

**Expresión de los micro ARNs miR 6805-3p, miR 6068 y miR 4516 en
medios de cultivo con embriones**

**Expression of micro RNAs miR 6805-3p, miR 6068 and miR 45616 in
embryo culture media**



Trabajo de fin de grado

Manuel Rodríguez González

Tutorizado por Julio Ávila Marrero y Rebeca González Fernández

Grado en Biología

Julio 2023

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Introducción	2
3.1 Micro ARN.....	2
3.1.1 Síntesis y procesamiento	2
3.1.2 Reconocimiento miRISC-ARNm.....	4
3.1.3 Mecanismo de acción	5
3.1.4 Degradación	6
3.1.5 Función.....	6
3.1.6 Regulación del miARN	7
3.1.7 Papel de los miARN en la comunicación célula-célula.....	7
3.2 Modelo de estudio	9
3.2.1 Fecundación y desarrollo embrionario	9
3.3 Reproducción asistida.....	10
4. Objetivos	12
5. Material y métodos.....	13
5.1 Obtención de medios de cultivo	13
5.2 Extracción de ARN	13
5.3 Cuantificación de miARN	14
5.4 Síntesis del ADNc	14
5.5 PCR a tiempo real semicuantitativa	14
5.6 Determinación de la expresión relativa	15
5.7 Análisis estadístico	15
6. Resultados	16
6.1 Cuantificación por fluorimetría de miARNs	16
6.2 Determinación de la expresión de miARNs por qRT-PCR.....	16
7. Discusión.....	20
7.1 Cuantificación total de miARNs en medio de cultivo.....	20
7.2 Nivel de expresión de miARNs.....	20
7.2.1 miR-6805-3p	21
7.2.2 miR-6068.....	23
7.2.3 miR-4516.....	24
7.2.4 Consideraciones finales.....	25
8. Conclusiones	26
9. Conclusions	26
10. Bibliografía.....	27

1. Resumen

Actualmente, la infertilidad es un problema global en el que la población recurre a las técnicas de reproducción asistida con el fin de conseguir un embarazo, sin embargo, el porcentaje de éxito no es muy elevado. Una de las razones es que, a la hora de seleccionar los embriones, se eligen en base a características morfológicas, las cuales no se correlacionan siempre con su estado fisiológico. Por este motivo, se está tratando de identificar biomarcadores que permitan conocer el estado fisiológico en el que se encuentra el embrión. En los últimos años, se ha visto el importante papel regulador que tienen los microARN en las células, participando en proliferación y diferenciación celular, respuestas inmunológicas, etc., lo cual podría convertirlos en buenos biomarcadores. Para ello, se aislaron las distintas vesículas extracelulares y el miARN libre del medio de cultivo en el que se desarrollan los embriones hasta el estado de blastocito. Posteriormente, se determinó el nivel de expresión de 3 miARNs (miR-6853p, miR-6068 y miR-4516) mediante PCR a tiempo real. Una vez confirmada la expresión de estos 3 miARN, se deberán realizar nuevas investigaciones en las que se trate de relacionar cada miARN con el estado fisiológico del embrión.

Palabras clave: miARN, fecundación in vitro (FIV), desarrollo embrionario.

2. Abstract

Currently, infertility is a global problem in which the population resorts to assisted reproductive techniques in order to achieve pregnancy. However, the success rate with these techniques is not very high, as the embryos selected for implantation are based on morphological characteristics that do not always correspond to their physiological state. For this reason, it would be interesting to find biomarkers that allow us to know its physiological state. In recent years, we have seen the important regulatory role that microRNAs have in cells, participating in cell proliferation and differentiation, immune responses, etc., which could make them good biomarkers. For this purpose, the different extracellular vesicles and free miRNA were isolated from the culture media in which the embryos develop up to the blastocyst stage. Subsequently, the expression level of 3 miRNAs (miR-6853p, miR-6068 and miR-4516) was determined by real-time PCR. Once the expression of these 3 miRNAs has been confirmed, further research should be carried out to relate each miRNA to the physiological state of the embryo.

Keywords: miRNA, in vitro fertilization (IVF), embryonic development.

3. Introducción

3.1 Micro ARN

Hasta hace poco más de una década, se pensaba que la única función del ARN era actuar como intermediario entre el ADN y la traducción de las proteínas. De esta manera, sólo un 2% del ARN se consideraba útil, mientras que el 98% restante era considerado productos transcripcionales “basura”. En el año 1993 se descubrió, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, un ARN corto producido por la *lin-4*-gen que, en vez de traducirse en una proteína, permanecía como ARN y se encargaba de reprimir postranscripcionalmente al ARNm *lin-14*. Aunque inicialmente se pensó que estas pequeñas moléculas de ARN eran exclusivas de los nematodos, empezaron a encontrarse en diversos filos animales, dándoles el nombre de microARN (Bhaskaran & Mohan, 2014; Gebert & MacRae, 2019; Saw *et al.*, 2021). Estos micro ARN (miARN), son un tipo de ARN endógeno, monocatenario y no codificante, con una longitud entre 18-22 nucleótidos que juegan un papel fundamental en la regulación a nivel postranscripcional, degradando el ARN mensajero (ARNm) o inhibiendo su traducción (Bavelloni *et al.*, 2017; Saw *et al.*, 2021).

3.1.1 Síntesis y procesamiento

Inicialmente, es la ARN polimerasa II (Fig. 1) la encargada de sintetizar los transcritos primarios de microARN (pri-miARN). Se trata de secuencias de varias kilobases de longitud con una estructura diferencial respecto al resto de ARN, la cual consiste en una horquilla y 3 vueltas en espiral flanqueadas por regiones monocatenarias protegidas por una caperuza en el 5' y una cola poliadenilada en el 3' (Bhaskaran & Mohan, 2014; Gebert & MacRae, 2019).

Cada pri-miARN puede dar lugar a un solo miARN maduro o a un grupo de ellos muy relacionados, los cuales se caracterizan por compartir la región semilla, pero diferir en el resto de la cadena, lo que implica que actuarán sobre un conjunto de objetivos que se superponen en gran medida. En cuanto a la región semilla, es aquella secuencia de 2-8 nucleótidos del miARN comenzando desde el extremo 5' cuya función principal reside en el reconocimiento de los ARNm (Gebert & MacRae, 2019; Rügger & Großhans, 2012).

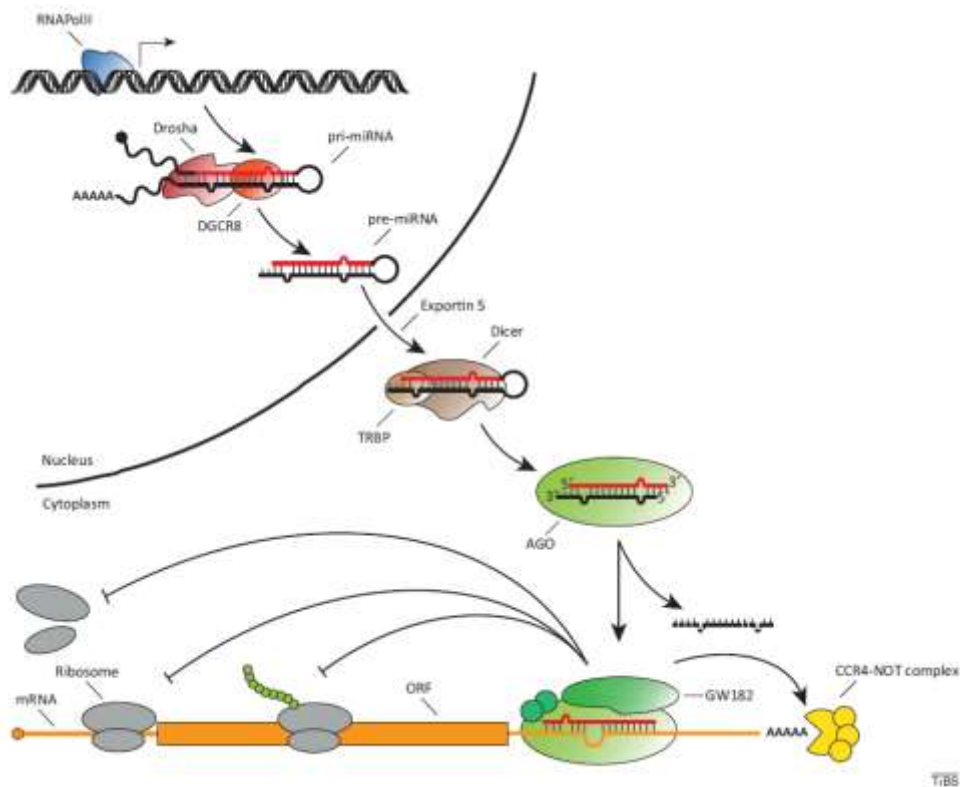


Figura 1. Esquema de la síntesis y procesamiento de los miARN. En el núcleo, la ARN pol II sintetiza un pri-miARN que es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 en un pre-miARN que sale del núcleo asociado a la exportina 5. Una vez en el citoplasma se une a la ARNasa III Dicer junto con sus cofactores TRBP que darán lugar al dúplex maduro de miARN. A continuación, interaccionará con el complejo RISC, el cual seleccionará la hebra guía y degradará la pasajero para que la guíe al ARNm diana. Finalmente, la región semilla de la hebra guía se asociará al ARNm provocando la inhibición de su traducción, ya sea liberando los factores de iniciación de la traducción o reclutando a GW182 para llevar a cabo la degradación de la cadena (Rüegger & Großhans, 2012).

La estructura del pri-miARN le permite al transcrito primario ser reconocido por un complejo microprocesador, el cual está conformado por la ARNasa III, conocida como Drosha, y la DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8), tal como se puede apreciar en la Fig. 1 (Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016). El complejo corta los pri-miARN generando precursores de micro ARN (pre-miARN) de unos 60-70 nucleótidos, haciendo un corte cerca de la base del tallo y liberando el precursor de bucle de tallo (Rüegger & Großhans, 2012). Posteriormente, interacciona con la Exportina 5 (XPO5) y Ran GTPase para salir del núcleo al citoplasma (Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016). En un estudio, se silenció la expresión de la XPO5 en una línea celular humana, lo cual produjo una reducción en la exportación de miARN pero no la eliminó, lo que podría significar que

hay otra vía para su transporte del interior del núcleo al citoplasma (Gebert & MacRae, 2019).

Finalmente, en el citoplasma el pre-miARN es reconocido por la ARNasa III, llamada Dicer, con sus cofactores TRBP (TAR RNA-binding protein 2) (Rüegger & Großhans, 2012), los cuales realizan cortes de tamaños específicos para dar lugar a dúplex maduros de 18-23 nucleótidos con un extremo 3' del que sobresalen 2 nucleótidos (Bhaskaran & Mohan, 2014; Gebert & MacRae, 2019).

El dúplex es liberado y se une al complejo de multiprotéico RISC (RNA-inducing silencing complex), que contiene, entre otras, a la Argonauta 2 (AGO) (Bhaskaran & Mohan, 2014). Las AGO constituyen una gran familia de proteínas, que usan pequeñas moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios para actuar sobre secuencias complementarias de ARN o ADN (Gebert & MacRae, 2019). Las hebras serán separadas de manera que una de ellas, la llamada hebra pasajero, se liberará y degradará, mientras que la otra, la hebra guía, se mantiene dentro del complejo RISC. Esta selección se lleva a cabo por la “regla de la asimetría de la termodinámica”, la cual defiende que la hebra cuyo extremo 5' tenga el par de bases menos estable será la hebra guía. Esta dirigirá al complejo miARN-RISC al ARNm que presente una secuencia de bases similar en la región semilla, el cual será silenciado (Rüegger & Großhans, 2012).

3.1.2 Reconocimiento miRISC-ARNm

Los miARN se unen fundamentalmente a las regiones 3'UTR de los ARNm (Fig. 1), dónde se suelen encontrar secuencias altamente complementarias a la semilla. Los sitios canónicos más fuertes de unión son aquellos que al complementar con el miARN tienen una adenina opuesta al primer nucleótido del miARN (se conoce como t1A), seguidos de los nucleótidos del 2-8 que conformarán la región semilla. El t1A no es reconocido por la hebra guía del miARN, sino por un bolsillo de unión de la argonauta (Gebert & MacRae, 2019). Además, la primera mitad de la región 3' del miARN puede actuar como región complementaria, en especial los nucleótidos 13-16, participando en el reconocimiento de objetivos y dirigiendo a miembros de la familia miARN que tienen la misma semilla a distintos sitios objetivos (Gebert & MacRae, 2019).

Los estudios estructurales sugieren que el reconocimiento de la diana se realiza en 2 pasos. En primer lugar, los nucleótidos del 2 al 6 de la semilla están preorganizados en una conformación helicoidal apilada, con los nucleótidos del 2 al 4 expuestos al

solvente, logrando una unión rápida y metaestable pero débil, de manera que podría romperse en cualquier momento, a no ser que los nucleótidos restantes, es decir, el 7 y 8, sean complementarios a los de la hebra guía, lo cual formaría una unión más longeva. En el caso de no ser complementarios los 2 últimos nucleótidos, AGO se desconectará del sitio y difundirá lateralmente por el ARNm o se disociará de él.

Las uniones no siempre se producen con la región semilla, hay ocasiones que se llevan a cabo en otras partes de los ARN dando lugar a las uniones no canónicas. En un estudio reciente en el que se usaron microarrays a gran escala en células HeLa, se encontraron algunas uniones no canónicas, en las cuales, no se consiguió detectar represión, por lo que no se conoce su función biológica.

3.1.3 Mecanismo de acción

El proceso de inhibición de la traducción del ARNm comienza con la unión del complejo miARN-RISC a la región 3'UTR del ARNm (Gebert & MacRae, 2019), aunque se ha informado de interacciones con regiones codificantes o 5' UTR (Kaczmarek *et al.*, 2020).

El miARN es capaz de regular la expresión génica gracias a la inhibición de la traducción del ARNm en el paso de iniciación (Fig. 1), posiblemente debido a la liberación de los factores de iniciación de células eucariotas eIF4A-I y eIF4A-II (mecanismo aún desconocido), y a la degradación del ARNm al interactuar con las proteínas de la familia glicina-triptófano (GW182).

La AGO reclutará a GW182, que interactuará con la proteína de unión a poliadenilato (PABPC) en el extremo 3' del ARNm, lo que a su vez atraerá al complejo de desadenilación de poli (A) y al complejo de proteínas represoras de catabolitos de carbono (CCR4). La desadenilación promueve la decapitación del ARNm por parte de la subunidad 1 y 2 (DCP1-DCP2) del complejo decapador de ARNm, dejando así al ARNm indefenso ante XRN1, una exoribonucleasa, la cual es capaz de degradar rápidamente la cadena en sentido 5'-3' (Gebert & MacRae, 2019; Saliminejad *et al.*, 2019).

Cada ARNm puede presentar diversos puntos de unión a distintos miARN (Fig. 2), al igual que un solo miARN puede actuar sobre varios ARNm, formando redes complejas de interacciones. De esta manera, es posible que un ARNm sufra tanto una inhibición de la traducción como una degradación mediada por GW182 (Gebert & MacRae, 2019).

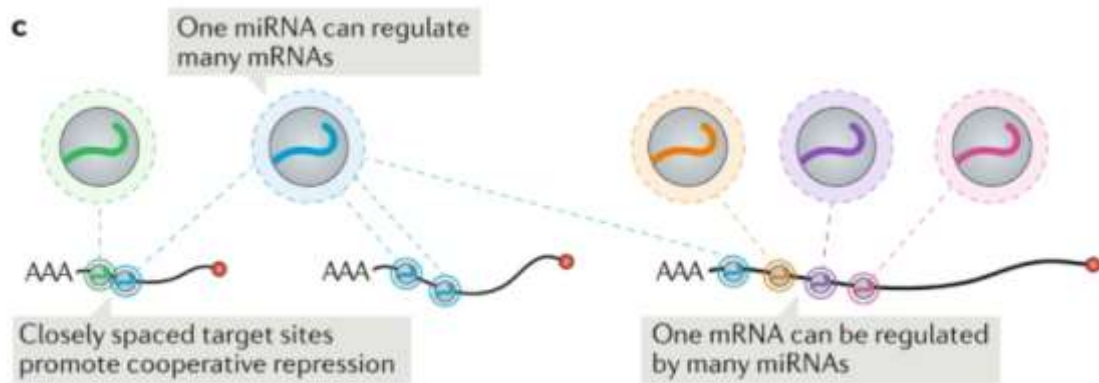


Figura 2. Esquema de las distintas interacciones ARNm-miARN. Un solo ARNm puede estar regulado por varios miARN o uno solo, además la cercanía de los puntos de unión entre los distintos miARN mejorará la cooperatividad entre ellos. Por otro lado, los miARN también son capaces de unirse a distintos ARNm, por lo que uno solo puede participar en la regulación de varios genes (Gebert & MacRae, 2019).

3.1.4 Degradación

En general, los miARN son moléculas relativamente más estables que otros ARN ya que, al inhibir a la ARN polimerasa II o sus enzimas de procesamiento, su vida media en líneas celulares y órganos como hígado o corazón es de horas o incluso días. No obstante, cada miARN juega un papel fundamental en momentos específicos del desarrollo, por lo que es necesario un metabolismo activo.

La degradación de los miARN viene dada fundamentalmente por exoribonucleasas, las cuales los degradan a partir de cualquiera de sus dos extremos terminales, 5' o 3'. Su estabilidad podría estar regulada por la adición de residuos de adenosina o uracilo en el extremo 3', por ejemplo, en células del hígado la presencia de una única adenosina logra proteger el miARN frente a la degradación (Krol *et al.*, 2010).

3.1.5 Función

Los miARN han supuesto una revolución en la comprensión de la regulación postraduccional de la expresión génica en plantas y animales. En mamíferos, se estima que cerca del 50% del control de la actividad de los genes codificadores de proteínas se lleva a cabo por estas moléculas (Krol *et al.*, 2010). El control suele ser específico para determinados órganos o células y altamente dependiente del estado metabólico y estrés que esté sufriendo el organismo (Correia de Sousa *et al.*, 2019).

Presenta un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación celular e infecciones víricas (Krol *et al.*, 2010). La alteración en la expresión de miARN es causa de desarrollo de diversas enfermedades tales como cáncer, problemas cardiovasculares, diabetes, etc..., de manera que se podrían aprovechar como biomarcadores para la detección de dichas enfermedades. Por ejemplo, un aumento significativo de la expresión y maduración de miARN-21 en la fibrosis de los miocitos, suele desembocar en una hipertrofia cardíaca, o la desregulación de los miARN reguladores de los oncogenes o genes supresores de tumores termina con el desarrollo de cáncer (Saliminejad *et al.*, 2019).

3.1.6 Regulación del miARN

La regulación del miARN es un proceso complejo ya que no solo existen mecanismos de regulación de su síntesis, también es posible regular su actividad y biodisponibilidad. Para ello, existe la metilación de los promotores del miARN, la selección asimétrica de las cadenas de miARN, interacciones con proteínas de unión (RBP) u otros ARN codificantes o no codificantes. Además, hay un mecanismo de regulación llamado “edición de ARN”, el cual consiste en el cambio de ciertos nucleótidos del miARN en distintos estadios de la maduración que serán críticos para su funcionalidad. El proceso involucra enzimas de la familia adenosina/citosina desaminasa, las cuales se encargan del cambio de nucleótidos individuales en los pri-miARN (convierten las adeninas en inosinas y las citosinas en uracilos) influyendo en su estabilidad, maduración y actividad al alterar su especificidad al ARNm diana.

3.1.7 Papel de los miARN en la comunicación célula-célula

Recientemente se ha sugerido que los miARN secretados al medio podrían contribuir a la comunicación entre células, ya sea entre células adyacentes o entre células que se encuentren alejadas entre sí (Fig. 3).

La comunicación entre células que se encuentren en contacto se realiza gracias a las uniones Gap. Se trata de canales intercelulares en la membrana plasmática que establecen una comunicación directa entre células adyacentes, permitiendo así una transferencia pasiva de moléculas de pequeño tamaño. Usando un sistema de cocultivo se demostró que el dúplex de miARN maduro era capaz de pasar de una célula a otra mediante estas uniones y actuar sobre los ARNm de las células vecinas (Saliminejad *et al.*, 2019).

La comunicación paracrina, o de larga distancia, requiere el uso del sistema sanguíneo y puede darse tanto con el miARN unido únicamente a AGO, como empaquetado en exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos, lipoproteínas o ribonucleoproteínas, siendo los exosomas los más comunes (Saliminejad *et al.*, 2019; J. Zhang *et al.*, 2015). La capacidad para transferir el miARN a una célula diana es limitada debido a que, una vez en el medio, las vesículas extracelulares encontrarán su diana de manera aleatoria. Asimismo, la baja concentración de exosomas en el medio, especialmente exosomas que contengan miARN, sugieren que la comunicación entre células distantes será poco eficiente, de manera que los efectos fisiológicos de los miARN se observarán principalmente en células receptoras cercanas (Saliminejad *et al.*, 2019).

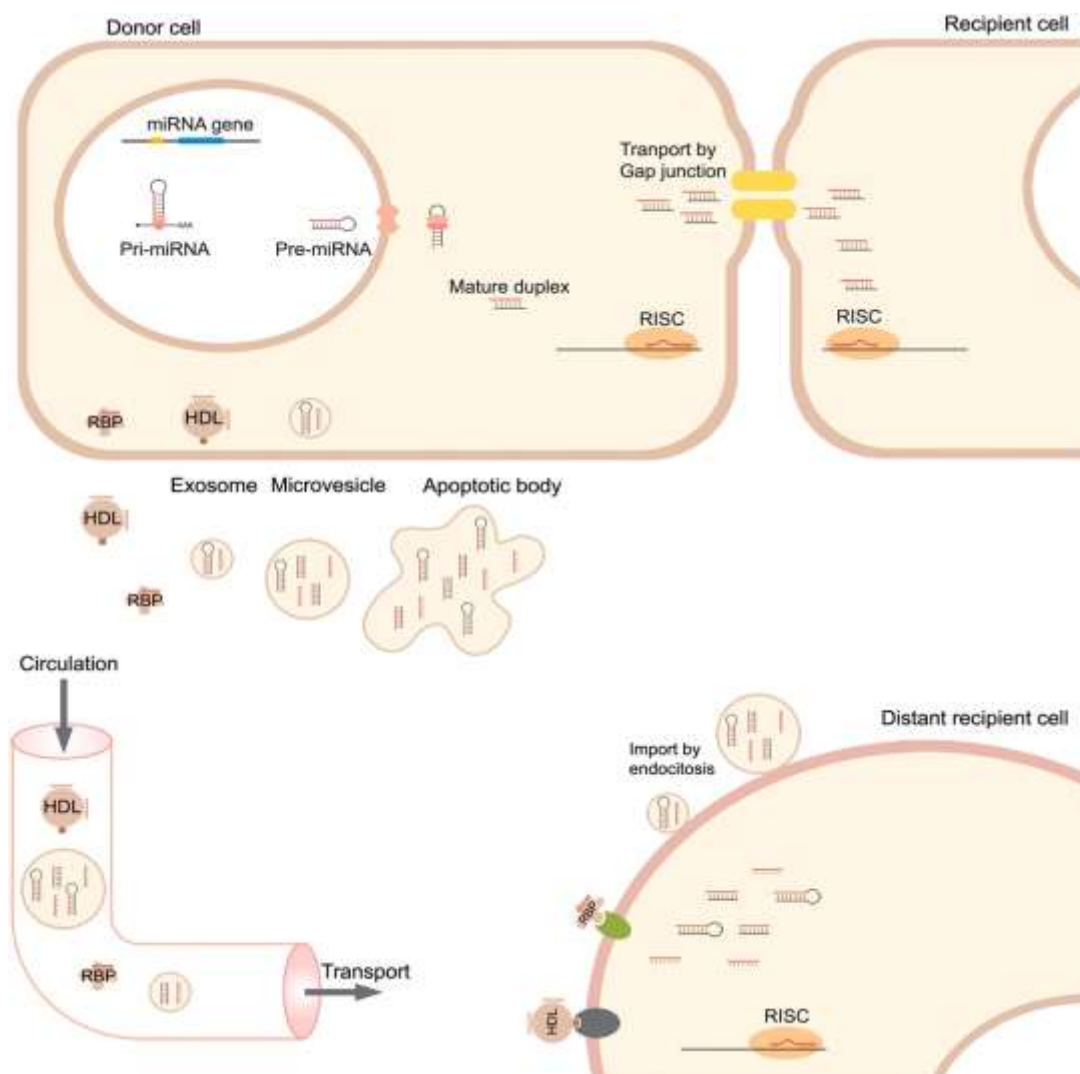


Figura 3. Esquema de las distintas vías de transporte del miARN. Los miARNs son capaces de actuar en células adyacentes, mediante transporte pasivo a través de uniones gap, o en células alejadas, viajando por el medio extracelular o el sistema circulatorio en exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos (Saliminejad *et al.*, 2019).

El transporte mediado por exosomas depende en gran medida del estado fisiológico en el que se encuentre el organismo. Ciertos miARN no requieren transporte o lo realizan a niveles muy bajos si el individuo se encuentra sano, pero en el caso de que se esté llevando a cabo algún proceso celular o se desarrolle alguna patología como puede ser el cáncer, los niveles a los que se encuentran aumentan, mostrando así el papel fundamental del transporte de miARN para la regulación. Además, se han encontrado dos funciones a los exosomas que contienen miARN, la primera de ellas consiste en actuar como regulador en la expresión génica de los genes diana, mientras que la segunda, la cual se descubrió posteriormente, consiste en actuar como ligandos y activar células inmunológicas (J. Zhang *et al.*, 2015).

3.2 Modelo de estudio

3.2.1 Fecundación y desarrollo embrionario

La fecundación consiste en la fusión de los gametos masculinos y femeninos para originar un cigoto. Seguido del proceso de segmentación, en el que se llevan a cabo una serie de divisiones celulares asincrónicas del cigoto recién formado, dando lugar a dos células de distinto tamaño denominadas blastómeros (Fig. 4). Los blastómeros continuarán dividiéndose, pero sin presentar crecimiento celular, resultando en células cada vez más pequeñas. Además, a medida que se van dividiendo las células, se va desarrollando una membrana externa de glicoproteínas que recubre al embrión denominada zona pelúcida (Rossant & Tam, 2022).

El embrión viaja hacia la cavidad uterina a través de las Trompas de Falopio. Los cilios y contracciones de la pared muscular de las tubas uterinas facilitan el desplazamiento del embrión. A estas alturas, los blastómeros son indiferenciados y totipotentes, es decir, cada uno tiene la capacidad de dar lugar a un individuo entero.

Los blastómeros poseerán su totipotencialidad hasta la formación de la mórula, que vendrá dada por la división de la octava célula e iniciación del proceso de compactación. En él, comenzarán a aparecer diferencias morfológicas entre las células internas y las externas, dando lugar a 2 poblaciones de células distintas (Khan & Ackerman, 2023). En el interior se encontrarán las células que compondrán la masa celular interna (ICM), que se dividirá en dos capas, el epiblasto (Epi) y el endodermo primitivo (PE). Las células del Epi darán lugar al feto mientras que el PE desarrollará el endodermo extraembrionario (ExEn) que formará el saco vitelino. En el exterior las

células formarán el trofoblasto, que se diferenciará en células citotrofoblásticas vellosas (VCT), un sincitio multinucleado (Syn) y células trofoblásticas extravelosas (Li & Winuthayanon, 2017; Niakan *et al.*, 2012; Rossant & Tam, 2022).

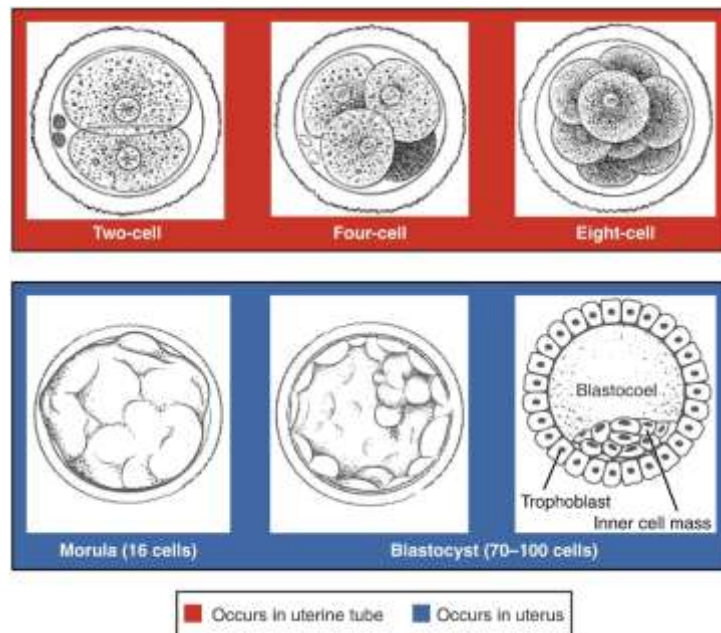


Figura 4. Desarrollo embrionario temprano. Tras la fecundación, el cigoto comienza a dividirse formando nuevas células, pero sin aumentar de tamaño. Al llegar a las 16 células, se forma la mórula y comienza el proceso de compactación, en el que las células pierden su totipotencialidad al aparecer diferencias morfológicas entre las células del exterior, que constituirán el trofoblasto, y las del interior que darán lugar a la masa celular interna. Además, se formará una cavidad rellena de líquido conocida como blastocele (Hardarson *et al.*, 2012).

Una vez la mórula llegue al útero, normalmente 4 días después del proceso de fecundación, las glándulas endometriales comienzan a secretar un líquido que entra en el interior de la mórula. El líquido va formando poco a poco una cavidad central en un proceso conocido como cavitación. En este punto, la mórula pasa a llamarse blastocito, cuyas células son pluripotentes y que estará constituido por el embrioblasto, el cual formará al embrión, y el trofoblasto, que dará lugar a la placenta (Li & Winuthayanon, 2017).

3.3 Reproducción asistida

La infertilidad es un problema global que afecta a alrededor de 48 millones de personas, que se ven obligadas a recurrir a Técnicas de reproducción asistida para conseguir un embarazo. No obstante, el porcentaje de éxito en esta técnica no es muy elevado. Hay distintos factores que perjudican al proceso como la baja respuesta ovárica

a la estimulación, baja calidad de los gametos y embrión o la detención del desarrollo embrionario temprano (Solovova & Chernykh, 2022).

En las técnicas de reproducción asistida se usa gonadotropina coriónica humana para inducir la estimulación ovárica y lograr que se maduren el mayor número posible de ovocitos. Los embriones obtenidos se mantendrán en cultivo hasta el momento de su implantación, en estado de blastocisto. La determinación del embrión de mejor calidad para ser implantado es un paso clave para el éxito de estas técnicas. Actualmente, la selección del embrión de mejor calidad se realiza mediante observación de sus características morfológicas. Sin embargo, un buen aspecto morfológico no siempre es indicativo de un correcto estado fisiológico. Dado el papel regulador y como moléculas de señalización que tienen los miARNs, el estudio de la expresión de los mismos nos podría permitir desarrollar un método de selección más fiable (Eskew & Jungheim, 2017; Hardarson *et al.*, 2012).

4. Objetivos

Debido, entre otros factores, al aumento en la edad reproductiva de las mujeres, cada vez es más común que se tenga que recurrir a técnicas de reproducción asistida para obtener un embarazo. La selección del embrión con mejor calidad para ser implantado permitiría incrementar las tasas de éxito de estas técnicas. Actualmente, la calidad del embrión se determina, principalmente, en base a sus características morfológicas, sin embargo, dado el papel regulador de los miARN, se cree que podrían actuar como importantes biomarcadores para determinar la calidad de los embriones y de esta manera mejorar la reproducción asistida (Hanevik & Hessen, 2022; Solovova & Chernykh, 2022).

Por este motivo, el objetivo de este trabajo es analizar la expresión de miARNs, previamente relacionados con la calidad embrionaria, en el medio de cultivo empleado para el crecimiento de embriones en técnicas de reproducción asistida.

Además, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificación por fluorometría de la cantidad de miARNs presentes en el medio de cultivo empleado para desarrollar los embriones hasta estadio de blastocisto.
- Determinación, por PCR a tiempo real, del nivel de expresión de 3 miARNs posibles marcadores de calidad embrionaria: miR-6805-3p, miR-6068 y miR-4516.

5. Material y métodos

5.1 Obtención de medios de cultivo

El medio empleado para el cultivo de embriones fue proporcionado por el Centro de Asistencia a la Reproducción Humana de Canarias. Acorde a sus protocolos, tras la fecundación los embriones fueron mantenidos en medio Continuous Single Culture-NX Complete (CSCM-NXC, Fujifilm IrvineScientific). Tras alcanzar el estado de blastocisto, los embriones fueron retirados para su transferencia o congelación, momento en el cuál nos proporcionaron el medio en el que se habían mantenido. Los medios fueron transportados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización.

5.2 Extracción de ARN

La extracción del miARN se realizó con el Plasma/Serum RNA Purification Kits, (Norgen Biotek Korp). Este kit es capaz de purificar tanto el ARN circulante como el que se encuentra en exosomas. Además, a diferencia de la mayoría de los kits de purificación de ARN libre que suelen requerir un volumen de muestra de 2mL, permite la purificación a partir de volúmenes de 50 μL , lo que se adapta a nuestras necesidades ya que contamos con un volumen inicial de alrededor de 75 μL . Destacar que se puede utilizar con ARN de todos los tamaños, de manera que será útil para aislar nuestros microARN.

Para llevar a cabo la extracción del miARN se siguió el protocolo del fabricante, incluyendo dos de los pasos opcionales. El primero de ellos consistió en añadir β -mercaptoetanol durante la lisis, ya que contribuye a aislar el ARN, y en el segundo se incubó con la DNasa para degradar el ADN que pudiera estar presente en la muestra. Este kit nos permitió obtener una muestra de miARN libre de ADN genómico, sales, metabolitos y otros componentes celulares, ofreciendo un volumen final de 20 microlitros.

Con el fin de poder comparar los resultados obtenidos, debemos de normalizar los datos. Para ello, utilizaremos un controlador interno, también conocido como housekeeping. Normalmente, son genes que se expresan de forma constitutiva y, por tanto, podemos usar como referencia para hacer una PCR- semicuantitativa. En los miARN no existen genes de referencia y, por eso, añadimos 2 μL del transcrito de Spike del microRNA (cel-miR-39) Spike-In Kit, (Norgen Biotek Korp) al comienzo del protocolo de extracción tras haber añadido el Buffer de lisis A junto al β -mercaptoetanol.

5.3 Cuantificación de miARN

Para conocer si los embriones secretaban al medio de cultivo miARN, se utilizó el Qubit microRNA Assay Kits, (Thermo Fisher Scientific), que permite cuantificar los miARN mediante fluorometría.

La cuantificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello se realizó una curva de calibrado que nos permitiría posteriormente calcular la concentración de miARN presente. El ensayo se hizo en el Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), aparato en el que se introdujeron las muestras en tubos de 200 μ L, que contenían 180 μ L de solución de trabajo y 20 μ L de muestra. El fluorímetro Qubit detecta la fluorescencia que emiten los fluorocromos fluorescentes al unirse de forma específica a sus dianas, en este caso miARN.

La cuantificación de miARNs se hizo a partir de los medios de cultivo obtenidos tras el desarrollo del embrión hasta estadio de blastocisto. En el primero de ellos, el medio 3185, se realizó el protocolo de extracción de miARN antes de la cuantificación (Muestra A), mientras que el medio 3083 se dividió a la mitad, a una de ellas se le llevó a cabo igualmente la extracción (muestra B), pero la segunda se cuantificó directamente (muestra C).

5.4 Síntesis del ADNc

Para la síntesis del ADNc se empleó el microScript microRNA cDNA Synthesis Kit, (Norgen Biotek Corp), para el cual se siguió el protocolo del fabricante. Una de las ventajas de este kit, es que le añade una cola poli A a los miARN antes de la reacción de síntesis con el fin de aumentar su longitud, logrando que sean de mayor tamaño que los cebadores. Posteriormente, se usa un primer que reconoce el añadido para la síntesis. De esta manera, en la posterior amplificación por PCR, se usará un primer universal, contra la zona añadida común, y un primer específico de cada miARNs.

5.5 PCR a tiempo real semicuantitativa

La cuantificación de miARNs presentes en las muestras se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real semicuantitativa (qRT-PCR). Para ello, se utiliza una molécula fluorescente cuya intensidad se correlaciona con la cantidad de ADNc. La molécula empleada fue SYBR Green I, la cual se caracteriza por aumentar su fluorescencia aproximadamente 100 veces al asociarse al ADN de doble cadena. A mayor fluorescencia que detecte el termociclador, mayor será la cantidad de ADN bicatenario presente en el pocillo (Benes & Castoldi, 2010).

Se emplearon primers específicos (Tabla 1) para cada uno de los miARN analizados (miR-6805-39, miR-6068 y miR-4516) y para el de referencia (Spike in (cel-miR-39)), además de un primer reverse universal, capaz de unirse a la cola poli A que se añadió durante la síntesis. Cada muestra fue analizada por duplicado, añadiendo además un blanco para el control de cada amplificación. Cada pocillo tenía un volumen final de 10 μ L, el cual debía contener SsoFast EvaGreen Supermix (5 ml, 2x real-time PCR mix, contains dNTPs, Sso7d fusion polymerase, MgCl₂, EvaGreen dye, stabilizers, for 500 x 20 μ l reactions)(BIO-RAD), los primers pertinentes para cada gen (0,25 μ M) y el molde de ADNc, a excepción de los blancos que no hubo molde.

miRNA	Primer	%GC	Tm (°C)
miR-6805-3p	TTGCTCTGCTCCCCCGCC	72,2	69,4
miR-6068	TTGTGGCTGAGTGTCACGC	61,9	66,7
miR-4516	GCAGGGAGGGCAGGGCAG	77,8	68,9

Tabla 1. Primers utilizados para la amplificación por qRT-PCR de los miARNs estudiados.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo CFX96 (BIO-RAD) según el protocolo de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 95°C durante 30 segundos, seguida de 45 ciclos de PCR a 95°C durante 5 segundos y 60°C otros 5 segundos. Con el fin de detectar si hubo contaminación en la muestra se observaron las curvas de Melting, las cuales presentaron un solo pico, mostrándonos así la ausencia de amplificaciones de otros productos. Su detección se llevó a cabo pasando de los 65°C hasta 95°C con un aumento de temperatura de 0,5°C cada 5 segundos con una lectura de la placa cada 5 segundos.

5.6 Determinación de la expresión relativa

La normalización de los datos se realizó en base a los ciclos de threshold (Ct). Se trata del número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente emitida represente un aumento estadísticamente significativo respecto al nivel basal. Los datos de expresión se normalizaron según la fórmula $2^{(Ct_{housekeeping} - Ct_{gen\ de\ estudio})}$. El resultado tuvo un valor muy bajo, por lo que se multiplicó por 10.000 para que sea más sencillo el posterior manejo de los datos (Rice *et al.*, 2015; Serrano-Cumplido *et al.*, 2021).

5.7 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS, el cual nos permitió calcular parámetros como la media, desviación estándar, etc... además de la elaboración de histogramas.

6. Resultados

Con el fin de determinar la presencia de miARNs en el medio empleado para el cultivo de embriones humanos en técnicas de reproducción asistida, se llevó a cabo la cuantificación total por fluorometría y la determinación de los miARNs específicos miR-6805-3p, miR-6068 y miR-4516 por qRT-PCR.

6.1 Cuantificación por fluorometría de miARNs

Para determinar la presencia de miARN en el medio de cultivo se realizó una cuantificación por fluorometría con el Qubit 4 Fluorometer de Thermo Fisher Scientific. Se llevaron a cabo tres lecturas, la primera a la muestra C, seguida de la muestra B y finalizando con la muestra A.

La muestra C tiene una concentración de 1,40 ng/ μ L como se puede observar en la Tabla 2, mientras que en las muestras A y B no se logró detectar miARN.

Muestras	Concentración de ARN
Medio 3083 (C)	1,40 ng/ μ L
Extracción 3083 (B)	No detectado
Extracción 3185 (A)	No detectado

Tabla 2. Cuantificación de miARN en medios de cultivo mediante el Qubit 4 Fluorometer.

6.2 Determinación de la expresión de miARNs por qRT-PCR

Se trató de determinar la expresión de 3 miARNs que se cree que pueden tener un papel regulador importante en la calidad del embrión mediante qRT-PCR.

Como podemos apreciar en la Tabla 3, miR-6805-3p tiene una media de expresión de 6,2699 con una desviación estándar de 9,2005; la media del miR-6068 es de 8,926 y su desviación de 5,8477 y el miR-4516 tiene una media de 0,598 y un 1,5849 de desviación estándar.

En general, se detectaron cantidades bajas de los miARN analizados en todos medios. Como podemos apreciar en las Fig. 5 y 6, las expresiones de miR-6805-3p y miARN6068 se encuentran en el intervalo 1-5, con alguna excepción, ya que en la Fig. 5 se observa como la expresión de miR-6805-3p fue más alta en algunas muestras, llegando a los intervalos 5-10 y 25-30, mientras que en la Fig. 6 se reparten de una manera más homogénea, ubicándose un caso en cada uno de los intervalos siguientes, el 5-10, 10-15

y 15-20. Por otro lado, en la Fig. 7 podemos observar que la expresión de miR-4515 en los distintos medios de cultivo analizados es más baja que la encontrada para los otros miARNs, localizándose todos los casos dentro del intervalo de expresión 1-5.

miRNA	N	Media	Desviación
miR-6805-3p	7	6,2699	9,2005
miR-6068	11	3,926	5,8477
miR-4516	9	0,598	1,5849

Tabla 3. Expresión relativa de los miARNs analizados. En la tabla se indican el número de muestras analizadas para cada miARN específico, así como la media de expresión de los mismos, como expresión relativa al controlador interno spike-in x 10⁴, y la desviación estándar.

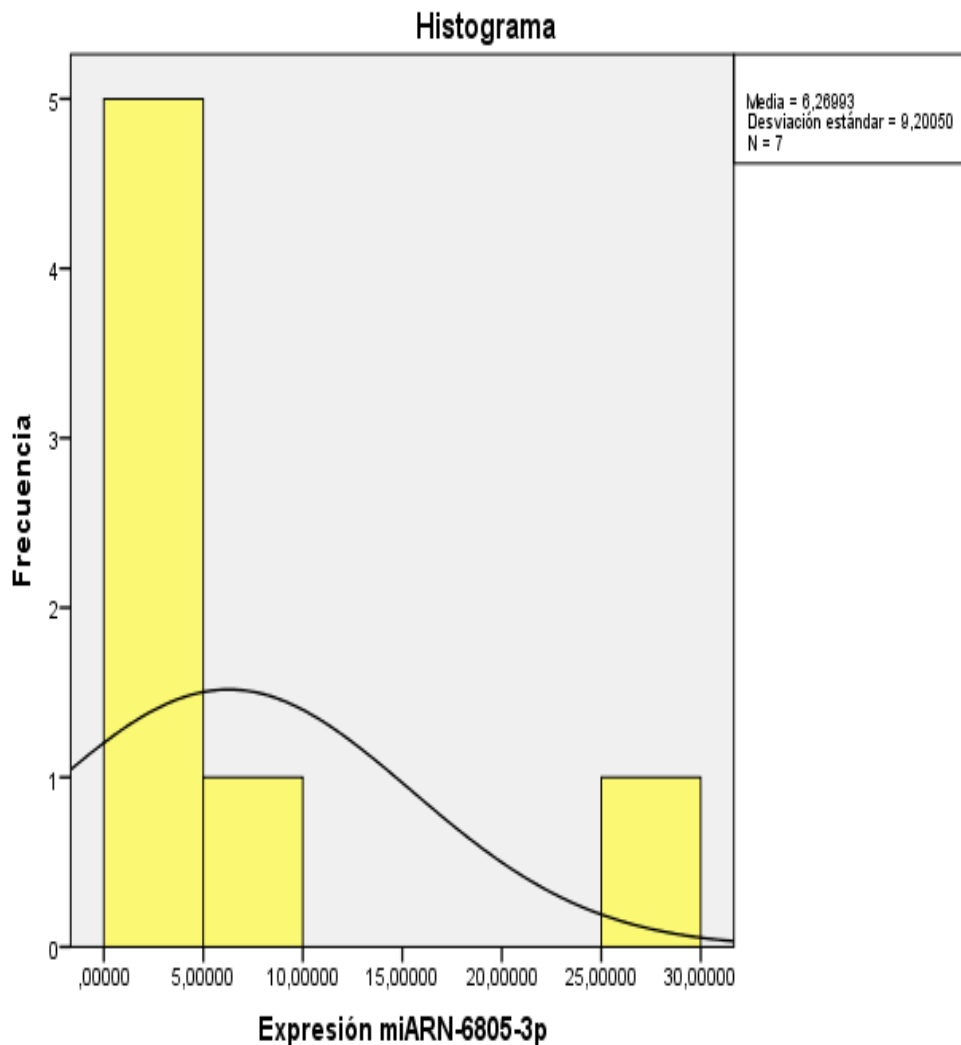


Figura 5. Histograma de la distribución de la expresión de miR-6805-3p. En el eje X se ubican los intervalos en los que se agruparon los niveles de expresión del miR-6805-3p detectados, los cuales forman grupos de 5 desde 0 hasta 30. Por otro lado, en el eje Y encontramos la cantidad de medios cuya expresión del miARN se encontraba en cada intervalo. Además, en la parte superior derecha hay un pequeño recuadro que nos indica la media, desviación estándar y número de muestras.

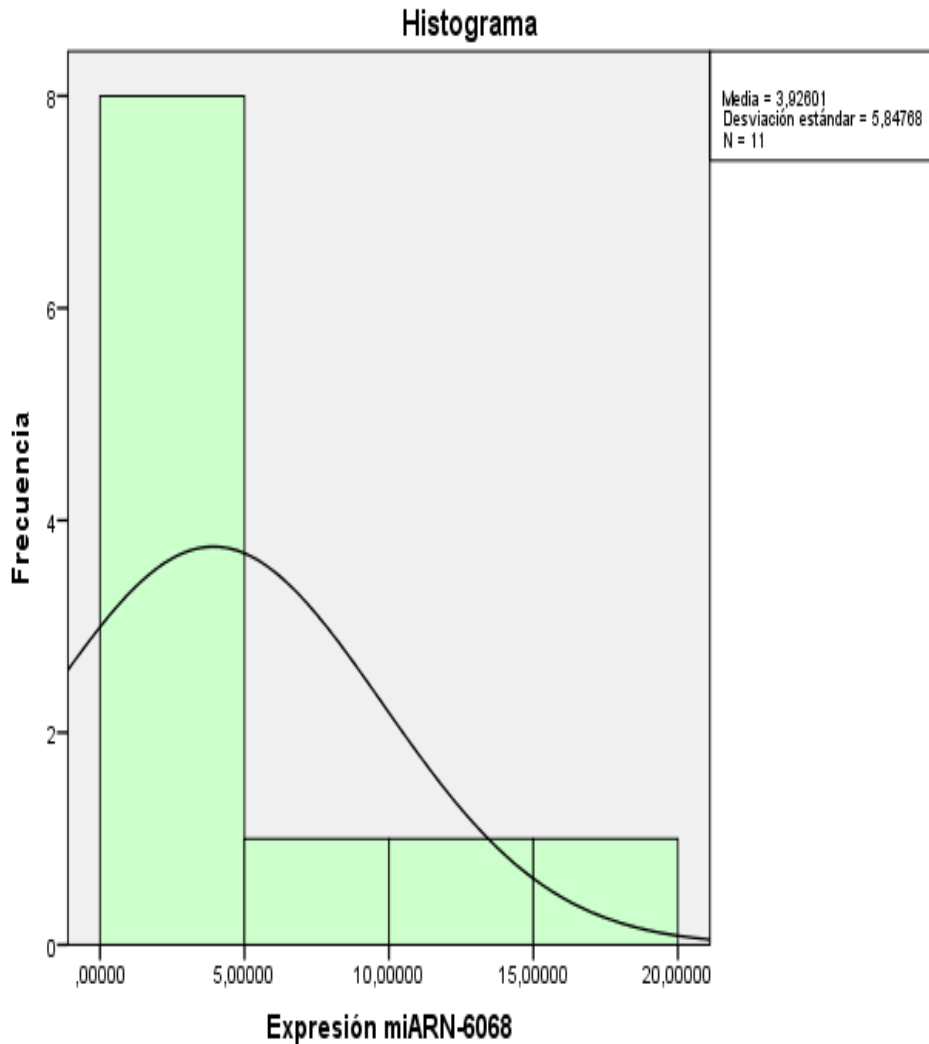


Figura 6. Histograma de la distribución de la expresión de miR-6068. En el eje X se ubican intervalos en los que se agruparon los niveles de expresión del miR-6068 detectados, los cuales forman grupos de 5 desde 0 hasta 20. Por otro lado, en el eje Y encontramos la cantidad de medios cuya expresión del miARN en cuestión se encontraba en cada intervalo. Además, en la parte superior derecha hay un pequeño recuadro que nos indica la media, desviación estándar y número de muestras.

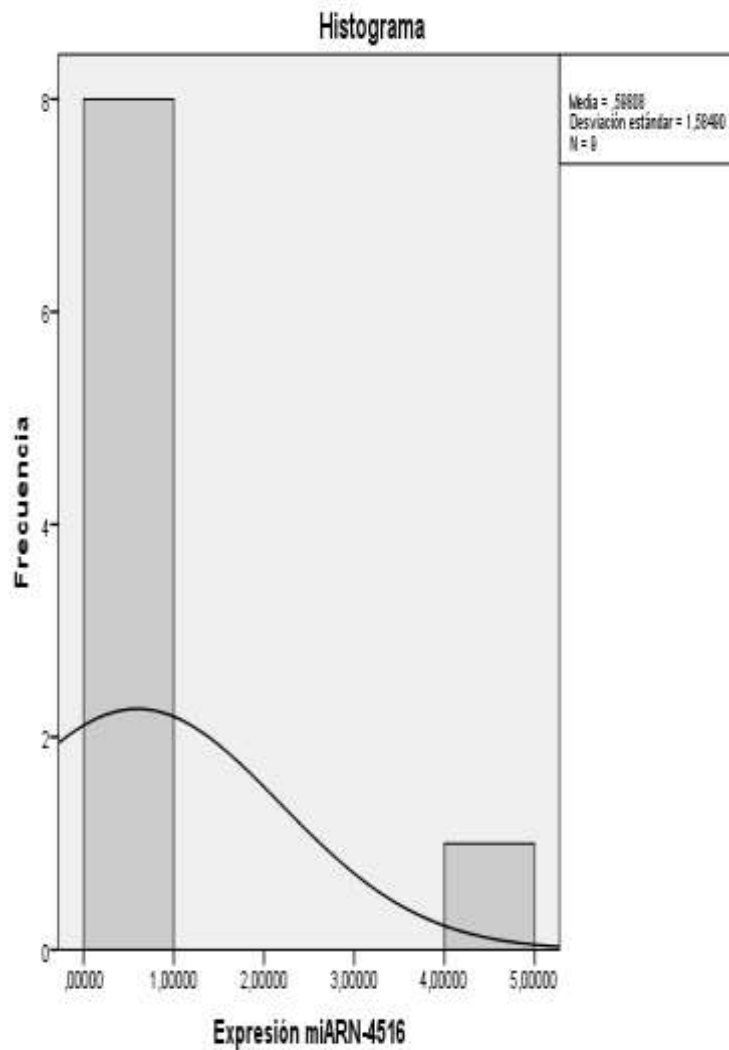


Figura 7. Histograma de la distribución de la expresión de miR-4516. En el eje X se ubican intervalos en los que se agruparon los niveles de expresión del miR-4516 detectados, los cuales forman grupos de 1 desde 0 hasta 5. Por otro lado, en el eje Y encontramos la cantidad de medios cuya expresión del miARN en cuestión se encontraba en cada intervalo. Además, en la parte superior derecha hay un pequeño recuadro que nos indica la media, desviación estándar y número de muestras.

7. Discusión

7.1 Cuantificación total de miARNs en medio de cultivo

Para cuantificar la cantidad de miARN presentes en los medios de cultivo analizados se empleó el Qubit 4 Fluorometer, técnica que nos permite realizar una cuantificación sencilla y rápida del miARN (Callaway *et al.*, 2014). Se trata de una técnica bastante exacta ya que, según varios estudios, hay una fuerte correlación entre los resultados obtenidos mediante fluorimetría y la RT-PCR (Polatoglou *et al.*, 2022).

La primera lectura se llevó a cabo con la muestra C, la cual dio un resultado de 1,40 ng/ μ L, indicando la presencia de miARN en el medio de cultivo de embriones previo a la extracción de miARN. Sin embargo, en las lecturas de las muestras B y C en las que sí se llevó a cabo, no se logró detectar la presencia de miARN, lo que implica que durante el proceso de extracción hay una gran parte del miARN que se pierde. No obstante, es importante llevarlo a cabo ya que nos permite eliminar contaminantes que pudieran estar presentes como restos de ADN o RNAsas, además de liberar los miARN que se encuentren en vesículas, los cuales no podrían ser usados para la síntesis de ADNc sin la extracción.

Para solventar este problema, en futuros estudios se podrían realizar técnicas para reducir el límite de cuantificación del Qubit como se indica en (Li *et al.*, 2015), donde logran disminuir el límite de cuantificación de 25 pg/ μ L.

7.2 Nivel de expresión de miARNs

Tal como se observa en los resultados, podemos detectar expresión de los 3 miARNs en los medios de embriones, aunque existen diferencias tanto en la cantidad como en el patrón de expresión entre cada miRNA. Esto puede ser un reflejo de un posible papel fisiológico diferente de cada uno en el desarrollo embrionario.

La comunicación del embrión con el entorno o con sí mismo es fundamental para su correcto desarrollo. Se ha demostrado que, durante el proceso reproductivo, hay secreción de exosomas en una gran diversidad de células reproductivas como células endometriales, foliculares, de las trompas de Falopio y del embrión (Esfandyari *et al.*, 2021). Tal es su importancia, que se ha reportado que numerosos mecanismos patológicos reproductivos están relacionados con los exosomas y su contenido. En concreto, nos interesa el contenido de miARN que pueden actuar en vías de señalización relacionadas con las divisiones, la implantación y el desarrollo embrionario temprano al dirigirse a

genes involucrados en estos procesos. Los exosomas son secretados independientemente del estado fisiológico de las células, por lo tanto, los miARNs que se detecten podrían informarnos sobre el estado del embrión (Esfandyari *et al.*, 2021).

Algunos estudios muestran los efectos de los miARN en ciertas patologías relacionadas con la reproducción. Por ejemplo, en el síndrome de ovario poliquístico, el cual se caracteriza por la disfunción ovulatoria e hiperandrogenismo, se ha encontrado que en humanos hay un mayor nivel de expresión de miARN tales como miR-25-3p, miR-143-3p o miR-193-3p y un nivel de expresión más bajo en miR-10a-5p o miR-23b-3p, los cuales están relacionados con diferentes vías de metabolismo (Hu *et al.*, 2020). En la preeclampsia, una anomalía del embarazo asociada con la mortalidad materna y fetal, en la que después de la semana 20 de embarazo comienza una hipoxia placentaria, sucede algo similar. El número de exosomas producidos y liberados a lo largo del embarazo es mayor en embarazos con complicaciones en comparación a embarazos normales (Salomon & Rice, 2017). Otro estudio encontró diferencias entre la expresión de miARN en los exosomas aislados de mujeres con preeclampsia y mujeres sanas, disminuyendo la expresión en ciertos miARNs como miR-23a-3p, miR-125b-2-3-p o miR-144-3p y aumentando en otros como miR-17-5p, miR-26a-5p o miR-30c-5p (Truong *et al.*, 2017).

Mediante la base de datos miRDB (<https://mirdb.org>) hemos podido predecir ciertas dianas que podrían tener los miARN del estudio mediante herramientas bioinformáticas. Se seleccionaron las dianas que pudieran afectar al desarrollo embrionario al estar involucradas en su señalización, proliferación, migración o desarrollo.

7.2.1 miR-6805-3p

Se trata de un miARN de 18 nucleótidos de longitud. Aunque no se le han logrado atribuir funciones específicas hasta el momento, se estudia su papel como biomarcador en base a su expresión. Estudiando miARNs que cambien su expresión en pacientes con cáncer de pulmón, se observó una regulación positiva de miR-6805-3p (Nie *et al.*, 2020). También se ha observado un aumento en su expresión relacionada con la artritis reumatoide (Xu *et al.*, 2019).

Una de las posibles dianas para el miR-6805-3p es NLRP5 (NLR Family Pyrin Domain Containing 5), gen de efecto materno cuya expresión se da principalmente en el ovocito. Se comienzan a detectar sus transcritos de ARNm desde el estado de 2-4 células

y sus proteínas están presentes hasta el estado de blastocisto, de manera que posiblemente juegue un papel importante en la embriogénesis temprana. Las mutaciones en NLRP 5 suelen provocar una detención embrionaria temprana debido a anomalías en la maduración del ovocito (Huang *et al.* 2022; Peng *et al.*, 2015). Dado que el miR-6805-3p tiene como uno de sus posibles objetivos este gen, es posible que el miARN altere la expresión de NLRP5 y, por lo tanto, afecte al desarrollo del ovocito.

Otro de las dianas de este miARN podría ser MAPK1 (Mitogen-activated protein kinase 1). Se trata de una familia de kinasas involucradas en una amplia variedad de procesos celulares como la proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo. Se ha visto que la expresión de MAPK1 está positivamente regulada en el embrión, lo que sugiere que podría actuar en la regulación del ciclo celular (Cajas *et al.*, 2020). La supresión de Mapk1 provoca letalidad embrionaria temprana debido a fallos en la formación de trofoblastos, diferenciación mesodérmica y desarrollo placentario (Upadhya *et al.*, 2013).

Finalmente, una diana importante que podría tener miR-6805-3p del estudio es MECP2 (methyl CpG binding protein 2). Se trata de una proteína que participa en el desarrollo embrionario, concretamente se le relaciona con un desarrollo normal de la placenta. Esta proteína es capaz de asociarse con histonas desacetilasas e histonas metiltransferasas, regulando de esta manera la metilación y desacetilaciones, actuando así como represor de ciertos genes diana al silenciar su transcripción (Jia *et al.*, 2017). Se ha visto que, si se silencia el cromosoma X paterno en tejidos extraembrionarios, los portadores de los alelos mutantes se encontrarán en desventaja frente a los del alelo salvaje, ya que en ellos se observaron defectos en la placenta (Itoh *et al.*, 2012). Por lo tanto, una mala regulación del gen podría desencadenar en un aborto espontáneo (Jia *et al.*, 2017).

La correcta expresión de este miARN podría llegar a ser importante para que el embrión pueda desarrollarse con normalidad debido a su posible papel en la regulación de NLRP5, MAPK1 y MECP2. Una regulación errónea de cualquiera de estas tres proteínas suele concluir en abortos espontáneos al no permitir que una correcta proliferación y diferenciación de las células del propio embrión o de su entorno.

7.2.2 miR-6068

El miR-6068 es un miARN de 19 nucleótidos de longitud. Actualmente, se desconocen sus principales funciones reguladoras en el organismo, sin embargo, existen estudios sobre su expresión ante ciertas patologías con el fin de poder usarlos como biomarcadores. Al estudiar los cambios de expresión de miARN presentes en los exosomas en pacientes con diabetes tipo II (T2D), nefropatía diabética tipo II (DN) y controles sanos, se observó que el miR-6068 de los exosomas se encontraba significativamente más alto en pacientes con DN, mientras que en T2D no se encontraron diferencias significativas respecto al control (Delić *et al.*, 2016).

Al investigar los cambios de expresión de miR-6068 entre pacientes con cáncer de próstata (PCa) y voluntarios sanos, se observó que la expresión del miARN era diferente entre ambos grupos, detectándose que había más vesículas con este miARN en el grupo PCa en comparación los voluntarios (Ali *et al.*, 2021).

Al miR-6068 se le predicen otra serie de dianas que podrían tener un papel importante en el desarrollo embrionario. En primer lugar, SOX 8 (SRY-box transcription factor 8). En pollos, se detectó expresión de esta proteína en diversidad de tejidos durante la embriogénesis como en las células de la cresta neural, neuronas entéricas del intestino, concretamente en el duodeno, ciertas regiones del páncreas en desarrollo y ciertos puntos de los nervios de la médula espinal (Bell *et al.*, 2000).

En segundo lugar, el miR-6068 podría actuar sobre KLF 7 (Kruppel-like factor 7), una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción que regulan diversos procesos celulares durante el desarrollo embrionario y el organismo adulto. Concretamente, KLF 7 actúa como un regulador de la neurogénesis y del ciclo celular, expresándose principalmente en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. Se ha visto que su silenciamiento es perjudicial para la diferenciación neuronal y cardiomiocítica de las células madre embrionarias (ESC), de manera que se sugiere que está implicado en procesos de autorrenovación de ESC (Caiazza *et al.*, 2010).

Por último, HOXC 10 (homeobox C10), familia de factores de transcripción altamente conservados que juegan un papel importante en la diferenciación celular y desarrollo embrionario (X. Zhang *et al.*, 2018).

Como hemos visto, algunas de sus posibles dianas, SOX 8, KLF 7 y HOXC 10, participan en procesos claves para el desarrollo embrionario tales como la diferenciación

celular o la autorrenovación de ESC, lo que implica que una mala regulación podría impedir un correcto desarrollo embrionario.

7.2.3 miR-4516

La secuencia madura de miR-4516 está constituida por 18 nucleótidos. Se ha visto que presenta una regulación negativa sobre la región 3'UTR de HLA-G (Human Leukocyte Antigen G) (Almeida *et al.*, 2022). El HLA-G se empieza a expresar en la etapa temprana del embarazo y se ha demostrado que inhibe a los linfocitos T citotóxicos y Natural Killer durante la reacción primaria alogénica, protegiendo al blastocisto de sufrir una lisis. Se ha visto que en patrones de expresión en los que el HLA-G se encontraba disminuido, era frecuente que ocurriera un aborto espontáneo, por otro lado, a niveles de expresión normales, el embarazo no presentaba complicaciones (Almeida *et al.*, 2022; Alfonso, 2009).

Se encontraron algunas proteínas diana que podrían ser reguladas por este miARN. Una de ellas podría ser el SPATA 33 (Spermatogenesis Associated Protein 33), la cual está relacionada con la localización de calcineurina en las mitocondrias de los espermatozoides, regulando así su motilidad en ratones (Miyata *et al.*, 2021).

Otra de sus dianas sería MECP2, que como ya hemos visto, actúa como represor de genes al asociarse con histonas desacetilasas e histonas metiltransferasas para regular la metilación y desacetilación.

Por último, una tercera diana podría ser ING 4 (Inhibitor of growth family member 4), también conocido como un supresor de tumores, que es regulado a la baja o eliminado en muchos tipos de cáncer. Se encarga de alterar la estructura de la cromatina al actuar como lector epigenético de las marcas de histonas de trimetilación H3K4 y al regular la transcripción de genes a través de la dirección de complejos proteicos de histona acetiltransferasa (HAT) e histona desacetilasa (HDAC). ING 4 se encarga de diversos procesos relacionados con el cáncer tales como la proliferación, apoptosis, migración o autofagia (Shatnawi *et al.*, 2021).

En el caso de miR-4516, solo se encontró una proteína que participara en el desarrollo embrionario y que presentase un alto score con el miARN en cuestión, sin embargo, sí que se encontraron dos que podrían llegar a influir en él. Por un lado, tenemos la SPATA 33 se expresa en el espermatozoide, participando en su movilidad y por tanto permitiendo su desplazamiento hasta el óvulo, permitiendo así que se lleve a cabo la

fecundación. Por otro lado, tenemos ING 4, que principalmente se ha relacionado con tumores, sin embargo, al participar en la regulación de proliferación, apoptosis y migración celular, es posible que pudiera llegar a influir en el desarrollo embrionario.

7.2.4 Consideraciones finales

En general, ninguno de los 3 miARN presentan una expresión muy alta. En miR-4516 se observan los niveles de expresión más bajos, donde de los 9 medios en los que se encontró este miARN, 8 de ellos tienen una expresión inferior a 1, superándolo tan solo 1 de los medios que se queda en los 4,82 (Fig. 7). Los otros 2, miR-6805-3p y miR-6068, suelen encontrarse entre el intervalo 0-5 (Fig. 5 y 6). Sin embargo, hay ciertos medios en los que la expresión supera ese intervalo, mostrando niveles mucho más altos de expresión. No obstante, no podemos sacar conclusiones sobre la correlación de la expresión de estos miARNs con la calidad embrionaria, ya que, por protocolo en el procedimiento clínico, en cada medio de cultivo se encontraban hasta 8 embriones de distintas calidades, por lo que no podemos atribuir las expresiones detectadas a una mayor o menor calidad de los mismos. Sin embargo, la diferencia significativa de expresión observada en alguno de los medios analizados para cada miRNA (Fig. 5, 6 y 7) podría indicar la presencia de algún embrión con un desarrollo no óptimo que incrementa significativamente la expresión de ese miRNA en el medio de cultivo. Comprobar este hecho requerirá realizar en el futuro nuevas investigaciones en las que se pueda analizar el medio de cultivo con embriones aislados y así poder relacionar los miARN detectados con la calidad de un embrión en concreto.

8. Conclusiones

- Se detecta y cuantifica la presencia de miARNs en medio de cultivo de embriones humanos utilizados en técnicas de reproducción asistida.
- Se observa que el procedimiento de purificación de miARNs del medio de cultivo implica una pérdida en la cantidad de miRNA recuperado, aunque no se ha podido determinar la eficiencia del mismo.
- Mediante qRT-PCR hemos podido obtener una cuantificación relativa de miR-6805-3p, miR-6068 y miR-4516 tras el proceso de purificación a partir de los medios de cultivo de embriones.
- Se observan diferencias en el nivel de expresión tanto entre los tres miARNs analizados como para cada uno de ellos entre los distintos medios ensayados.
- Pensamos que puede constituir un método válido para la cuantificación de miARNs en medio de cultivo y que podría permitir la identificación de marcadores miRNA de calidad embrionaria para embriones cultivados de forma individual.

9. Conclusions

- miRNAs are detected and quantified in the culture media of human embryos used in assisted reproduction techniques
- It is observed that miRNAs purification from culture media involves a loss in the amount of miRNA recovered, although the efficiency of the procedure could not be determined.
- We were able to get a relative quantification of miR-6805-3p, miR-6068 and miR-4516 by qRT-PCR after the purification process from embryo culture media.
- We observed differences in the level of expression, among the three miRNAs analyzed and for each of them among the different media tested.
- We believe that it may constitute a valid method for the quantification of miRNAs in culture media and could allow the identification of miRNA markers of embryonic quality for individually cultured embryos.

10. Bibliografía

- Ali, H. E. A., Gaballah, M. S. A., Gaballa, R., Mahgoub, S., Hassan, Z. A., Toraih, E. A., Drake, B. F., & Abd Elmageed, Z. Y. (2021). Small Extracellular Vesicle-Derived microRNAs Stratify Prostate Cancer Patients According to Gleason Score, Race and Associate with Survival of African American and Caucasian Men. *Cancers*, *13*(20), 5236. <https://doi.org/10.3390/cancers13205236>
- Almeida, R. S., Gomes, T. T., Araújo, F. S., Oliveira, S. A. V. de, Santos, J. F., Donadi, E. A., & Lucena-Silva, N. (2022). Differentially Expressed Bone Marrow microRNAs Are Associated With Soluble HLA-G Bone Marrow Levels in Childhood Leukemia. *Frontiers in Genetics*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.871972>
- Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzini, M., Focaccia, E., Blalock, W., & Faenza, I. (2017). MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Research*, *37*(12), 6511-6521.
- Bell, K. M., Western, P. S., & Sinclair, A. H. (2000). SOX8 expression during chick embryogenesis. *Mechanisms of Development*, *94*(1-2), 257-260. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(00\)00296-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00296-3)
- Benes, V., & Castoldi, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*, *50*(4), 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.026>
- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Veterinary pathology*, *51*(4), 759-774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
- Caiazza, M., Colucci-D'Amato, L., Esposito, M. T., Parisi, S., Stifani, S., Ramirez, F., & di Porzio, U. (2010). Transcription factor KLF7 regulates differentiation of neuroectodermal and mesodermal cell lineages. *Experimental Cell Research*, *316*(14), 2365-2376. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.021>
- Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Ladrón de Guevara, M., Millán de la Blanca, M. G., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., & González, E. M. (2020). Antioxidant Nobiletin Enhances Oocyte Maturation and Subsequent Embryo Development and Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5340. <https://doi.org/10.3390/ijms21155340>
- Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>
- Delić, D., Eisele, C., Schmid, R., Baum, P., Wiech, F., Gerl, M., Zimdahl, H., Pullen, S. S., & Urquhart, R. (2016). Urinary Exosomal miRNA Signature in Type II Diabetic Nephropathy Patients. *PloS One*, *11*(3), e0150154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150154>
- Esfandyari, S., Elkafas, H., Chugh, R. M., Park, H.-S., Navarro, A., & Al-Hendy, A. (2021). Exosomes as Biomarkers for Female Reproductive Diseases Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 2165. <https://doi.org/10.3390/ijms22042165>

- Eskew, A. M., & Jungheim, E. S. (2017). A History of Developments to Improve in vitro Fertilization. *Missouri Medicine*, 114(3), 156-159.
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(1), 21-37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Gulyaeva, L. F., & Kushlinskiy, N. E. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>
- Hanevik, H. I., & Hessen, D. O. (2022). IVF and human evolution. *Human Reproduction Update*, 28(4), 457-479. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac014>
- Hardarson, T., Van Landuyt, L., & Jones, G. (2012). The blastocyst. *Human Reproduction*, 27(suppl_1), i72-i91. https://academic.oup.com/humrep/article/27/suppl_1/i72/658679
- Hu, J., Tang, T., Zeng, Z., Wu, J., Tan, X., & Yan, J. (2020) The expression of small RNAs in exosomes of follicular fluid altered in human polycystic ovarian syndrome. *PeerJ*, 8, e8640. <https://peerj.com/articles/8640>
- Itoh, M., Tahimic, C. G. T., Ide, S., Otsuki, A., Sasaoka, T., Noguchi, S., Oshimura, M., Goto, Y., & Kurimasa, A. (2012). Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for Rett syndrome phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13859-13867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309864>
- Jia, R., Zhang, G., Fan, Y., Zhou, Z., Wan, Y., Zhang, Y., Wang, Z., & Wang, F. (2017). MBD1 and MeCP2 expression in embryos and placentas from transgenic cloned goats. *Zygote (Cambridge, England)*, 25(4), 462-471. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000284>
- Kaczmarek, M. M., Najmula, J., Guzewska, M. M., & Przygodzka, E. (2020). MiRNAs in the Peri-Implantation Period: Contribution to Embryo–Maternal Communication in Pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms21062229>
- Khan, Y. S., & Ackerman, K. M. (2023). Embryology, Week 1. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554562/>
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: Roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology*, 232(1), R1-R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Li, X., Ben-Dov, I. Z., Mauro, M., & Williams, Z. (2015). Lowering the quantification limit of the Qubit™ RNA HS Assay using RNA spike-in. *BMC Molecular Biology*, 16(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12867-015-0039-3>

- miRDB, an online database for miRNA target prediction and functional annotations. <https://mirdb.org>. Consultada en mayo-junio 2023.
- Miyata, H., Oura, S., Morohoshi, A., Shimada, K., Mashiko, D., Oyama, Y., Kaneda, Y., Matsumura, T., Abbasi, F., & Ikawa, M. (2021). SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(35), e2106673118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106673118>
- Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, *139*(5), 829-841. <https://doi.org/10.1242/dev.060426>
- Nie, H., Xie, X., Zhang, D., Zhou, Y., Li, B., Li, F., Li, F., Cheng, Y., Mei, H., Meng, H., & Jia, L. (2020). Use of lung-specific exosomes for miRNA-126 delivery in non-small cell lung cancer. *Nanoscale*, *12*(2), 877-887. <https://doi.org/10.1039/c9nr09011h>
- Polatoglou, E., Mayer, Z., Ungerer, V., Bronkhorst, A. J., & Holdenrieder, S. (2022). Isolation and Quantification of Plasma Cell-Free DNA Using Different Manual and Automated Methods. *Diagnostics*, *12*(10), 2550. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102550>
- Rice, J., Roberts, H., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2015). Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization. *Surgery*, *158*(5), 1345-1351. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.04.025>
- Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2022). Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Developmental Cell*, *57*(2), 152-165. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.12.022>
- Rüegger, S., & Großhans, H. (2012). MicroRNA turnover: When, how, and why. *Trends in Biochemical Sciences*, *37*(10), 436-446. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.07.002>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Salomon, C., & Rice, G. E. (2017). Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *145*, 163-179. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.006>
- Saw, P. E., Xu, X., Chen, J., & Song, E.-W. (2021). Non-coding RNAs: The new central dogma of cancer biology. *Science China. Life Sciences*, *64*(1), 22-50. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1700-9>
- Serrano-Cumplido, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, *47*(5), 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2021.05.003>

- Shatnawi, A., Abu Rabe, D. I., & Frigo, D. E. (2021). Roles of the tumor suppressor inhibitor of growth family member 4 (ING4) in cancer. *Advances in Cancer Research*, *152*, 225-262. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.05.004>
- Solovova, O. A., & Chernykh, V. B. (2022). Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest. *Genes*, *13*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/genes13111920>
- Truong, G., Guanzon, D., Kinhal, V., Elfeky, O., Lai, A., Longo, S., Nuzhat, Z., Palma, C., Scholz-Romero, K., Menon, R., Mol, B. W., Rice, G. E., & Salomon, C. (2017). Oxygen tension regulates the miRNA profile and bioactivity of exosomes released from extravillous trophoblast cells—Liquid biopsies for monitoring complications of pregnancy. *PLoS One*, *12*(3), e0174514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174514>
- Upadhyaya, D., Ogata, M., & Reneker, L. W. (2013). MAPK1 is required for establishing the pattern of cell proliferation and for cell survival during lens development. *Development (Cambridge, England)*, *140*(7), 1573-1582. <https://doi.org/10.1242/dev.081042>
- Xu, D., Song, M., Chai, C., Wang, J., Jin, C., Wang, X., Cheng, M., & Yan, S. (2019). Exosome-encapsulated miR-6089 regulates inflammatory response via targeting TLR4. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(2), 1502-1511. <https://doi.org/10.1002/jcp.27014>
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *13*(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- Zhang, X., Zhao, B., Yan, T., Hao, A., Gao, Y., Li, D., & Sui, G. (2018). G-quadruplex structures at the promoter of HOXC10 regulate its expression. *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, *1861*(11), 1018-1028. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.004>