las cohortes de descubrimiento y validación el FE se obtuvo de un grupo de mujeres a las que se les realizó una FET en día 5 y la muestra se recogió inmediatamente antes de realizar la TE (66,88).

De todas las mujeres incluidas en el estudio, 72 mujeres formaron la cohorte de puesta a punto, 30 mujeres de la cohorte de descubrimiento y 60 la cohorte de validación (**Figura 5**). De las 90 mujeres que formaron las cohortes de descubrimiento y validación, 45 lograron el embarazo y se incluyeron en el grupo de ciclo implantativo, y 45 no lograron el embarazo y se incluyeron en el grupo de ciclo no implantativo. El embarazo se definió como la visualización mediante ecografía vaginal de un saco gestacional cuatro semanas después de la TE. No se incluyeron en el estudio los casos con una prueba de  $\beta$ -hCG positiva en los que no se observó un saco gestacional en la ecografía vaginal (abortos bioquímicos). Las principales características de la población de mujeres sometidas a TRA se resumen en la **Tabla 1** (66,88).

**Tabla 1.** Principales características de la población estudiada de mujeres en tratamiento con TRA.

	Cohorte de descubrimiento		Cohorte de validación	
	Ciclo implantativo (n=15)	Ciclo no-implantativo (n=15)	Ciclo implantativo (n=30)	Ciclo no-implantativo (n=30)
Edad de la mujer en el momento de la transferencia (años)	36.7 $\pm$ 2.6	36.3 $\pm$ 1.8	36.6 $\pm$ 2.3	36 $\pm$ 3.4
Edad de la mujer en el momento de la criopreservación (años)	35.5 $\pm$ 2.4	35.1 $\pm$ 1.7	35.8 $\pm$ 2.5	35.1 $\pm$ 3.4
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26.2 $\pm$ 4.4	25.3 $\pm$ 1.9	24 $\pm$ 5.2	23.9 $\pm$ 4.7
Fumadoras (%)	26.7	25	25	14.3
Infertilidad primaria (%)	78.6	73.3	53.6	64.3
Fallo de inseminación previo (%)	40	41.6	17.3	25
Factor masculino (%)	37.5	26.7	14.8	39.3
Factor tubárico (%)	6.7	0	28.6	17.9
Estradiol el día de la hCG (pg / ml)	3580.1 $\pm$ 1820.2	4101.4 $\pm$ 1154.6	3807.9 $\pm$ 2560.3	3937.1 $\pm$ 1445.5
Ovocitos obtenidos	13.5 $\pm$ 5.2	15.6 $\pm$ 7.5	14.1 $\pm$ 6.9	13.3 $\pm$ 6.7
Ovocitos en metafase II	11.73 $\pm$ 5.1	13.2 $\pm$ 5.7	12.3 $\pm$ 5.9	11.2 $\pm$ 6.1
Ovocitos fertilizados	7.2 $\pm$ 2.4	7.9 $\pm$ 3.8	8 $\pm$ 4.8	7.5 $\pm$ 4.5
Embriones vitrificados	3 $\pm$ 1.7	3.9 $\pm$ 3.9	4 $\pm$ 3	3.6 $\pm$ 2.5
Embriones transferidos	1.3 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.4
Gemelos (%)	6.7	NA	0	NA

La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student no apareada. No hubo diferencias significativas entre las características clínicas de las mujeres de las cohortes de descubrimiento y validación (ciclo implantativo frente ciclo no-implantativo) o de la cohorte de descubrimiento frente a la de validación. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE a menos que se especifique lo contrario. NA: no aplicable. DE: desviación estándar. El endometrio se consideró implantativo cuando el embarazo se confirmó mediante ecografía vaginal que mostraba un saco gestacional cuatro semanas después de la transferencia embrionaria. Fuente (88).



**Figura 5. Resume el diseño experimental.** Cohorte de puesta a punto (azul): el fluido endometrial (FE) de las mujeres voluntarias se recogió durante la fase secretora de los ciclos naturales, 16-21 días después del inicio de la menstruación. Los sobrenadantes de FE tenían un volumen de entre 400-1300  $\mu\text{L}$  y se hizo un *pool* de FE para realizar los diferentes experimentos. Cohorte de descubrimiento (morado): se recogió FE inmediatamente antes de la FET de 30 mujeres. Quince lograron el embarazo y se incluyeron en el grupo de ciclo implantativo y las otras 15 no lograron el embarazo y se incluyeron en el grupo de ciclo no implantativo. Cohorte de validación (verde): se obtuvieron muestras inmediatamente antes de la FET de 60 mujeres. 30 lograron el embarazo y se incluyeron en el grupo ciclo implantativo y las otras 30 no lograron el embarazo y se incluyeron en el grupo de ciclo no implantativo. FET: Transferencia de embriones congelados. Fuente: Ibáñez-Pérez, J (88).

#### 4.1.5. Recogida, preparación y almacenamiento de las muestras

El FE se aspiró bajo guía ecográfica abdominal con un catéter para la TE (Frydman, Instrumentos Médicos Estériles SA, España) conectado a una jeringa de 10 mL y los volúmenes de aspiración oscilaron entre 5  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$ . El protocolo se optimizó para realizar el análisis de miRNAs y VEs procedentes del FE y los resultados están descritos en la sección 5.1.

#### **4.1.6. Preparación endometrial antes de la transferencia embrionaria**

La preparación endometrial se realizó siguiendo el mismo protocolo. Se realizó una ecografía vaginal el día 1 o el día 2 del ciclo menstrual, para confirmar la quiescencia ovárica (ausencia de folículos > 10 mm). Se inició un ciclo artificial el día 2, administrando 6 mg diarios de estradiol (*Progynova*, Bayer, Barcelona, España). El desarrollo endometrial se controló mediante ecografías vaginales seriadas y, cuando el grosor endometrial alcanzó los 7 mm, se programó el día de la transferencia. A la mañana siguiente se inició la administración de progesterona vaginal a una dosis de 400 mg/12 h (*Utrogestan*, SEID, Barcelona, España) y la TE se realizó al quinto día de la administración de progesterona. En los casos en los que se logró el embarazo las dosis de estradiol y progesterona se mantuvieron hasta la semana 12 de gestación (66,88).

#### **4.2. VITRIFICACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES**

La vitrificación de los embriones se realizó en día 4 o día 5 en un dispositivo Cryotop® (*Kitazato BioPharma Co.*, Shizuoka, Japón). Los embriones se criopreservaron y descongelaron con el kit de Kitazato (*Kitazato BioPharma Co.*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los embriones vitrificados en día 4 se descongelaron y cultivaron 24 horas antes de la TE y los embriones vitrificados en día 5 se descongelaron y cultivaron 2 horas antes de la TE (66,88).

#### **4.3. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Se utilizó un kit comercial llamado *Invitrogen Total Exosome Isolation Reagent* (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*, #4478359), que se un método de precipitación basado en polímeros (PBP). El protocolo se optimizó para poder utilizarlo en el FE y los resultados están descritos en la sección 5.1.



#### 4.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante con dos métodos diferentes; el kit mirVana PARIS™ (*Thermo Fisher Scientific*, # AM1556) y el kit Norgen de purificación de RNA de plasma/suero (*Norgen Biotek Corp.*, # 55000). El RNA se eluyó en agua libre de nucleasas (*Ambion*, # AM9930 de *Thermo Fisher Scientific*) (66,88).

#### 4.5. SÍNTESIS DE cDNA Y ENSAYO TaqMan DE miRNAs

El cDNA se sintetizó siguiendo las recomendaciones del fabricante a partir de 2 µL de RNA utilizando el kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* (*Applied Biosystems*, # A28007, de *Thermo Fisher Scientific*). La amplificación de miRNAs se realizó utilizando el reactivo *TaqMan Fast Advanced Máster Mix* (*Thermo Fisher Scientific*, # 4444557) y las sondas *TaqMan Advance miRNA* (*Thermo Fisher Scientific*, #A 25576). La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) se realizó en un sistema Viia7 o QS6 y los datos se analizaron mediante el *software QuantiStudio Real-Time PCR System* versión 1.3 (*Applied Biosystems*, de *Thermo Fisher Scientific*) (66,88).

Para realizar el análisis de miRNAs del FE se seleccionaron 7 miRNA asociados a VEs y se utilizaron como miRNAs de referencia. Varios estudios han descrito la secreción de estos miRNA por líneas celulares epiteliales endometriales (86), también se han detectado en aspirados de FE (56,89) y hay estudios que han asociado estos miRNAs con VEs durante la implantación (56,79):

1. hsa-let-7-5p (478579\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
2. hsa-miR-17-5p (478447\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
3. hsa-miR-200c-3p (478351\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
4. hsa-miR-30c-5p (478008\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
5. hsa-miR-30d-5p (478606\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
6. hsa-miR-451a (478107\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
7. hsa-miR-92a-3p (477827\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)

Además, se seleccionaron otros dos miRNA a partir del análisis de *Small RNA-seq* realizado con la cohorte de puesta a punto. Estos miRNAs se encontraban entre los miRNA más (hsa-miR-21-5p) y menos (hsa-miR-155-5p) abundantes del *pool* (66,88).

8. hsa-miR-21-5p (477975\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)
9. hsa-miR-155-5p (483064\_mir, *Thermo Fisher Scientific*)

Por otro lado, se utilizaron dos miRNA exógenos como controles internos de las técnicas utilizadas. Para determinar la eficacia de la extracción de RNA se utilizó el cel-miR-39 (478293\_mir, *Thermo Fisher Scientific*) que se añadió (4  $\mu$ L a 0,1 nM) a las muestras de FE antes de cada procedimiento de extracción de RNA. Para controlar el proceso de la síntesis de cDNA se utilizó el ath-miR-159a (478411\_mir, *Thermo Fisher Scientific*) y se añadió (0,2  $\mu$ L a 0,001 nM) al principio de cada reacción de síntesis de cDNA. Este último miRNA se utilizó para calcular la cantidad relativa de los miRNA analizados en los diferentes experimentos (66,88).

#### **4.6. ENSAYO DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR)**

Los resultados de la qPCR se mostraron como valores de umbral de ciclo (Ct) o como valores de expresión relativa ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Para calcular los niveles de expresión relativa de los miRNAs de referencia los datos Ct se normalizaron con respecto a los valores Ct del ath-miR-159 mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$  (Ct miRNA - Ct ath-miR-159a). Los niveles de expresión relativa de los nuevos miRNAs descubiertos se normalizaron con respecto a los controles internos mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$  (Ct miRNA - media Ct de los controles internos). Posteriormente, se calcularon los *fold change* mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (90). Los controles endógenos se seleccionaron a partir de los miRNAs de referencia utilizando el *software NormFinder* (91). El punto de corte para los controles internos se estableció en Ct < 30 mediante el análisis de qPCR (66,88).

#### **4.7. SECUENCIACIÓN DE RNA PEQUEÑOS *Small RNA-seq***

La cantidad y la calidad del RNA se evaluaron con *Agilent RNA 6000 Pico Chips* (*Agilent Technologies*, Cat. nº 5067-1513, CA, EE.UU.). Las bibliotecas de secuenciación se prepararon siguiendo el protocolo incluido en el kit *NEXTflex™ small RNA-Seq Kit v3*, (*Bioo Scientific Corp.* Cat. # 5132-06, protocolo V19.01, Austin, TX, USA) (66,88).

#### **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se utilizó el *software GraphPad Prism v.8.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EE. UU.). La significación estadística de los experimentos realizados con la cohorte de puesta a punto se determinó mediante la prueba t de *Student* apareada, y en los experimentos realizados con las cohortes de descubrimiento y validación se utilizó la prueba t de *Student* no apareada con corrección de *Welch*. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . El tamaño de la muestra y los valores p se citan en las figuras y en los pies de figura (66,88).

#### **4.9. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS miRNAs**

Los genes diana de los miRNAs validados se obtuvieron de la base de datos *TarBase v7.0*. Los procesos biológicos en los que están implicados estos miRNAs se analizaron a través de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) y la Ontología de Genes (GO). Se seleccionaron sólo aquellas vías y procesos con valores  $p < 0,05$ . Los resultados para KEGG se fusionaron mediante "unión de vías" y los resultados para GO mediante "unión de categorías" (66,88).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE FE Y LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE VEs BASADA EN LA TÉCNICA PBP

Antes de empezar con los experimentos para identificar una firma de miRNAs que permitiera identificar un endometrio receptivo fue necesario optimizar tanto la obtención y procesamiento de las muestras de FE como la técnica de aislamiento de VEs basada en la precipitación con polímeros (PBP).

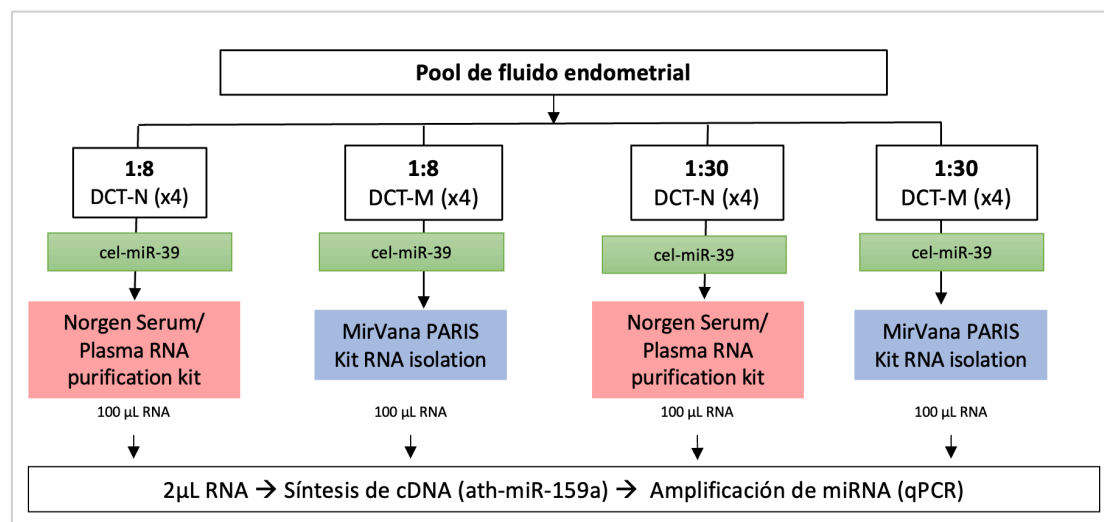
#### 5.1.1. Optimización de la obtención y el procesamiento de las muestras de FE

La obtención del FE se realiza mediante aspiración y el volumen que se obtiene comprende entre 5 y 50  $\mu\text{L}$  dependiendo las pacientes y la persona que realiza la aspiración. Se trata de un fluido muy viscoso de difícil manipulación y para poder analizar las VEs y los miRNAs procedentes del endometrio es necesario separarlos de los residuos celulares y otras macromoléculas presentes en el FE mediante centrifugación. Sin embargo, dada la viscosidad del FE, en la práctica clínica no es posible obtener un sobrenadante o fracción líquida analizable si la muestra no es diluida previamente, por lo que se decidió diluir las muestras utilizando una solución salina tamponada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés).

En el laboratorio, con el fin de determinar el volumen de PBS necesario para diluir las muestras, se decidió realizar un *pool* de FE con las muestras procedentes de la cohorte de puesta a punto. Resultó muy difícil manipular las muestras de FE y del *pool* que se generó, la cantidad mínima con la que se podía trabajar fue de 50  $\mu\text{L}$ . Se realizaron diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:3...) y se determinó que la dilución 1:8 (50  $\mu\text{L}$  de FE y 400  $\mu\text{L}$  PBS) era la dilución mínima a la cual se podía centrifugar la muestra y obtener un sobrenadante analizable. Se trató de implementar esta dilución en muestras independientes con la intención de separar el sobrenadante que contiene las VEs y los miRNAs antes de congelar las muestras para su posterior análisis. En la práctica clínica se utilizaron 400  $\mu\text{L}$  de PBS para lavar el catéter con el que se había obtenido la muestra, sin embargo, no fue posible extraer todo el FE del catéter con tan poca cantidad de PBS.

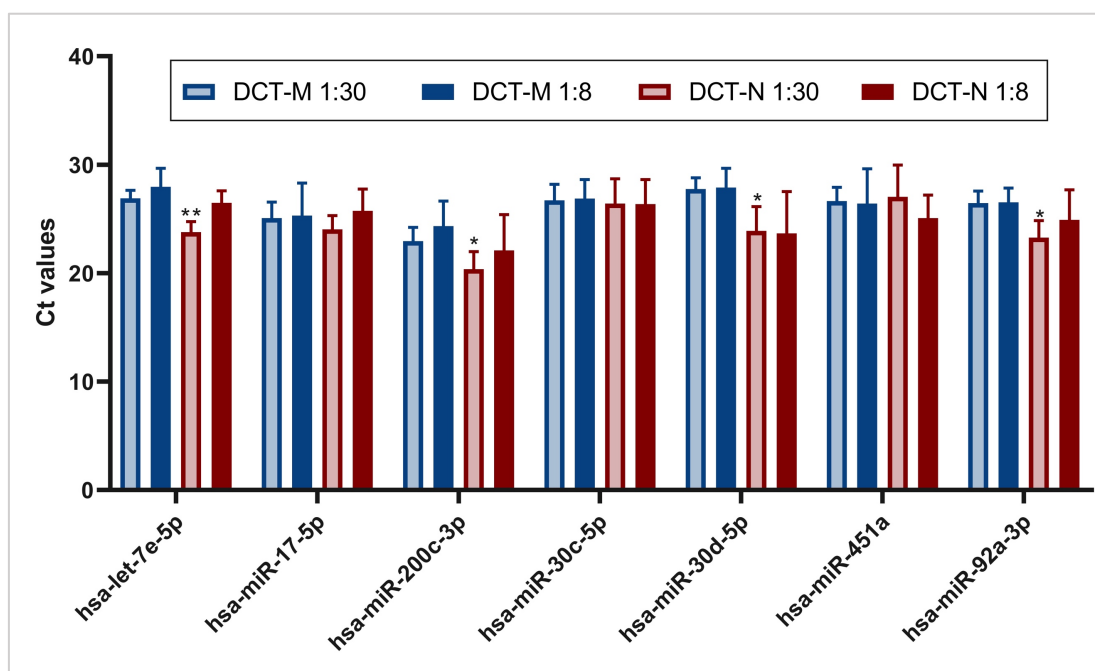
En la práctica clínica el volumen de PBS necesario para lavar el catéter y obtener toda la muestra de FE que se aspira fue de 1500  $\mu\text{L}$ , lo que equivalía a una dilución aproximada de 1:30. Por lo tanto, en vista de la imposibilidad de aplicar los resultados del laboratorio en la práctica clínica se realizó un experimento para comparar las dos condiciones (dilución 1:8 y dilución 1:30). El experimento se llevó a cabo comparando la detección de los 7 miRNAs de referencia (Materiales y métodos sección 4.5.) mediante qPCR, en las dos condiciones con dos métodos de extracción de RNA diferentes (**Figura 6**).

Como se puede observar en la **Figura 6**, se utilizó un *pool* de muestras de FE procedente de la cohorte de puesta a punto. Unas alícuotas se diluyeron a 1:8 (50  $\mu\text{L}$  FE + 400  $\mu\text{L}$  de PBS) y otras alícuotas se diluyeron a 1:30 (50  $\mu\text{L}$  FE + 1500  $\mu\text{L}$  de PBS) simulando las condiciones que se dan en la práctica clínica. Las muestras se centrifugaron a 2500 xg y se utilizaron 400  $\mu\text{L}$  de muestra para realizar cada una de las condiciones comparadas.



**Figura 6. Esquema del experimento de optimización de la obtención y el procesamiento de las muestras de FE.** Se compararon cuatro condiciones diferentes con dos métodos de extracción de RNA diferentes (DCT-N y DCT-M). Las muestras de FE procedían de un *pool* generado con muestras de la cohorte de puesta a punto. Cada experimento se realizó x4 utilizando alícuotas de 400  $\mu\text{L}$ . **DCT-N**: extracción directa de RNA con el kit de purificación de RNA de plasma/suero de Norgen. **DCT-M**: extracción directa de RNA con el kit mirVana PARIS. **FE**: fluido endometrial. **qPCR**: PCR cuantitativa a tiempo real.

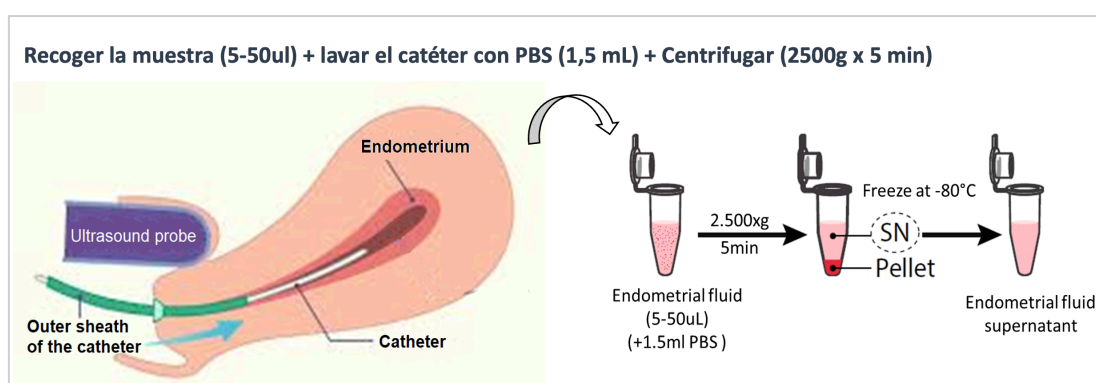
Los resultados del experimento de optimización de la obtención y el procesamiento de las muestras de FE se muestran en la **Figura 7**. En azul claro se muestran los resultados para DCT-M 1:30, en azul oscuro los resultados para DCT-M 1:8, en color rojo claro los resultados para DCT-N 1:30 y en rojo oscuro los resultados de DCT-N 1:8. Los siete miRNAs de referencia fueron detectados en las cuatro condiciones comparadas y únicamente se detectaron diferencias significativas entre los resultados de DCT-M 1:30 frente a DCT-N 1:30 para los miRNAs hsa-let-7e-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-30d-5p y hsa-miR-92a-3p. No hubo diferencias significativas entre las dos concentraciones analizadas para cada una de las técnicas de extracción de RNA.



**Figura 7. Resultados de la optimización de la obtención y el procesamiento de las muestras de FE.** Se compararon cuatro condiciones diferentes con dos métodos de extracción de RNA (DCT-N y DCT-M) y dos diluciones diferentes (1:8 y 1:30). En la figura se muestran los valores Ct que se obtuvieron para los siete miRNAs de referencia analizados mediante PCR cuantitativa en cada una de las condiciones analizadas. Las muestras de FE procedían de un *pool* generado con muestras de la cohorte de puesta a punto. Cada experimento se realizó utilizando alícuotas de muestra de 400  $\mu$ L. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student apareada. El número de réplicas por caso fue de 4 y los datos muestran la media con DS. \* DCT-M 1:30 vs. DCT-N 1:30. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . **DCT-N**: extracción directa de RNA con el kit de purificación de RNA de plasma/suero de Norgen. **DCT-M**: extracción directa de RNA con el kit mirVana PARIS. **FE**: fluido endometrial. **Ct**: umbral de ciclo. **DS**: desviación estándar.

Dado que no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos al diluir las muestras a 1:8 o a 1:30, se decidió utilizar 1500  $\mu\text{L}$  de PBS para lavar el catéter y diluir las muestras de FE en el momento de obtención de la muestra. Finalmente, se estableció el siguiente protocolo para el procesamiento de las muestras (**Figura 8**):

- 1) Aspirar el FE y extraer la muestra lavando el catéter con 1500  $\mu\text{L}$  de PBS.
- 2) Centrifugar las muestras a 2500xg durante 5 minutos.
- 3) Recoger el sobrenadante y guardarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.



**Figura 8. Esquema del protocolo que se implantó para la obtención y el procesamiento de las muestras de FE.** El FE se aspiró bajo guía ecográfica abdominal con un catéter para la TE (Frydman, Instrumentos Médicos Estériles SA, España) conectado a una jeringa de 10 mL y los volúmenes de aspiración oscilaron entre 5  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$ . Tras la aspiración se sustituyó la jeringa de 10 mL por otra de 2 mL que contenía 1,5 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés) para lavar el catéter y extraer la muestra de FE a un tubo criogénico. Las muestras se centrifugaron para eliminar contaminantes a 2500xg durante 5 min y los sobrenadantes se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La dilución de los sobrenadantes fue de 1:30, con un volumen comprendido entre 400  $\mu\text{L}$  y 1300  $\mu\text{L}$ . Todas las muestras de las cohortes de puesta a punto, descubrimiento y validación se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito. Fuente: Ibáñez-Pérez J.,(88).

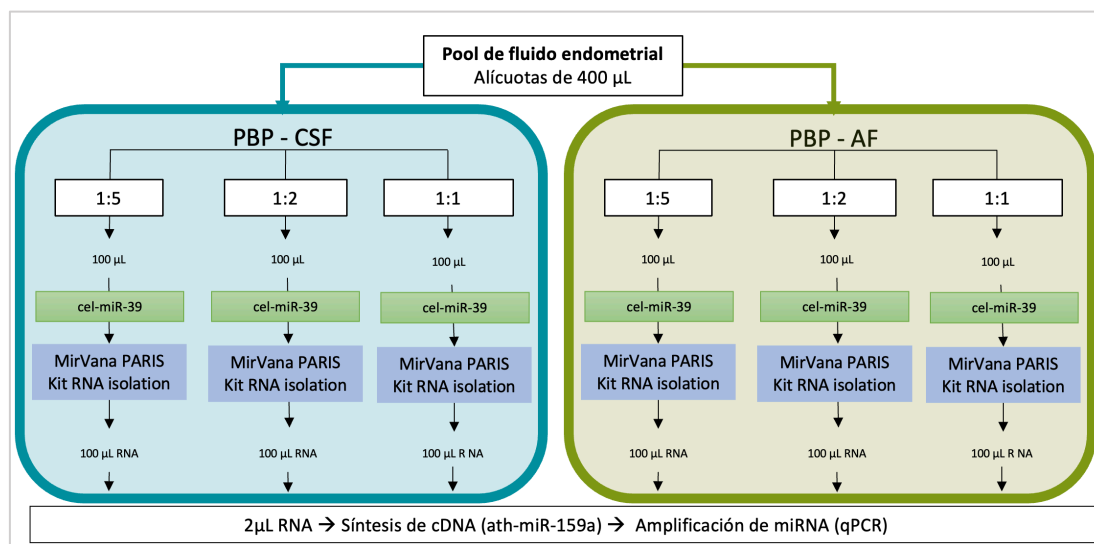
### 5.1.2. Optimización de la técnica de aislamiento de VEs basada en la precipitación con polímeros (PBP)

Para analizar los miRNAs asociados a VEs presentes en el FE se decidió utilizar un kit comercial llamado *Invitrogen Total Exosome Isolation Reagent* y de esta manera enriquecer las muestras en VEs mediante una precipitación basada en polímeros (PBP). Hasta el momento no se había descrito ningún protocolo para utilizar el PBP en muestras de FE por lo que antes de aplicarlo se tuvo que optimizar el protocolo.

Siguiendo las directrices de uso del kit comercial se compararon dos protocolos existentes, el protocolo descrito para el líquido amniótico (PBP-AF) y el protocolo descrito para el líquido cefalorraquídeo (PBP-CFS). Se decidió probar el protocolo de PBP-CFS porque en el laboratorio ya se había utilizado este protocolo en líquido cefalorraquídeo previamente con buenos resultados (92).

La cantidad de reactivo recomendada para cada tipo de fluido era diferente, 0,2 volúmenes en el protocolo PBP-AF y 1 volumen para el protocolo PBP-CSF. Por lo que se compararon los dos protocolos con tres cantidades diferentes de reactivo: (i) 1 volumen (1:1) que equivale a la misma cantidad de reactivo y de FE. (ii) 0,5 volúmenes (1:2) que equivale a la mitad de reactivo en comparación con el FE. (iii) 0,2 volúmenes (1:5) que equivale a un quinto de reactivo en comparación con el FE.

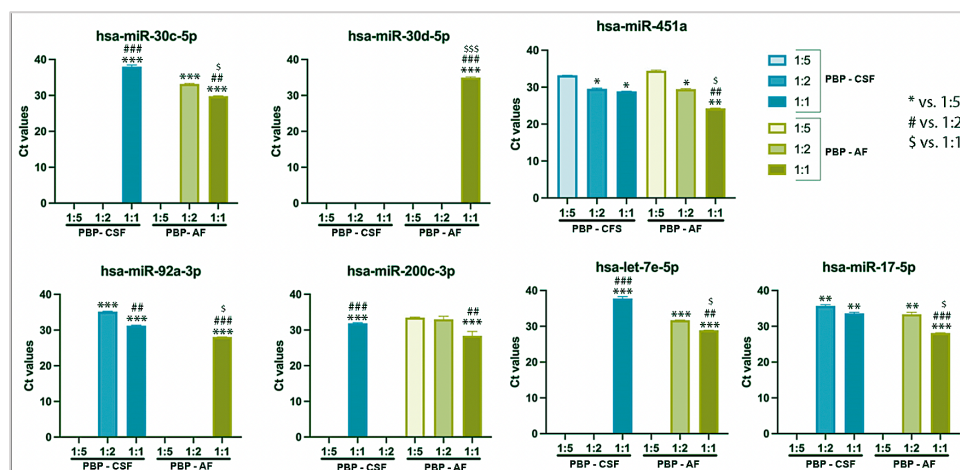
En todos los casos se comenzó el experimento con 400  $\mu\text{L}$  de FE y se añadió el volumen de reactivo correspondiente en cada caso (400  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 80  $\mu\text{L}$ ). El experimento se llevó a cabo comparando la detección de los 7 miRNAs de referencia (Materiales y métodos sección 4.5.) mediante qPCR (**Figura 9**).



**Figura 9. Esquema del experimento de optimización de la técnica de aislamiento de VEs basada en la precipitación con polímeros (PBP).** Se compararon tres condiciones diferentes con dos protocolos de enriquecimiento de VEs (PBP-CSF y PBP-AF). Las muestras de FE procedían de un *pool* generado con muestras de la cohorte de puesta a punto. Cada experimento se realizó x3 utilizando alícuotas de 400  $\mu\text{L}$ . La extracción de RNA se realizó con el kit mirVana PARIS. **PBP-CSF**: protocolo de enriquecimiento de VEs optimizado para para el líquido cefalorraquídeo. **PBP-AF**: protocolo de enriquecimiento de VEs optimizado para para el líquido amniótico. **FE**: fluido endometrial. **qPCR**: PCR cuantitativa a tiempo real. **VEs**: vesículas extracelulares. **PBP**: precipitación basada en polímeros.



En la **Figura 10** se pueden observar los resultados obtenidos de la comparación. En azul los resultados obtenidos para el protocolo PBP-CSF y en verde los resultados para el protocolo PBP-AF. Cuando se utilizaron 0,2 volúmenes (1:5) de reactivo solo fue posible detectar dos miRNAs, el hsa-miR-451a con los dos protocolos y el hsa-miR-200c-3p con el protocolo PBP-AF. Los resultados obtenidos con 0,5 volúmenes (1:2) de reactivo difieren entre los dos protocolos dado que con la técnica PBP-CFS solo fue posible detectar 3 miRNAs (hsa-miR-451a, hsa-miR-17-5p y hsa-miR-92a-3p) mientras que con el protocolo PBP-AF fue posible detectar 5 miRNAs (hsa-miR-451a, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-30c-5p y hsa-miR-200c-3p). Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó 1 volumen (1:1) de reactivo, con el protocolo PBP-AF fue posible detectar los 7 miRNAs analizados mientras que con el protocolo PBP-CFS se detectaron todos menos el hsa-miR-30d-5p. Además, los resultados mostraron diferencias significativas en la detección de 5 miRNAs cuando se compararon los resultados para 1 volumen de reactivo entre los protocolos PBP-CSF y PBP-AF. Concretamente, hubo un aumento significativo en los niveles de detección de los miRNAs hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-92a-3p, hsa-let-7e-5p y hsa-miR-17-5p con el protocolo de PBP-AF en comparación con el protocolo PBP-CSF.



**Figura 10. Resultados de la optimización de la técnica de asilamiento de VEs basada en la precipitación con polímeros (PBP).** Los gráficos muestran los valores Ct de los miRNAs de referencia evaluados mediante qPCR. El número de réplicas para cada condición fue de dos y los datos muestran la media con DS. Cada alícuota (400  $\mu$ L) procedía de un *pool* generado con la cohorte de puesta a punto. El Ct está inversamente correlacionado con la cantidad de miRNA en las muestras. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student apareada. \*, #, \$  $p < 0,05$ ; \*\*, ##, \$\$  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###, \$\$\$  $p < 0,001$ . **PBP-CSF**: protocolo de precipitación basada en polímeros para el líquido cefalorraquídeo. **PBP-AF**: protocolo de precipitación basada en polímeros para el líquido amniótico. **Ct**: umbral de ciclo. **PBP**: precipitación basada en polímeros. **DS**: desviación estándar.

En base a los resultados obtenidos se decidió utilizar el protocolo PBP-AF pero modificando la cantidad de 0,2 volúmenes de reactivo por la cantidad de 1 volumen de reactivo (1:1) descrita para el líquido cefalorraquídeo en el protocolo PBP-CSF. De esta manera se diseñó un nuevo protocolo para utilizar el kit comercial *Invitrogen Total Exosome Isolation Reagent* en el FE:

- 1) Centrifugar los sobrenadantes de FE a 3.000xg durante 30 minutos a 4°C.
- 2) Transferir los sobrenadantes a otro tubo y añadir 1 volumen de reactivo (1:1)
- 3) Mezclar con un vórtex hasta obtener una solución homogénea e incubar la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Tras la incubación, centrifugar las muestras a 10.000xg durante 1 hora a 4°C.
- 5) Aspirar el sobrenadante con una pipeta y desecharlo. Las VEs están contenidas en el pellet, que puede no ser visible, en el fondo del tubo.
- 6) Añadir 100 µL de PBS para resuspender el pellet. El volumen de resuspensión puede modificarse según las necesidades de cada caso.

El protocolo establecido para la obtención de las muestras de FE se aplicó en la recogida de todas las muestras del estudio y el protocolo para el aislamiento de VEs del FE con el método PBP también se aplicó en todos los experimentos en los que se utilizó el método PBP.

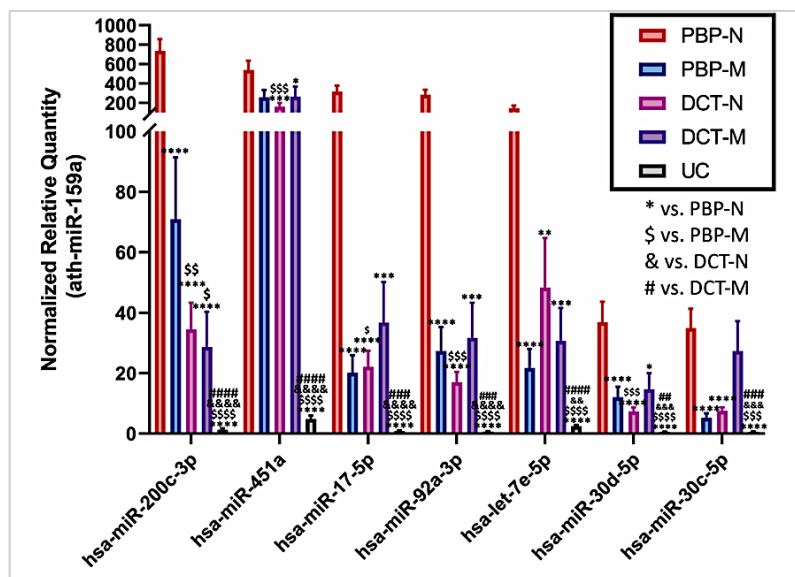
## **5.2. COMPARACIÓN DE DIFERENTES METÉTODOS Y SELECCIÓN DE UNA METODOLOGÍA ROBUSTA PARA ANALIZAR microRNAs LIBRES Y ASOCIADOS A VEs PROCEDENTES DEL FE EN ENTORNOS CLÍNICOS**

En este experimento se compararon cinco metodologías diferentes para analizar los miRNAs procedentes del FE, dos de ellas consistían en una extracción directa de RNA (DCT-M y DCT-N) mientras que las otras tres tenían un enriquecimiento en VEs antes de la extracción de RNA (PBP-M, PBP-N y UC-M). Los resultados de la extracción de RNA se compararon primero mediante qPCR utilizando los 7 miRNAs de referencia (Materiales y métodos sección 4.5.) mediante qPCR y los métodos más eficaces se analizaron posteriormente mediante *Small RNA-seq*. Además, se realizó un experimento de reproducibilidad técnica para establecer la técnica más robusta (66,88).

### 5.2.1. Resultados de la comparación de las diferentes metodologías y el análisis mediante *Small RNA-seq*

Los resultados de la comparación de las cinco metodologías mediante qPCR mostraron que era posible detectar los 7 miRNAs de referencia en todas las réplicas de DCT-M, DCT-N, PBP-M, PBP-N y UC-M. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los niveles de miRNAs detectados, siendo los métodos con un paso previo de enriquecimiento de VEs con PBP los métodos más eficientes, PBP-N y PBP-M (**Figura 11**) (66,88).

El RNA extraído con los métodos más eficientes (PBP-N y PBP-M) se analizó mediante *Small RNA-seq* y los resultados de la secuenciación detectaron 151 y 251 miRNAs únicos para los métodos PBP-N y PBP-M, respectivamente; de ellos, 145 miRNAs fueron comunes entre ambas metodologías (66,88).



**Figura 11. Optimización de diferentes metodologías para el análisis de miRNAs del FE procedente de la cohorte de puesta a punto.** Resultados para los siete miRNAs de referencia analizados mediante qPCR para cada una de las técnicas comparadas. La cuantificación relativa normalizada reveló que el método más eficiente era el PBP-N. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de *Student* apareada. El número de réplicas por cada método fue de 12 y los datos muestran la media con la DS. \* vs. PBP-N; \$ vs. PBP-M; & vs. DCT-N; # vs. DCT-M. \*, \$, &, # p<0,05; \*\*, \$\$, &&, ## p<0,01; \*\*\*, \$\$\$, &&&, ### p<0,001; \*\*\*\*, \$\$\$\$ &&&&, #### p<0,0001. **DCT-N:** extracción directa de RNA con el kit de purificación de RNA de plasma/suero de Norgen. **DCT-M:** extracción directa de RNA con el kit mirVana PARIS. **PBP-N:** enriquecimiento de VE con el método PBP y extracción de RNA con el kit de purificación de RNA Norgen Plasma/Suero. **PBP-M:** Enriquecimiento de VE con el método PBP y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS. **UC-M:** Enriquecimiento de VEs mediante ultracentrifugación y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS. **miRNAs:** microRNAs. **PBP:** precipitación basada en polímeros. **VE:** vesículas extracelulares. **FE:** fluido endometrial. **DS:** desviación estándar. Fuente: Ibañez-Perez *et al.*, (66).

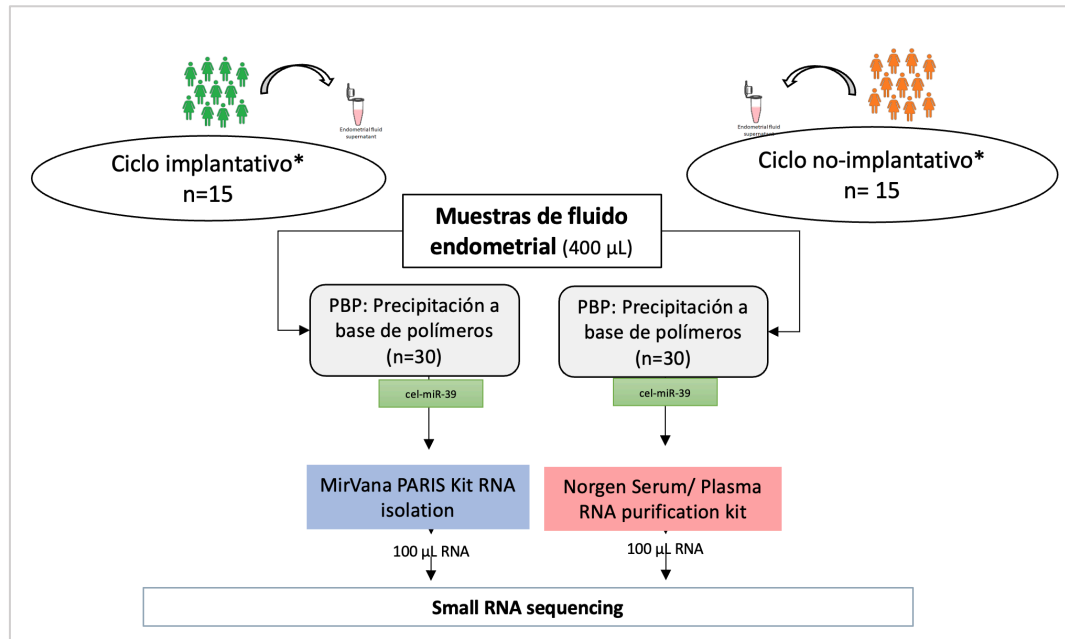
### 5.2.2. Resultados del experimento de reproducibilidad técnica

Dada la importancia de seleccionar una metodología robusta, dos operadores (JIP y MCG) llevaron a cabo un experimento de reproducibilidad técnica. Cada uno analizó 20 muestras procedentes del mismo *pool* formado con muestras de la cohorte de puesta a punto, 10 utilizando el método PBP-N y 10 con el método PBP-M. En este caso, se utilizó la qPCR para comparar la reproducibilidad técnica y además de los siete miRNAs de referencia también se analizaron dos miRNAs procedentes de los resultados de la de Small RNAseq: el hsa-miR-21-5p y el hsa-miR-155-5p (Materiales y métodos sección 4.5.). Los resultados mostraron diferencias significativas entre las técnicas, siendo la PBP-N más robusta ya que los resultados mostraron menos variabilidad intra-operario y entre-operarios y, además, el método PBP-N fue capaz de detectar mayores niveles de miRNAs en comparación con la metodología PBP-M (66,88).

### 5.3. APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS SELECCIONADAS EN UN CONJUNTO DE MUESTRAS (COHORTE DE DESCUBRIMIENTO) CON DIFERENTES RESULTADOS DE IMPLANTACIÓN PARA DISEÑAR UN MODELO PREDICTIVO DEL ENDOMETRIO IMPLANTATIVO

Para poder llevar a cabo el objetivo de diseñar un modelo predictivo del endometrio implantativo se utilizaron las muestras de FE procedentes de la cohorte de descubrimiento. Las muestras de FE se recogieron justo antes de realizar la FET en día 5 de embriones de buena calidad (A o B según criterios de ASEBIR, (22)). Esta cohorte estaba formada por dos grupos de mujeres con diferentes resultados de implantación, 15 muestras procedentes del grupo ciclo implantativo y 15 muestras procedentes del grupo ciclo no implantativo.

Para definir el modelo predictivo, primero se extrajo el RNA de las muestras con los métodos más eficientes (PBP-M y PBP-N) y se analizó mediante *small RNA-seq*. A continuación, se realizó un análisis de abundancia diferencial para identificar los miRNAs asociados con la implantación y finalmente se confirmaron los resultados mediante qPCR en esas mismas muestras (**Figura 12**) (66,88).



**Figura 12. Esquema de trabajo del experimento para diseñar un modelo predictivo del endometrio implantativo.** Se seleccionaron 30 muestras, 15 muestras procedentes de mujeres en las que la implantación fue exitosa y 15 en las que no lo fue. Para definir el modelo predictivo, primero se extrajo el RNA de las muestras con las técnicas PBP-M y PBP-N y se analizó mediante *Small RNA-seq*. **PBP-N:** enriquecimiento de VE con el método PBP y extracción de RNA con el kit de purificación de RNA Norgen Plasma/Suero. **PBP-M:** Enriquecimiento de VE con el método PBP y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS. Fuente: Ibáñez-Pérez J (88).

### 5.3.1. Resultados del análisis del RNA mediante *Small RNA-seq*

Para realizar el experimento se utilizaron 800 µL de FE de cada paciente, 400 µL se analizaron con el método PBP-M y los otros 400 µL con el método PBP-N, el RNA de las 60 muestras (30 PBP-M + 30 PBP-N) se analizó mediante *Small RNA-seq*. Tras la secuenciación, se realizó un control de calidad que mostró una gran variabilidad no sólo entre muestras, sino también entre los resultados de cada método para la misma muestra. Al comparar los resultados obtenidos entre ambas técnicas, se observó que las dos muestras con mayor porcentaje de alineamiento con el genoma humano coincidían (EF\_06 y EF\_26). Estas muestras obtuvieron un mayor porcentaje de alineamiento con el genoma humano cuando se utilizó el método PBP-M, sin embargo, el número de miRNAs detectados fue mayor cuando se utilizó el método PBP-N. Las muestras con menor porcentaje de alineamiento con el genoma humano también fueron similares en ambas técnicas. Cabe destacar que la muestra EF\_29 en el caso de PBP-M obtuvo resultados muy pobres (1,5 % de alineación y 1 miRNA detectado),

mientras que con el método PBP-N los resultados fueron mucho mejores (47,1 % de alineamiento y 290 miRNAs detectados). Estos resultados sugirieron que la muestra EF\_29 no se extrajo correctamente con la técnica PBP-M. Algo que ya se había detectado en experimentos anteriores, ya que la técnica PBP-M demostró ser menos reproducible al ser más compleja de realizar (Resultados sección 5.2.2.) (66,88).

### 5.3.2. Resultados del análisis de abundancia diferencial de miRNAs

A continuación, se realizó un análisis de abundancia diferencial para identificar los miRNAs expresados diferencialmente entre el grupo de ciclo implantativo y el grupo ciclo no implantativo. Los resultados para el método PBP-M mostraron 34 miRNAs diferencialmente expresados (p-valor ajustado  $<0,05$ ), mientras que los resultados el método PBP-N mostraron 11 miRNAs diferencialmente expresados (p-valor ajustado  $<0,05$ ). De estos miRNAs se seleccionaron aquellos que seguían el mismo patrón (*up-regulated* o *down-regulated*) en los resultados de *Small RNA-seq* y en los resultados del análisis de abundancia diferencial. De este modo, se identificaron 16 miRNAs para su posterior validación mediante qPCR en las mismas muestras (13 miRNAs con PBP-M y 5 miRNAs con PBP-N) (algunos eran repetidos entre las dos técnicas) (66,88).

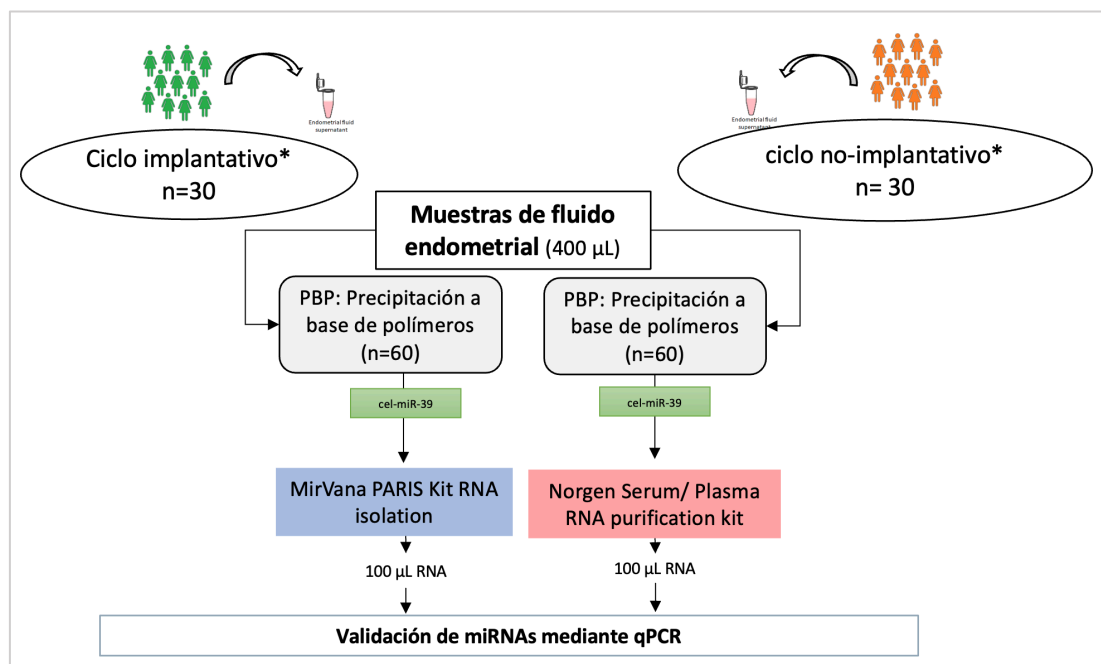
### 5.3.3. Resultados del modelo predictivo de endometrio implantativo por qPCR

Los modelos predictivos se diseñaron realizando un estudio de regresión mediante corrección *bootstrapping* con los datos normalizados de la amplificación qPCR de los 16 miRNAs expresados diferencialmente en la cohorte de descubrimiento. A partir de estos análisis, se definieron dos modelos; el modelo diseñado con PBP-M se denominó "Modelo 1", y al realizado con PBP-N, "Modelo 2". Los dos modelos fueron significativamente predictivos a la hora de detectar un endometrio implantativo y se basaron en tres miRNAs (66,88).

- Modelo 1 (AUC = 0,93; p-valor =  $3,3 \times 10^{-3}$ )
  - hsa-miR-24-3p
  - hsa-miR-200b-3p
  - hsa-miR-148b-3p
- Modelo 2 (AUC = 0,92; p-valor =  $2,3 \times 10^{-4}$ ):
  - hsa-miR-24-3p
  - hsa-miR-200b-3p
  - hsa-miR-99b-5p

#### 5.4. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS PREDICTIVOS EN UNA NUEVA COHORTE INDEPENDIENTE (COHORTE DE VALIDACIÓN) DE MUJERES CON DIFERENTES RESULTADOS DE IMPLANTACIÓN

El rendimiento de los dos modelos predictivos (Modelo 1 y Modelo 2) se validó en una cohorte independiente denominada cohorte de validación. Como se ha descrito anteriormente, las muestras de FE se recogieron justo antes de realizar una FET en día 5. Se analizaron 60 muestras de FE, 30 muestras procedentes de mujeres en las que la transferencia fue exitosa (ciclo implantativo) y 30 mujeres en las que la implantación no fue exitosa (ciclo no implantativo). En este experimento, el RNA extraído se utilizó para validar los modelos mediante qPCR (**Figura 13**) (66,88).



**Figura 13. Esquema de trabajo del experimento para validar los modelos predictivos en la cohorte de validación.** Se seleccionaron 60 muestras, 30 muestras procedentes del grupo ciclo implantativo (mujeres en las que la implantación fue exitosa) y 30 muestras procedentes del grupo ciclo no implantativo (mujeres en las que la implantación no fue exitosa). Para validar los modelos, se extrajo el RNA con las técnicas PBP-M y PBP-N y se analizó mediante qPCR. **PBP-N:** enriquecimiento de VE con el método PBP y extracción de RNA con el kit de purificación de RNA Norgen Plasma/Suero. **PBP-M:** Enriquecimiento de VE con el método PBP y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS. Fuente: Ibáñez-Pérez J., (88).

#### 5.4.1. Resultados de validación del modelo 1 (PBP-M)

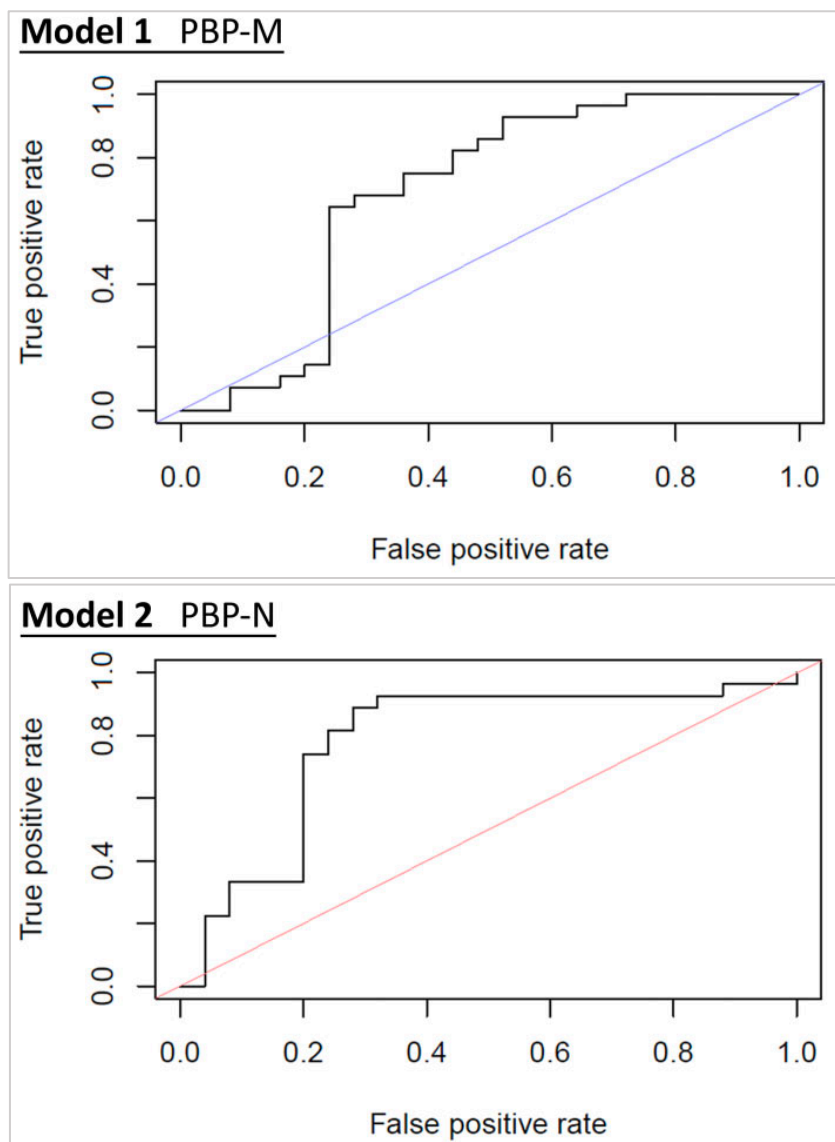
El modelo 1 (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-148b-3p) mostró una precisión de 0,68 (IC 95% [0,54-0,8]) y un AUC de 0,69 (IC 95% [0,55-0,86]). La prueba mostró una diferencia estadísticamente significativa (valor p: 0,019). Además, el análisis de la curva ROC identificó el hsa-miR-148b-3p como la variable con mayor probabilidad de detectar un endometrio implantativo (**Figura 14**) (66,88). Se observó que la expresión del hsa-miR-148b-3p estaba significativamente disminuida (p-valor 0,02) en el grupo ciclo implantativo en comparación con el grupo de ciclo no implantativo. En base a la estadística “J de Youden” se estableció el punto de corte en 2,34 dCt ( $dCt = Ct_{\text{hsa-miR-148b-3p}} - Ct_{\text{controles internos}}$ ) con una sensibilidad de 0,56 y una especificidad de 0,86. Los valores por encima del punto de corte indicarían un endometrio implantativo ( $dCt > 2,34$ ) (valor predictivo negativo = 0,69) (66,88).

#### 5.4.2. Resultados de la validación del modelo 2 (PBP-N)

El modelo 2 (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-99b-5p) mostró una precisión del 0,77 (IC 95% [0,63-0,88]) y un AUC de 0,78 (IC 95% [0,6-0,89]). La prueba también mostró una diferencia estadísticamente significativa (valor p: 0,0002). Además, el análisis ROC identificó el hsa-miR-99b-5p como la variable mayor probabilidad de detectar un endometrio implantativo demostrando una expresión diferencial significativa ( $\geq 1,5$  *fold change*) entre los grupos con un valor p  $< 0,05$  (**Figura 14**) (66,88). La expresión del miRNA hsa-miR-99b-5p estaba regulado al alza en el grupo de ciclo implantativo y se estableció el punto de corte en 2,81 dCt ( $dCt = Ct_{\text{hsa-miR-99b-5p}} - Ct_{\text{controles internos}}$ ) en base al estadístico “J de Youden” con 0,6 de sensibilidad y 0,93 de especificidad. Los valores por debajo del punto de corte indicarían un endometrio implantativo ( $dCt < 2,81$ ) (valor predictivo negativo = 0,71) (66,88).

Los resultados mostraron que los dos modelos validados seguían siendo predictivos a la hora de detectar el endometrio implantativo, especialmente el modelo 2.

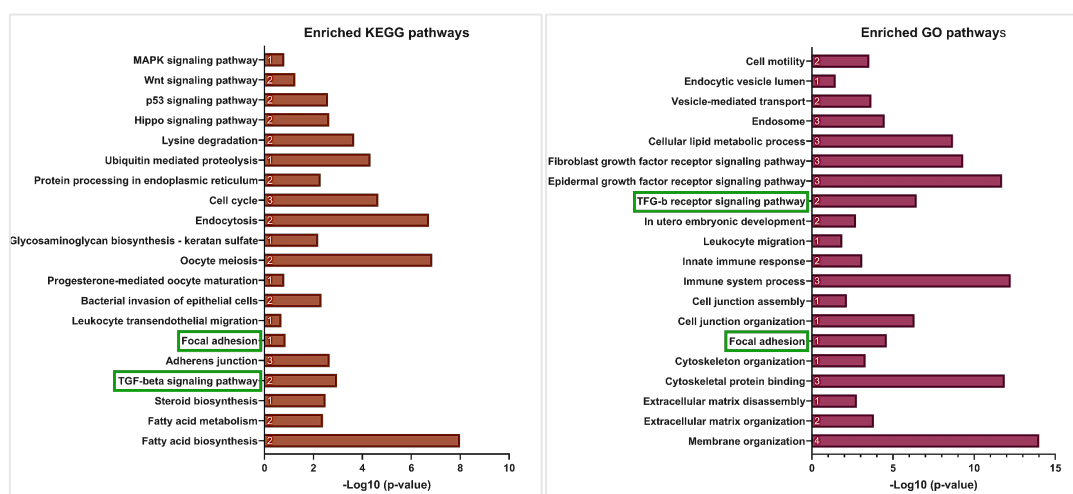




**Figura 14. Curvas ROC de los modelos.** En la figura se muestran los resultados de los modelos predictivos diseñados, a partir de los resultados de la qPCR obtenidos con los métodos PBP-M y PBP-N, en la cohorte de validación ( $n = 60$ ; 30 muestras del grupo implantación y 30 del grupo no implantación). El endometrio se consideró implantativo cuando el embarazo se confirmó mediante ecografía vaginal que mostraba un saco gestacional 4 semanas después de la TE. Los análisis se realizaron con aquellas muestras que superaron el control de calidad; amplificación de los miRNAs de referencia (hsa-miR-200c-3p y hsa-miR-92a-3p) inferior a 30 Cts. Para PBP-M fueron:  $n=28$  en el grupo ciclo implantativo y  $n=25$  en el grupo de ciclo no implantativo. Para PBP-N fueron:  $n=27$  en el grupo de ciclo implantativo y  $n=25$  en el grupo de ciclo no implantativo. Las curvas ROC muestran los datos de qPCR obtenidos para los dos modelos predictivos en la cohorte de validación. El modelo 1 PBP-M (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-148b-3p) tuvo un AUC de 0,69 (IC del 95%, 0,55-0,86) y el modelo 2 PBP-N (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p y hsa-miR-99b-5p) tuvo un AUC de 0,78 (IC del 95%, 0,6-0,89). **PBP-N:** enriquecimiento con método de precipitación basado en polímeros y extracción de RNA con Norgen Plasma/Serum RNA purification kit. **PBP-M:** enriquecimiento en vesículas extracelulares con un método de precipitación basado en polímeros y extracción de RNA con el kit mirVana PARIS. **dCt:** umbral de ciclo; **miRNAs:** microRNAs; **PBP:** precipitación basada en polímeros; **qPCR,** PCR cuantitativa. **AUC:** área bajo la curva. **Curva ROC:** Curva de características operativas del receptor. Fuente: Modificada de Ibáñez-Pérez J., (66).

## 5.5. RESULTADOS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS miRNAs VALIDADOS CON LAS VEs Y SU FUNCIÓN BIOLÓGICA EN EL PROCESO DE IMPLANTACIÓN

Para investigar la asociación de los miRNAs validados con las VEs y su función biológica en el proceso de implantación, se realizó un análisis funcional para determinar los genes diana de los miRNAs validados. Se utilizaron las vías *Kyoto encyclopedia of genes and genomes* (KEGG) y el análisis mediante *Gene Ontology* (GO). Las vías KEGG mostraron varias vías significativamente enriquecidas entre las cuales se encontraban las vías *adherens junctions*, las vías de señalización del factor de crecimiento TGF-beta y las vías de síntesis de ácidos grasos... El análisis GO también mostró un enriquecimiento en las vías de señalización del TGF-beta, así como de vías relacionadas con el desarrollo embrionario en el útero, el sistema inmune, el endosoma y procesos de transporte mediados por vesículas. En general, la mayoría de las vías detectadas estaban estrechamente relacionadas con la implantación embrionaria y la decidualización endometrial (**Figura 15**) (66,88).



**Figura 15. Vías KEGG y GO enriquecidas.** Resumen de las vías significativamente enriquecidas relacionadas con los cuatro miRNAs validados en los modelos predictivos (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-99b-5p y hsa-148b-3p). En general, la mayoría de las vías detectadas estaban estrechamente relacionadas con la implantación embrionaria y la decidualización endometrial. En verde, vías compartidas entre KEGG y GO. El número de miRNAs implicados en cada vía se muestra dentro de la barra en color blanco. **KEGG**: enciclopedia Kyoto de genes y genomas; **MAPK**: proteína quinasa activada por mitógenos; **TGF**: factor de crecimiento transformante. **GO**: ontología génica. Fuente: Modificada de Ibáñez-Pérez J., (66).

## 6. DISCUSIÓN

El endometrio experimenta una serie de cambios durante el ciclo menstrual para alcanzar una fase secretora adecuada, en la que las glándulas endometriales alcanzan su máxima actividad secretora seis días después de la ovulación (93). Estas glándulas son las principales responsables de la producción del FE que es necesario para crear un microambiente uterino óptimo para la implantación embrionaria (93). Siempre se ha pensado que el embrión desempeñaba el papel más importante en el proceso de la implantación, sin embargo, en muchos casos en los que las condiciones maternas parecen ser óptimas y se realiza la transferencia de un embrión cromosómicamente normal tampoco se produce la implantación (94). Por lo tanto, investigar qué está fallando en esa comunicación embrión-endometrio en los ciclos sin implantación se ha convertido en el foco de muchos estudios (66,88).

Gracias a las investigaciones centradas en estudiar la implantación embrionaria se ha desarrollado el término "endometrio implantativo" que hace referencia al endometrio en el cual ocurre la implantación embrionaria en el mismo ciclo en el que se obtiene la muestra de FE (59). Varios estudios han demostrado que la composición en los perfiles proteómicos (58,59) y los patrones lipidómicos (60) del FE difieren entre los ciclos implantativos y los ciclos no-implantativos, lo que podría indicar que hay alteraciones en la composición de las secreciones de FE. Las variaciones en las secreciones endometriales también podrían estar afectando a la liberación de VEs, que son ampliamente conocidas como mediadoras de las comunicaciones intercelulares (68). Cada vez hay más evidencias de que las VEs presentes en el FE desempeñan un papel importante como primera línea en la interacción entre el embrión pre-implantativo y el endometrio. En concreto, se ha descrito que las VEs derivadas del FE contienen una carga de miRNAs que puede ser internalizada por los embriones y es capaz de modificar su capacidad de implantación (56,86). Por eso, este trabajo se ha centrado en el análisis de los miRNAs libres y asociados a VEs procedentes del FE como herramienta no invasiva para identificar un endometrio implantativo (66,88).

Debido al bajo volumen de FE que se recoge tras la aspiración, hay pocos estudios centrados en el análisis de miRNAs y VEs procedentes del FE. En este proyecto, antes de iniciar con el proceso de descubrimiento y validación de biomarcadores, tuvimos que optimizar la obtención y procesamiento de las muestras de FE y la técnica de aislamiento de VEs mediante PBP. En este trabajo de fin de grado se han presentado por primera vez los resultados correspondientes a esos experimentos, que han sido cruciales para llevar a cabo el resto de los experimentos y llegar a descubrir dos modelos predictivos del endometrio implantativo.

La optimización de la obtención y preparación de las muestras se realizó, en primer lugar, en el laboratorio partiendo de un *pool* de muestras procedentes de la cohorte de puesta a punto. Cuando intentamos implantar el lavado del catéter con 400  $\mu\text{L}$  de PBS para la obtención del FE en la práctica clínica comprobamos que no era posible y se tuvo que buscar una alternativa aplicable en la práctica clínica. Finalmente, tuvimos que utilizar 1500  $\mu\text{L}$  de PBS para lavar el catéter y obtener la muestra de FE completa. Los resultados obtenidos de la optimización de la obtención y preparación de las muestras de FE no mostraron diferencias significativas entre diluir la muestra 1:8 o diluirla 1:30 (**Figura 7**). Pensamos que estos resultados son debidos a que en las muestras diluidas a 1:8 los miRNAs y las VEs se quedan atrapadas en el fluido y no se liberan en tanta cantidad al sobrenadante de PBS, ya que en experimentos realizados posteriormente hemos visto que cuando las muestras de FE se tratan con un agente mucolítico, se liberaban un mayor número de VEs al sobrenadante (66,88). Los resultados de los experimentos de optimización ponen en manifiesto las dificultades que suele haber cuando se intentan aplicar métodos experimentales directamente en la práctica clínica sin haberlos probado antes. Por lo que consideramos que es imprescindible que haya una adecuada comunicación entre los investigadores básicos y los investigadores clínicos desde el primer momento en el que se plantean los experimentos.

Otro punto importante antes de empezar cualquier experimento es optimizar los protocolos que se van a utilizar al tipo de muestra que se quiere procesar. En este caso, las muestras de la cohorte de puesta a punto se obtuvieron durante un ciclo natural, entre 16 y 21 días después del inicio de la menstruación. Esto se decidió así, para tratar

de simular las condiciones en las se iban a recoger las muestras de las cohortes de descubrimiento y validación. Además, también se optimizó el protocolo PBP dado que no había descrito ningún protocolo para utilizarlo en el FE. Combinamos y comparamos dos protocolos existentes, el protocolo para analizar VEs en el líquido cefalorraquídeo (PBP-CSF) y el del líquido amniótico (PBP-AF), y así logramos diseñar un protocolo específico para poder utilizar el PBP en muestras de FE que ha sido descrito por primera vez gracias a este trabajo.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentra la imposibilidad de determinar qué es lo que ha fallado cuando no ocurre la implantación embrionaria. Cuando se consigue el embarazo tras una TE se asume que era un endometrio implantativo, que había una adecuada comunicación y que el embrión era competente. Sin embargo, cuando falla la implantación, no se puede saber qué es lo que ha fallado ya que el problema puede estar en el embrión, en el endometrio o en ambos. En este estudio se intentó minimizar el problema de la variabilidad endometrial realizando todas las transferencias en ciclo artificial siguiendo el mismo protocolo. La variabilidad de los embriones se trató de controlar seleccionando únicamente TE realizadas con embriones de buena calidad.

En resumen, gracias a los experimentos realizados en este TFG fue posible realizar el resto de los experimentos mencionados, que han dado lugar al desarrollo de nuevos protocolos para analizar miRNAs libres y asociados a VEs en volúmenes muy pequeños de FE (5-50  $\mu$ L) que podrían aplicarse en la práctica clínica para evaluar el estado del endometrio utilizando herramientas no invasivas. Como resultado de estos estudios hemos demostrado que el mejor método es el PBP-N que ha obtenido en las curvas ROC un AUC de 0,92 en el grupo de descubrimiento y un AUC de 0,78 en el grupo de validación. Además, se ha identificado el hsa-miR-99b-5p como mejor predictor del endometrio implantativo, con una especificidad del 0,93. De esta manera, los profesionales de los centros de reproducción asistida podrían utilizar este método para predecir el estado del endometrio y evitar la TE cuando el endometrio no está implantativo. Así, se podría optimizar el desenlace de los embriones transferibles y evitar que se transfieran a un endometrio que no está preparado para que ocurra la implantación ya que la génesis de estos embriones es muy laboriosa, muy costosa y además, la pérdida de embriones genera gran malestar a las pacientes.

## 7. CONCLUSIONES

1. **Son necesarios 1500  $\mu$ L de PBS para lavar el catéter y obtener la muestra de FE completa.**
2. **Es posible analizar miRNAs libres y asociados a VEs de volúmenes muy pequeños de FE (5-50  $\mu$ L).**
3. **Es posible utilizar la técnica basada en la precipitación con polímeros (PBP) el el FE para el enriquecimiento en VEs.**
4. Los métodos más eficientes para el análisis de miRNA en el FE son los métodos PBP seguidos de los métodos de extracción de RNA (PBP-N y PBP-M) (66).
5. El método PBP-M es un modelo robusto para detectar un endometrio implantativo basado en tres microRNAs: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-200b-3p y hsa-miR-148b-3p. AUC = 0,93 en el grupo de descubrimiento y 0,69 en el grupo de validación (66,88).
6. El método PBP-N representó un modelo para detectar un endometrio implantativo basado en tres microRNA: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-200b-3p y hsa-miR-99b-3p. AUC= 0,92 en el grupo de descubrimiento y 0,78 en el grupo de validación (66,88).
7. Los miRNAs libres y asociados a VEs del FE podrían ser utilizados como una herramienta no invasiva para identificar el endometrio implantativo. Estos protocolos podrían implementarse en la práctica clínica para evaluar el estado del endometrio antes de realizar TE y evitar la pérdida de embriones (88).

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vander BM, Wyns C. Fertility, and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018;62(1):2-10.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Fertil Steril*. 2017;108(3):393-406.
3. Datta J, Palmer MJ, Tanton C, Gibson LJ, Jones KG, Macdowall W, et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction*. 2016;31(9):2108–18.
4. Strauss J F, Barbieri RL. Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. Elsevier, 8th ed. Philadelphia, 2019.
5. Sociedad Española de Fertilidad. Saber más sobre: fertilidad y reproducción asistida. SEF. Madrid, 2012. pp 1–82.
6. Wyns C, de Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Motrenko T, Smeenk J, et al. ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open* 2022;2022(3):1–20.
7. Martínez L, Romero B. Guías Clínicas SEF: Ciclos de FIV-ICSI: indicaciones, protocolos de estimulación ovárica. SEF. Madrid, 2021. pp.1-15.
8. Coroleu B. Guías Clínicas SEF: Ciclos de FIV ICSI: punción, transferencia embrionaria, técnica e indicaciones. SEF. Madrid, 2021. pp. 1-14.
9. Roque M, Haahr T, Geber S, Esteves SC, Humaidan P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and metaanalysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update*. 2019;25(1):2–14.
10. Matorras R, Pijoan JI, Perez-Ruiz I, Lainz L, Malaina I, Borjaba S. Meta-analysis of the embryo freezing transfer interval. *Reprod Med Biol*. 2021;20(2):144-158.
11. Salamonsen LA, Evans J, Nguyen HPT, Edgell TA. The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):218-25.

12. Kurian NK, Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(2):189-198.
13. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril.* 1992;58(3):537-42.
14. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril.* 1991;55(1):114-8.
15. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(4):371–81.
16. Miravet-Valenciano JA, Rincon-Bertolin A, Vilella F, Simon C. Understanding and improving endometrial receptivity. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015;27(3):187-92.
17. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1277-85.
18. Leese HJ. Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays.* 2002;24(9):845-9.
19. Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: Obeying the quiet rules. *Hum Reprod.* 2007;22(12):3047-50.
20. Scott R, Upham K, Forman E, Hong K, Scott K, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013;100(3):697–703.
21. Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, et al. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online.* 2011;22(6):632–46.
22. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica III. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Gobalo, 3a ed. Madrid, 2015.
23. Hall JE, Guyton AC. Guyton & Hall compendio de fisiología médica. Elsevier, 14 ed. Barcelona, 2021.



24. Simón C, Horcajadas JA, García-Velasco J, Pellicer A. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica. Editorial Médica Panamericana, 1ra ed. Buenos Aires, 2009. pp. 2–42.
25. Tresguerres J, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Gil-Loyzaga P, et al. Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. Fisiología Humana. México, McGraw-Hill, 4ta edición, 2010.
26. Lessey BA, Young SL. structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. Elsevier, 8th ed. Philadelphia, 2019.
27. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 1999;340(23):1796-9.
28. Matorras R, Urquijo E, Mendoza R, Corcóstegui B, Expósito A, Rodríguez-Escudero FJ. Ultrasound-guided embryo transfer improves pregnancy rates and increases the frequency of easy transfers. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1762-6.
29. D'Angelo A, Panayotidis C, Alteri A, Mcheik S, Veleva Z. Evidence and consensus on technical aspects of embryo transfer. *Hum Reprod Open.* 2022(4):1–17.
30. Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, et al. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2019;25(2):202–23.
31. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update.* 2006;12(5):617-30.
32. Clayton SG. Menstruation. *Encyclopedia Britannica.* 2019. <https://www.britannica.com/science/menstruation>
33. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975;122(2):262-3.
34. Altmäe S, Esteban FJ, Stavreus-Evers A, Simón C, Giudice L, Lessey BA, et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of “omics” data: Focus on human endometrium. *Hum Reprod Update.* 2014;20(1):12–28.

35. Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A *et al.* Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(5):253-64.
36. Horcajadas JA, Riesewijk A, Martín J, Cervero A, Mosselman S, Pellicer A, *et al.* Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol.* 2004;63(1):41-9.
37. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology.* 2006;147(3):1097-121.
38. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, *et al.* In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod.* 2005;20(8):2104-17.
39. Gómez E, Ruíz-Alonso M, Miravet J, Simón C. Human endometrial transcriptomics: Implications for embryonic implantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(7):a022996.
40. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, *et al.* A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril.* 2011;95(1):50-60.
41. Altmäe S, Koel M, Võsa U, Adler P, Suhorutšenko M, Laisk-Podar T, *et al.* Meta-signature of human endometrial receptivity: A meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-15.
42. Thomas K, Thomson A, Wood S, Kingsland C, Vince G, Lewis-Jones I. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil Steril.* 2003;80(3):502-7.
43. Chen G, Xin A, Liu Y, Shi C, Chen J, Tang X, *et al.* Integrins  $\beta 1$  and  $\beta 3$  are biomarkers of uterine condition for embryo transfer. *J Transl Med.* 2016;14(303):1-10.
44. Garrido-Gómez T, Quiñonero A, Antúnez O, Díaz-Gimeno P, Bellver J, Simón C, *et al.* Deciphering the proteomic signature of human endometrial receptivity. *Hum Reprod.* 2014;29(9):1957-67.

45. Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction*. 2007;134(5):635-43.
46. Cong J, Diao HL, Zhao YC, Ni H, Yan YQ, Yang ZM. Differential expression and regulation of cyclooxygenases, prostaglandin E synthases and prostacyclin synthase in rat uterus during the peri-implantation period. *Reproduction*. 2006;131(1):139-51.
47. van der Gaast MH, Beier-Hellwig K, Fauser BCJM, Beier HM, Macklon NS. Endometrial secretion aspiration prior to embryo transfer does not reduce implantation rates. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(1):105-9.
48. Hannan NJ, Paiva P, Meehan KL, Rombauts LJF, Gardner DK, Salamonsen LA. Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. *Endocrinology*. 2011;152(12):4948-56.
49. Edgell TA. Protein biomarkers of endometrial receptivity. *How to Prepare the Endometrium to Maximize Implantation Rates and IVF Success*. Cambridge University Press. Cambridge, 2019. pp. 19–27.
50. Bhusane K, Bhutada S, Chaudhari U, Savardekar L, Katkam R, Sachdeva G. Secrets of endometrial receptivity: some are hidden in uterine secretome. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):226-36.
51. Hou Z, He A, Zhang Q, Liu N, Liu D, Li Y, *et al*. Endometrial fluid aspiration immediately prior to embryo transfer does not affect IVF/vitrified-warmed embryo transfer outcomes - a prospective matched cohort study. *Reprod Biomed Online*. 2022;44(3):486–93.
52. Binder NK, Evans J, Salamonsen LA, Gardner DK, Kaitu'u-Lino TJ, Hannan NJ. Placental growth factor is secreted by the human endometrium and has potential important functions during embryo development and implantation. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163096.
53. Scotchie JG, Fritz MA, Mocanu M, Lessey BA, Young SL. Proteomic Analysis of the Luteal Endometrial Secretome. *Reprod Sci*. 2009;16(9):883-93.
54. Hannan NJ, Paiva P, Meehan KL, Rombauts LJF, Gardner DK, Salamonsen LA. Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid

- identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. *Endocrinology*. 2011;152(12):4948-56.
55. Van Der Gaast MH, Macklon NS, Beier-Hellwig K, Krusche CA, Fauser BCJM, Beier HM, *et al*. The feasibility of a less invasive method to assess endometrial maturation - Comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. *BJOG*. 2009;116(2):304-12.
  56. Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martínez S, *et al*. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*. 2015;142(18):3210-21.
  57. Vilella F, Ramirez LB, Simón C. Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2012;99(4):1100-6.
  58. Azkargorta M, Escobes I, Iloro I, Osinalde N, Corral B, Ibañez-Perez J, *et al*. Differential proteomic analysis of endometrial fluid suggests increased inflammation and impaired glucose metabolism in non-implantative IVF cycles and pinpoints PYGB as a putative implantation marker. *Hum Reprod*. 2018;33(10):1898–906.
  59. Matorras R, Quevedo S, Corral B, Prieto B, Exposito A, Mendoza R, *et al*. Proteomic pattern of implantative human endometrial fluid in in vitro fertilization cycles. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;297(6):1577–86.
  60. Matorras R, Martinez-Arranz I, Arretxe E, Iruarizaga-Lejarreta M, Corral B, Ibañez-Perez J, *et al*. The lipidome of endometrial fluid differs between implantative and non-implantative IVF cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(2):385–94.
  61. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Lentjes EG, Fauser BCJM, Heijnen CJ, *et al*. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod*. 2009;24(6):1427-35.
  62. Parks JC, McCallie BR, Strieby A, McReynolds S, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Non-invasive omics analysis of endometrial secretions 24 hours prior to frozen embryo transfer is predictive of implantation outcome. *Fertil Steril*. 2014;102(3):134–5.

63. Parks JC, McReynolds S, McCallie BR, Strieby A, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. The molecular profile of uterine secretions is predictive of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2013;100(3):S391.
64. Braga DP de AF, Borges E, Godoy AT, Montani DA, Setti AS, Zanetti BF, *et al.* Lipidomic profile as a noninvasive tool to predict endometrial receptivity. *Mol Reprod Dev.* 2019;86(2):145-55.
65. Li T, Greenblatt EM, Shin MEJ, Brown TJ, Chan C. Cargo small non-coding RNAs of extracellular vesicles isolated from uterine fluid associate with endometrial receptivity and implantation success. *Fertil Steril.* 2021;115(5):1327-36.
66. Ibañez-Perez J, Díaz-Nuñez M, Clos-García M, Lainz L, Iglesias M, Díez-Zapirain M, Rabanal A, *et al.* microRNA-based signatures obtained from endometrial fluid identify implantative endometrium. *Hum Reprod.* 2022;37(10):2375-91.
67. Beier HM. Oviducal and uterine fluids. *J Reprod Fertil.* 1974;37(1):221-37.
68. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev Immunol.* 2002;2(8):569-79.
69. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Vizio D Di, Gardiner C, *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3(1):1-6.
70. Homer H, Rice GE, Salomon C. Review: Embryo- and endometrium-derived exosomes and their potential role in assisted reproductive treatments—liquid biopsies for endometrial receptivity. *Placenta.* 2017;54(1):89-94.
71. Boukouris S, Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl.* 2015;9(3-4):358-67.
72. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, *et al.* Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Scient World J.* 2015;20(1):1-15.
73. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev.* 2015;34(4):474-90.

74. Simon C, Greening DW, Bolumar D, Balaguer N, Salamonsen LA, Vilella F. Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease. *Endocr Rev.* 2018;39(3):292–332.
75. Nguyen HP, Simpson RJ, Salamonsen LA, Greening DW. Extracellular Vesicles in the Intrauterine Environment: Challenges and Potential Functions. *Biol Reprod.* 2016;95(5):109–109.
76. Andronico F, Battaglia R, Ragusa M, Barbagallo D, Purrello M, Di Pietro C. Extracellular vesicles in human oogenesis and implantation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):1-11.
77. Greening DW, Nguyen HPT, Elgass K, Simpson RJ, Salamonsen LA. Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. *Biol Reprod.* 2016;94(2):1–15.
78. Rai A, Poh QH, Fatmou M, Fang H, Gurung S, Vollenhoven B, *et al.* Proteomic profiling of human uterine extracellular vesicles reveal dynamic regulation of key players of embryo implantation and fertility during menstrual cycle. *Proteomics.* 2021;21(13-14):e2000211.
79. Balaguer N, Moreno I, Herrero M, González M, Simón C, Vilella F. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1 may control miR-30d levels in endometrial exosomes affecting early embryo implantation. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(8):411–25.
80. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res.* 2011;717(1-2):1-8.
81. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol.* 2014;51(4):759-74.
82. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-8.
83. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One.* 2008;3(9):1-7.

84. McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, Cha DJ, Franklin JL, Coffey RJ, *et al.* KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. *Cell Rep.* 2016;15(5):978-87.
85. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2(1):1-10.
86. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, *et al.* Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: A new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One.* 2013;8(3)e58502.
87. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease. *Cell Metab.* 2019;30(4):656-73.
88. Ibáñez-Pérez J. Free and extracellular vesicle-associated microRNAs from endometrial fluid as non-invasive diagnostic biomarkers of implantative endometrium. Barakaldo. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). 2022.
89. Campoy I, Lanau L, Altadill T, Sequeiros T, Cabrera S, Cubo-Abert M, *et al.* Exosome-like vesicles in uterine aspirates: A comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. *J Transl Med.* 2016;14(1):180-92.
90. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013;3(3):71-85.
91. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245-50.
92. Prieto-Fernández E, Aransay AM, Royo F, González E, Lozano JJ, Santos-Zorroza B, *et al.* A comprehensive study of vesicular and non-vesicular miRNAs from a volume of cerebrospinal fluid compatible with clinical practice. *Theranostics.* 2019;9(16):4567-79.

93. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev.* 2014;35(6):851–905.
94. Cozzolino M, Diaz-Gimeno P, Pellicer A, Garrido N. Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in overcoming recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(12):2989–97.



