

# **MicroRNAs circulantes como biomarcadores no invasivos y herramientas terapéuticas para la endometriosis**

**Trabajo Fin de Master**

Master aplicado en biología y tecnología aplicada a la reproducción humana

Curso 2024-2025

Autor: José Ángel Corona

Tutor: María Cruz Palomino

Cotutora: Emma Muñoz Saez

## **Índice**

<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Objetivos e hipótesis</b>	<b>4</b>
<b>Introducción y metodología</b>	<b>5</b>
<b>Capítulo 1: Introducción a la endometriosis y biomarcadores no invasivos</b>	<b>6</b>
1. Definición y Prevalencia	6
2. Síntomas Principales y Calidad de Vida	6
3. Diagnóstico de la Endometriosis	7
4. Limitaciones de los Métodos Diagnósticos Actuales	8
5. Necesidad de Biomarcadores no Invasivos	8
6. Papel del Microambiente Inflamatorio e Influencia Hormonal	8
<b>Capítulo 2: RNAs no codificantes</b>	<b>10</b>
7. RNAs no codificantes (ncRNAs)	10
7.1. Micro RNA (miRNAs)	11
8. Mecanismos de Influencia de los miRNAs en la Patogénesis de la Endometriosis	12
9. Resistencia Hormonal (Resistencia a la Progesterona y Dependencia de Estrógenos)	15
<b>Capítulo 3: MicroRNAs como Biomarcadores y Dianas Terapéuticas</b>	<b>17</b>
10. Evaluación Sistemática de miRNAs Circulantes como Biomarcadores de Endometriosis	17
11. MiRNAs Específicos Propuestos como Biomarcadores en Endometriosis: Análisis en Sangre y Líquido Peritoneal	18
11.1. miRNAs en plasma	18
11.2. miRNAs en Tejido Endometrial y Líquido Peritoneal	20
12. Sensibilidad y Especificidad como Herramientas Diagnósticas y Desafíos	22
13. Uso en la Monitorización de la Progresión de la Enfermedad y Estrategias Terapéuticas Emergentes	23
14. Conclusiones y Direcciones Futuras	25
<b>Capítulo 4: Metodologías y desafíos en la validación de miRNAs como biomarcadores clínicos</b>	<b>27</b>
15. Técnicas para la Investigación y Validación de miRNAs como Biomarcadores	27
16. Desafíos en la Reproducibilidad y Estandarización de los Estudios de miRNAs en Endometriosis	28
17. Implicaciones y Direcciones Futuras para la Implementación Clínica	30
<b>Capítulo 5: Conclusiones e Implicaciones Clínicas de los miRNAs en la Endometriosis</b>	<b>32</b>
18. Discusión	32
19. Viabilidad diagnóstica de los miRNAs	33
20. Implicaciones terapéuticas y monitorización clínica	33
21. Desafíos y limitaciones	34
22. Proyecciones clínicas y avances futuros	35
23. Reflexión final	35

**Lista de abreviaturas**

- **COX-2:** Ciclooxygenasa-2
- **DNA:** Ácido desoxiribonucleico
- **EMT:** Endometriosis
- **EPHect:** Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation
- **IL-8:** Interleucina 8
- **lncRNAs:** RNA largos no codificantes
- **miRNA:** MicroRNA
- **ncRNAs:** RNA no codificantes
- **qPCR:** PCR en tiempo real
- **rASRM:** American Society of Reproductive Medicine
- **RNA:** Ácido ribonucleico
- **sncRNA:** RNA cortos no codificantes
- **TEM:** Transición epitelial-mesenquimal
- **TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta
- **VEGFA:** Factor de crecimiento endotelial vascular
- **WERF:** World Endometriosis Research Foundation

**Resumen**

En nuestro estudio se pretende analizar a profundidad el papel de los microRNAs (miRNAs) como biomarcadores en la endometriosis (EMT), una enfermedad ginecológica crónica que afecta a millones de mujeres en edad reproductiva y cuyo diagnóstico suele retrasarse varios años debido a la falta de métodos no invasivos eficaces. Dado que los miRNAs desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica y están involucrados en procesos clave como la inflamación, la proliferación celular y la resistencia hormonal, su estudio podría ofrecer nuevas oportunidades para el diagnóstico temprano y el tratamiento personalizado de la enfermedad.

Para ello, hemos realizado una revisión sistemática de la literatura científica más relevante, recopilando información sobre los perfiles de expresión de miRNAs en pacientes con EMT, su potencial como biomarcadores en fluidos biológicos como la sangre y el líquido peritoneal, así como su posible uso como dianas terapéuticas. A través de este análisis, buscamos contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la EMT y evaluar el impacto clínico de los miRNAs en el manejo de esta patología.

En el capítulo inicial, se introduce la EMT como una enfermedad ginecológica crónica que afecta a millones de mujeres en el mundo. Se abordan sus principales síntomas, impacto en la calidad de vida y las dificultades en su diagnóstico. Se explica por qué los métodos actuales, como la laparoscopia, son invasivos y limitados, lo que hace imprescindible la búsqueda de biomarcadores no invasivos. Además, se menciona el papel del microambiente inflamatorio y la regulación hormonal en la progresión de la enfermedad.

En el segundo capítulo se definirán los RNAs no codificantes y uno de sus tipos, los miRNAs. Se explican los mecanismos mediante los cuales los miRNAs influyen en la proliferación celular, la angiogénesis, la inflamación y la resistencia hormonal en la EMT.

En el tercer capítulo se examinan los miRNAs específicos que han sido propuestos como biomarcadores en la EMT. Se analizan estudios que han evaluado su presencia en sangre, líquido peritoneal y tejido endometrial. Se discute su sensibilidad y especificidad como herramientas diagnósticas no invasivas y su posible uso en la monitorización de la progresión de la enfermedad. Asimismo, se revisan estrategias terapéuticas emergentes que buscan modular la expresión de miRNAs para tratar la EMT.

El cuarto capítulo aborda las técnicas utilizadas en la investigación y validación de miRNAs como biomarcadores. Se describen métodos como la PCR en tiempo real (qPCR), la secuenciación de RNA y los arrays de expresión de miRNAs. También se analizan los desafíos en la reproducibilidad de estos estudios, la estandarización de los protocolos y la necesidad de ensayos clínicos para su implementación en la práctica médica.

Finalmente, a modo de conclusión, se presentan de manera integrada los hallazgos más relevantes de la revisión bibliográfica. Se reflexiona sobre la viabilidad de los miRNAs como herramientas diagnósticas y terapéuticas en la EMT, resaltando las áreas que requieren más investigación. Se discuten las implicaciones clínicas y los posibles avances futuros que podrían mejorar la detección temprana y el tratamiento personalizado de la enfermedad.

**Objetivos e hipótesis**

El objetivo general de este trabajo es analizar el papel de los miRNAs como biomarcadores no invasivos en la endometriosis, evaluando su implicación en procesos clave como la inflamación, la proliferación celular, la angiogénesis y la resistencia hormonal, así como su potencial utilidad diagnóstica y terapéutica. De manera específica, se busca identificar los miRNAs más estudiados en sangre, líquido peritoneal y tejido endometrial, revisar las metodologías empleadas para su validación y explorar su viabilidad como dianas terapéuticas emergentes. La hipótesis de este trabajo plantea que ciertos perfiles diferenciales de miRNAs podrían constituir biomarcadores fiables y no invasivos que, combinados en paneles diagnósticos, mejorarían la detección precoz de la endometriosis y, además, que la modulación terapéutica de estos miRNAs podría abrir nuevas estrategias de tratamiento personalizado orientadas a mejorar el pronóstico reproductivo y la calidad de vida de las pacientes endometriósicas.

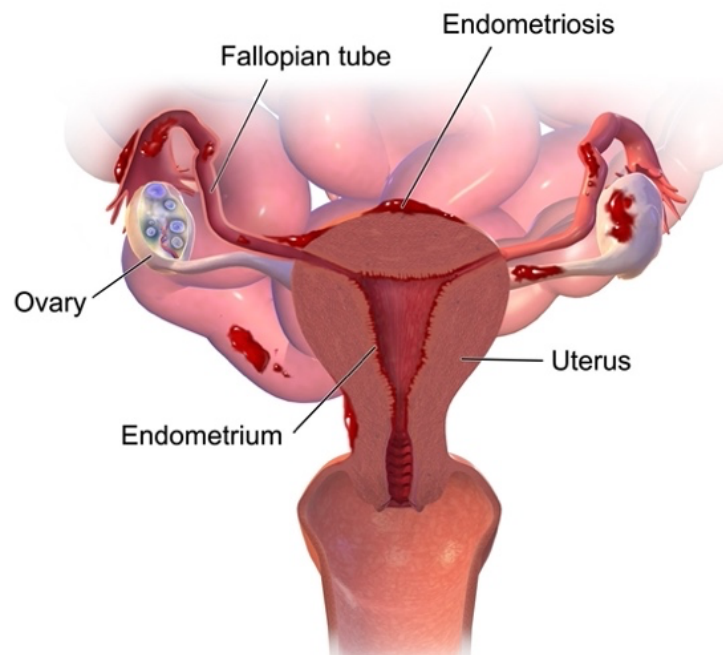
**Introducción y metodología**

La EMT representa un desafío significativo en el campo de la ginecología y la medicina reproductiva, debido a su naturaleza crónica, sintomatología inespecífica y frecuente asociación con infertilidad. En esta investigación, abordamos los complejos procesos moleculares y las alteraciones epigenéticas que subyacen al desarrollo y progresión de esta patología. En particular, exploramos el papel fundamental de los RNAs no codificantes, especialmente los miRNAs, en la fisiopatología de la EMT y su impacto en la función reproductiva femenina. Este enfoque nos permite valorar el potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores no invasivos, con aplicaciones tanto diagnósticas como pronósticas, y su posible implicación en nuevas estrategias terapéuticas orientadas a modular los mecanismos de inflamación, angiogénesis y disfunción endometrial característicos de esta enfermedad.

Para la búsqueda y selección de información relevante se utilizó como fuente principal la base de datos científica PubMed, complementada por otras fuentes académicas especializadas en medicina reproductiva. Asimismo, conté con el valioso apoyo de profesionales expertos en el área, entre ellos el Dr. Juan A. García-Velasco, el Dr. José Tadeo Corona y mi tutora de Trabajo Fin de Máster María Cruz Palomino, quienes facilitaron el acceso a bibliografía actualizada y de alto impacto relacionada con la EMT y las posibles aplicaciones terapéuticas de los microRNAs. De igual manera, quiero dejar constancia de la participación de mi cotutora por parte de la Universidad Europea, Emma Muñoz Sáez, cuya labor responde a los requisitos académicos establecidos por la UEM y la ANECA para garantizar la vinculación de profesorado de la institución en el seguimiento y desarrollo de los Trabajos Fin de Máster. Gracias a la orientación recibida y a la revisión exhaustiva de los estudios relevantes, fue posible desarrollar un trabajo fundamentado en la evidencia científica más reciente y pertinente para el abordaje de esta patología.

**Capítulo 1: Introducción a la endometriosis y biomarcadores no invasivos****1. Definición y Prevalencia**

La EMT es una enfermedad ginecológica crónica y multifactorial que afecta entre el 10% y el 15% de las mujeres en edad reproductiva y aproximadamente al 70% de aquellas que presentan dolor pélvico crónico (Chauhan et al., 2022). Se caracteriza por el crecimiento de tejido similar al endometrio fuera de la cavidad uterina, con localizaciones frecuentes en los ovarios, el peritoneo y las trompas de Falopio (**Figura 1**). También puede presentarse en sitios más inusuales como el intestino, vejiga o incluso la pared abdominal, lo que contribuye a la complejidad de su diagnóstico y manejo clínico.



**Figura 1.** Crecimientos de tejido endometrial situado en distintas localizaciones (ovario, peritoneo, trompas de Falopio e intestinos) (Endometriosis Con Cirugia Robotica, n.d.).

**2. Síntomas Principales y Calidad de Vida**

Los síntomas clínicos más comunes de la EMT incluyen dismenorrea (dolor menstrual intenso), dispareunia (dolor durante las relaciones sexuales), dolor pélvico crónico e infertilidad. La dismenorrea en casos severos puede prolongarse más allá del período menstrual, y la dispareunia suele estar

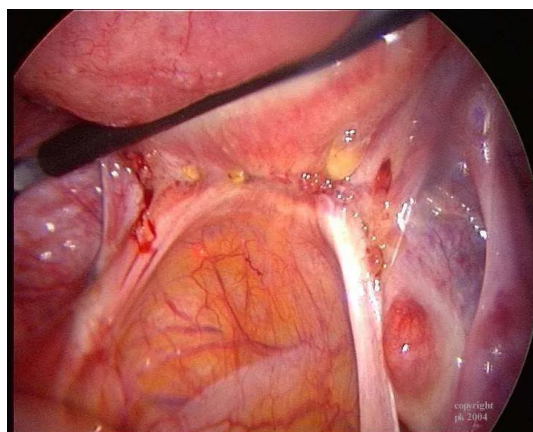


asociada con lesiones profundas en el tabique rectovaginal y fondo de saco posterior (Chauhan et al., 2022).

Las mujeres con EMT experimentan una reducción significativa en su calidad de vida debido a los síntomas comentados. Particularmente la dismenorrea y la infertilidad, tienen un profundo impacto negativo en la calidad de vida, las interacciones sociales y el bienestar sexual de las pacientes. Se estima que afecta aproximadamente al 2-10% de la población general, a casi el 40% de las mujeres infértiles y a más del 60% de aquellas con dolor pélvico crónico (Sardo et al., 2025).

### **3. Diagnóstico de la Endometriosis**

El diagnóstico de la EMT sigue siendo un gran desafío debido a la inespecificidad de los síntomas y la falta de marcadores diagnósticos no invasivos. Actualmente, el diagnóstico definitivo se realiza mediante laparoscopia (**Figura 2**), que permite la visualización directa y la confirmación histológica de las lesiones endometriales ectópicas. Sin embargo, se trata de una técnica invasiva que no resulta adecuada como método de detección rutinaria (Chauhan et al., 2022). Además, muchas pacientes experimentan un retraso diagnóstico de entre 7 y 10 años, debido en parte a la normalización del dolor menstrual y la escasa formación médica específica.



**Figura 2.** Vista laparoscópica de lesiones de endometriosis. Se muestran tanto lesiones superficiales, de color blanquecino o rojizo, como lesiones más profundas, junto con adherencias peritoneales (Endometriosis Images and Severity - Gynsurgery.Org, n.d.)

#### **4. Limitaciones de los Métodos Diagnósticos Actuales**

Aunque la laparoscopia es considerada el estándar de oro para el diagnóstico de EMT, sus características invasivas y sus costes asociados limitan su uso. En muchos casos, las mujeres optan por terapias paliativas en lugar de someterse a cirugía. Adicionalmente, no todos los implantes endometriósicos son visibles o accesibles quirúrgicamente, lo cual puede conducir a falsos negativos. Por ello, La naturaleza invasiva de la laparoscopia y el retraso en el diagnóstico subrayan la necesidad imperativa del desarrollo de biomarcadores de diagnóstico no invasivos (Chauhan et al., 2022).

#### **5. Necesidad de Biomarcadores no Invasivos**

La búsqueda de un biomarcador no invasivo para la EMT ha sido un problema constante y desafiante. Existe una necesidad reconocida de un biomarcador de diagnóstico para la EMT, y es más probable que sea en realidad un grupo de biomarcadores, en lugar de uno solo, y así ofrezca un mejor rendimiento diagnóstico y minimice los falsos positivos y negativos (Sardo et al., 2025).

Dado el retraso diagnóstico y la naturaleza invasiva de la laparoscopia, se plantea como urgente la identificación de biomarcadores no invasivos que permitan una detección precoz y fiable. Estos marcadores podrían derivarse de sangre, líquido peritoneal, orina u otros fluidos biológicos. Sin embargo, su desarrollo se enfrenta a importantes desafíos técnicos y clínicos, principalmente por la heterogeneidad de la enfermedad y las posibles interferencias debidas a comorbilidades inmunológicas e inflamatorias que presentan muchas pacientes (Chauhan et al., 2022).

#### **6. Papel del Microambiente Inflamatorio e Influencia Hormonal**

La fisiopatología de la EMT implica una compleja interacción entre factores hormonales, inmunológicos y genéticos. La enfermedad es altamente dependiente del estrógeno, que promueve el crecimiento y mantenimiento del tejido ectópico (Chauhan et al., 2022). Al mismo tiempo, se sabe que la disfunción inmune y la inflamación desempeñan un papel en su patobiología. Se ha documentado el aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias en el

líquido peritoneal, el endometrio eutópico y las muestras de lesiones ectópicas, así como en la sangre de mujeres con EMT. Sin embargo, no está del todo claro si la inflamación contribuye a la patogénesis del establecimiento de las lesiones endometrióticas o es un subproducto del proceso. Esta respuesta inmunitaria alterada se ha observado que no solo favorece la supervivencia de las células endometriales ectópicas, sino que también está relacionada con el dolor crónico y la infertilidad (Ahn et al., 2017).

La dependencia de la EMT del estrógeno para el crecimiento es quizás el único aspecto de su patogénesis que se aborda terapéuticamente de manera científicamente y clínicamente probada, cuya supresión ha tenido cierto éxito. En este contexto inflamatorio, los biomarcadores no invasivos con alta especificidad y sensibilidad presentan un desafío, ya que las comorbilidades que sufren las pacientes con EMT también pueden tener mecanismos patológicos inmunológicos e inflamatorios subyacentes (Ahn et al., 2017).

La búsqueda de un biomarcador no invasivo para la EMT ha sido un problema constante y desafiante. Existe una necesidad reconocida de un biomarcador de diagnóstico para la EMT, y es más probable que un grupo de biomarcadores, en lugar de uno solo, ofrezca un mejor rendimiento diagnóstico y minimice los falsos positivos y negativos (Ahn et al., 2017).

**Capítulo 2: RNAs no codificantes**

Es muy importante hablar acerca del papel de los RNA no codificantes (ncRNAs) ya que se ha observado que la mayor parte del DNA humano que se transcribe en RNA, no codifica proteínas y durante mucho tiempo se pensó que era información genética basura, pero estudios recientes han demostrado que no es así.

Los RNA no codificantes desempeñan un papel crucial en lo que se refiere a la regulación del ciclo celular. Además, los miRNAs son capaces de regular las redes moleculares que contribuyen a las vías clave propuestas en la fisiopatología de la EMT, como la inflamación, la angiogénesis, la reparación tisular y la matriz extracelular de las que hablaremos más adelante (Agrawal et al., 2018). Dada la importancia de los ncRNA será un tema muy interesante que tratar en nuestra investigación y definiremos su función, mecanismo regulador e incluso el potencial terapéutico en la EMT.

**7. RNAs no codificantes (ncRNAs)**

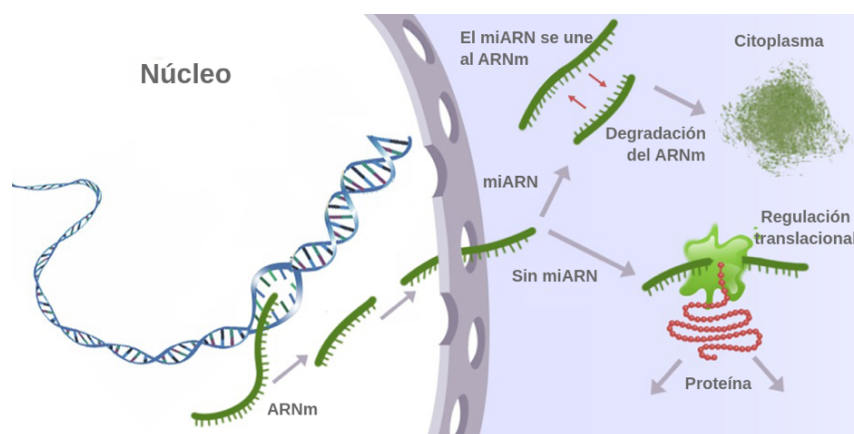
Las moléculas de RNA tradicionalmente se han entendido principalmente como intermediarios en la traducción de la información genética del DNA a proteínas. Sin embargo, una proporción significativa del genoma se transcribe en moléculas de RNA que no codifican proteínas funcionales. Estas son las conocidas como RNAs no codificantes (ncRNAs).

Los ncRNAs desempeñan una amplia gama de roles biológicos y se clasifican generalmente según su tamaño. Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) tienen más de 200 nucleótidos de longitud, mientras que los RNAs cortos no codificantes (sncRNAs) son más pequeños. Los microRNAs (miRNAs) son un tipo prominente de sncRNAs y en este caso son los protagonistas de nuestra investigación (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

### 7.1. *Micro RNA (miRNAs)*

Son un tipo de RNA no codificante endógenos y pequeños de aproximadamente 19-24 nt de longitud. Los miRNA se une a una secuencia complementaria de RNAm diana en su región 3'UTR y posteriormente regulan la actividad del RNA (Yan & Bu, 2021).

Los miRNA pueden regular múltiples RNAm diana que están implicados en el control de muchos procesos biológicos como lo son la apoptosis, la reparación de los daños del DNA, la proliferación celular, el ciclo de la senescencia, la invasividad y la angiogénesis. En general se ha visto que los miRNA actúan de dos formas posibles: degradación del RNAm (**Figura 3**) o por la inhibición de la traducción a través de las acciones del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Yan & Bu, 2021).



**Figura 3.** Representación gráfica del modo de acción del miRNA. Se observa como ante la presencia de un miRNA se une al RNAm y produce la degradación. Sin embargo, en ausencia del miRNA el RNAm se traduce a una proteína funcional (Micro-ARN - Labster, n.d.).

Una característica notable de los miRNAs es su presencia y estabilidad en una variedad de fluidos corporales, como sangre (suero y plasma), orina, saliva, líquido folicular, líquido seminal y leche materna (Agrawal et al., 2018). Su estabilidad se debe a que son liberados empaquetados en vesículas extracelulares (exosomas) o unidos a complejos de ribonucleoproteínas con proteínas como Argonaute, lo que los protege de la degradación por RNAsas presentes en estos fluidos. Esta característica los convierte en candidatos atractivos para biomarcadores no invasivos (Agrawal et al., 2018).

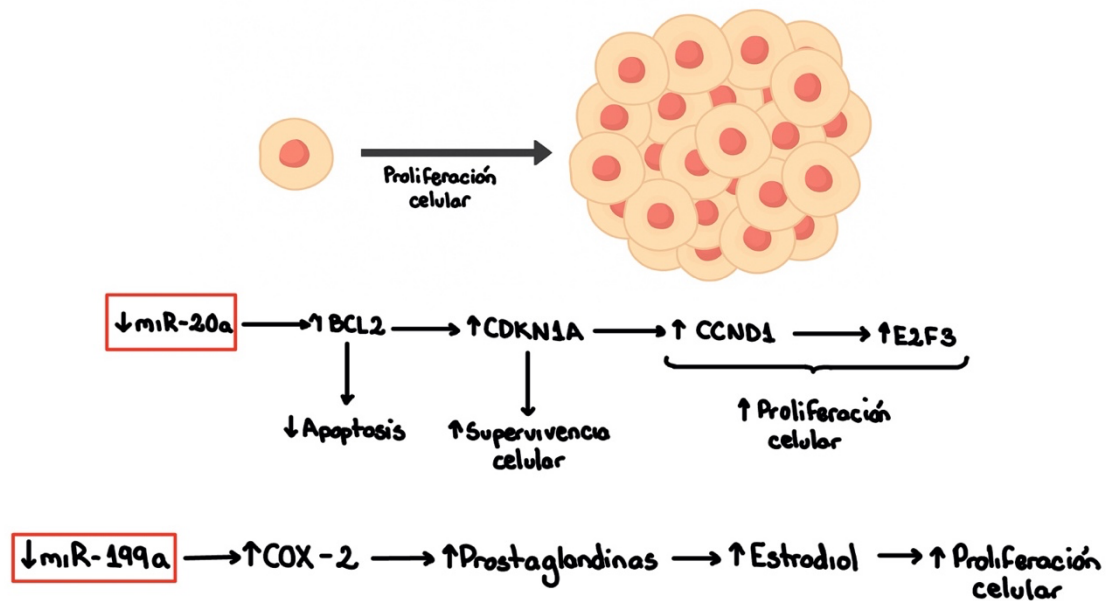
## **8. Mecanismos de Influencia de los miRNAs en la Patogénesis de la Endometriosis**

La EMT es una enfermedad compleja con una presentación fenotípica y sintomática variable en las mujeres (Ahn et al., 2017a). Se ha documentado que el endometrio de mujeres con EMT responde de manera diferente a las hormonas ováricas, por ello, se está empezando a dilucidar los mecanismos genéticos y epigenéticos que contribuyen a la patogénesis de la EMT (Ahn et al., 2017). Al ser los miRNAs los reguladores maestros de diversos procesos celulares estudiaremos por apartados las funciones que estos cumplen de cara a la EMT.

### **8.1. Proliferación Celular**

Las células endometriales ectópicas exhiben características de células malignas, como la invasividad, una alta tasa de proliferación y la capacidad de metástasis. Los miRNAs desempeñan un papel crucial en la regulación de la proliferación celular:

- **miR-20a**: El miR-20a, regulado a la baja en la endometriosis (**Tabla 1**), participa en la patogénesis de la enfermedad al modular genes clave relacionados con la apoptosis y la proliferación celular, como BCL2, CDKN1A/p21, CCND1 y E2F3, favoreciendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas (**Figura 4**) (Agrawal et al., 2018).
- **miR-199a**: La disminución de la expresión de miR-199a también promueve la producción de COX-2 y la proliferación celular (**Tabla 1**) (**Figura 4**) (Agrawal et al., 2018).

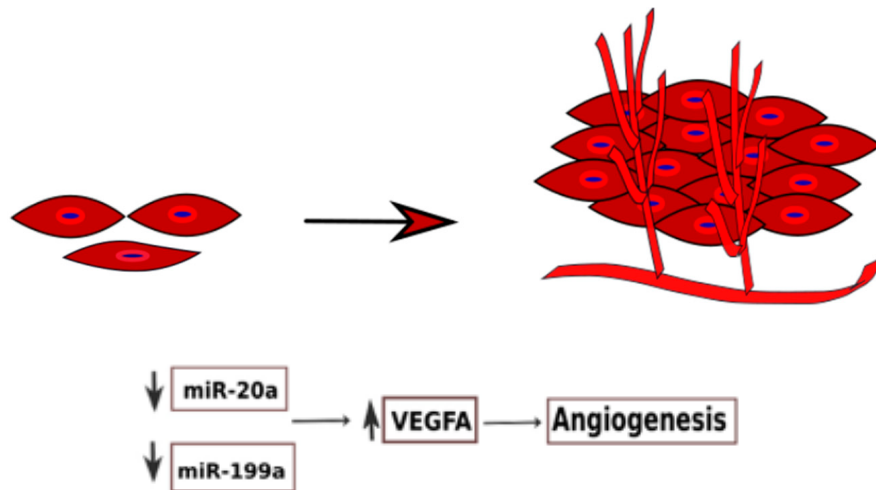


**Figura 4.** La disminución de miR-20a y miR-199a en endometriosis favorece la proliferación celular y la supervivencia de las lesiones, al regular genes asociados con la apoptosis (BCL2, CDKN1A, CCND1, E2F3) y aumentar la expresión de COX-2, con la consecuente producción de prostaglandinas y estradiol (Imagen propia).

## 8.2. Angiogénesis

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos, es un proceso fundamental para el establecimiento y crecimiento de las lesiones de EMT, que requieren un suministro sanguíneo para sobrevivir y proliferar.

- **miR-20a:** La regulación a la baja de miR-20a está asociada con la angiogénesis (**Tabla 1**). Este miRNA apunta a un aumento de VEGFA (factor de crecimiento endotelial vascular A), un elemento clave en la promoción de la angiogénesis (Agrawal et al., 2018).
- **miR-199a:** Se ha demostrado que la regulación a la baja de miR-199a aumenta la traducción de VEGF-A (**Tabla 1**), lo que lleva a su sobreexpresión y a la mejora de la capacidad invasiva de las células endometriales, facilitando así la angiogénesis (Agrawal et al., 2018).



**Figura 5.** Participación de los miRNAs en la angiogénesis y proliferación celular en endometriosis. La regulación a la baja de miR-20a y miR-199a conduce a un aumento de la expresión de VEGFA, favoreciendo la angiogénesis que sostiene el crecimiento de las lesiones endometriósicas (Agrawal et al., 2018).

### 8.3. Inflamación

La EMT es una enfermedad inflamatoria crónica impulsada por estrógenos (Ahn et al., 2017). Se ha documentado la presencia de niveles elevados de citocinas proinflamatorias en el líquido peritoneal, el endometrio eutópico (tejido normal dentro del útero) y las muestras de lesiones ectópicas, así como en la sangre de mujeres con EMT (Ahn et al., 2017).

- **miR-20a:** La regulación a la baja de miR-20a conduce a un aumento de las concentraciones de citocinas como TGF- $\beta$  (**Tabla 1**) (factor de crecimiento transformante beta). Estas citocinas, a su vez, promueven un ambiente inflamatorio y la reparación tisular, contribuyendo al crecimiento de las lesiones endometriósicas (Agrawal et al., 2018).
- **miR-199a:** La regulación a la baja de miR-199a se asocia con un aumento en la expresión de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) y la producción de interleucina 8 (IL-8), lo que mejora la capacidad invasiva de las células endometriales y contribuye a la inflamación (**Tabla 1**) (Agrawal et al., 2018).



Es importante señalar que la inflamación puede ser tanto una causa como una consecuencia de la EMT, y muchos de los miRNAs desregulados en la EMT también lo están en otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, lo que plantea desafíos para su uso como biomarcadores específicos (Ahn et al., 2017).

**Tabla 1.** Se muestran los principales miRNAs alterados en pacientes con endometriosis, indicando su expresión, tejidos de estudio y procesos fisiopatológicos implicados (tabla propia).

miRNA	Expresión en EMT	Tejido/fluido estudiado	Genes/Proteínas diana	Función en EMT (proceso alterado)	Referencias
miR-20a	↓	Plasma, suero, endometrio	BCL2, CDKN1A/p21, CCND1, VEGFA, TGF-β	+ Proliferación, - Apoptosis, inflamación, angiogénesis, TEM	Agrawal 2018; Jia 2013
miR-17-5p	↓	Plasma, tejido	Clúster miR-17-92	Proliferación y angiogénesis	Jia 2013
miR-199a	↓	Endometrio ectópico, endometrioma	COX-2, VEGFA, NF-κB, IL-8	Proliferación, angiogénesis e inflamación	Ahn 2017; Agrawal 2018
Familia miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-141)	↓	Plasma, endometrio ectópico	ZEB1, ZEB2 (represores de E-cadherina)	Induce EMT, migración e invasión celular	Rekker 2015
miR-30c-5p	↑	Suero	Genes en neurogénesis, cáncer	Dolor crónico, proliferación, biomarcador diagnóstico	Chico-Sordo 2024
miR-145	↑ (variable)	Plasma, tejido	FND3B	Invasión y motilidad celular	Bashti 2018
miR-29c	↑	Endometrio eutópico	FKBP4	Resistencia a la progesterona	Ahn 2017
miR-135a	Regula ↓HOXA10	Endometrio eutópico	HOXA10	Implantación embrionaria, regulación hormonal	Ahn 2017

### 9. Resistencia Hormonal (Resistencia a la Progesterona y Dependencia de Estrógenos)

La EMT es una enfermedad dependiente de estrógenos. El endometrio eutópico de las mujeres con EMT ha mostrado una respuesta aberrante a las hormonas ováricas (Ahn et al., 2017).

- **Endometrio Eutópico y Cambios Epigenéticos:** El endometrio eutópico de pacientes con EMT muestra patrones de expresión molecular aberrantes debido a cambios epigenéticos en genes sensibles a las hormonas esteroideas. Por ejemplo, se ha observado una hipometilación en genes como TNFRSF1B, IGSF21 y TP73 (Ahn et al., 2017).
- **HOXA10:** Este gen está implicado en el proceso de implantación embrionaria y se ha demostrado que su expresión disminuye en el endometrio eutópico de babuinos con EMT debido a la hipermetilación de su región promotora. El miR-135a se ha identificado como regulador de la expresión de HOXA10 (Ahn et al., 2017).
- **Resistencia a la Progesterona:** Una característica clave del endometrio eutópico en la EMT, especialmente en etapas moderadas a graves, es la resistencia a la progesterona. Esta falta de respuesta a la progesterona resulta en una transición incompleta de la fase proliferativa a la fase secretora del ciclo uterino. Esta característica también se comparte con la adenomiosis, otra afección uterina (Ahn et al., 2017).
- **miR-29c y FKBP4:** Se ha demostrado que el aumento de la expresión de miR-29c modula la resistencia a la progesterona endometrial. La interacción entre miR-29c y FKBP4 (una proteína de unión a FK506) es un ejemplo de cómo los miRNAs pueden influir en la respuesta hormonal, ya que el FKBP4 es regulado por HOXA10 durante la decidualización en la EMT (Ahn et al., 2017).

La presencia de focos endometriósicos ectópicos puede influir directamente en el patrón de expresión génica del endometrio eutópico. Se propone que esta "intercomunicación" programa una mayor respuesta a los estrógenos y resistencia a la progesterona en el endometrio eutópico a medida que la enfermedad progresa (Ahn et al., 2017).

**Capítulo 3: MicroRNAs como Biomarcadores y Dianas Terapéuticas**

Numerosos estudios han investigado la desregulación de miRNAs en la circulación y en tejidos de mujeres con endometriosis, buscando identificar biomarcadores no invasivos o mínimamente invasivos para facilitar el diagnóstico de la EMT. Sin embargo, los resultados han sido a menudo inconsistentes, lo que subraya la necesidad de una mayor estandarización y validación (Agrawal et al., 2018).

**10. Evaluación Sistemática de miRNAs Circulantes como Biomarcadores de Endometriosis**

Una revisión sistemática reciente estudió el papel de los miRNAs circulantes en la endometriosis y determinó si podrían ser biomarcadores no invasivos para diagnosticar la enfermedad. La búsqueda abarcó tres bases de datos (PubMed, EMBASE y BIOSIS) para identificar literatura relevante publicada entre 1996 y 2017. Se incluyeron solo artículos de investigación originales en inglés, con un tamaño de muestra superior a 20 individuos por grupo (Agrawal et al., 2018).

La revisión analizó críticamente nueve estudios, que en total incluyeron a 357 pacientes con endometriosis y 255 mujeres sin la enfermedad. Los controles fueron mujeres que se sometieron a laparoscopia por diversas indicaciones ginecológicas y no se encontró que tuvieran endometriosis (Agrawal et al., 2018). La calidad de los estudios se evaluó utilizando la herramienta QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies), y las puntuaciones oscilaron de moderadas a altas para todos los estudios incluidos. Los tipos de muestras analizadas fueron suero en cinco estudios y plasma en los cuatro restantes. En cuanto a la etapa de la enfermedad, tres artículos incluyeron pacientes con endometriosis en estadio III-IV, uno consideró estadios leves a moderados (I-II), mientras que el resto incluyó pacientes de todas las etapas (Agrawal et al., 2018).

A pesar de los numerosos estudios, la revisión reveló que 42 miRNAs diferentes estaban desregulados, pero solo un miRNA común, miR-20a, se expresó diferencialmente en más de un estudio en la misma dirección. Se encontraron 21

miRNAs sobreexpresados y 21 subexpresados en mujeres con endometriosis en comparación con los controles (Agrawal et al., 2018). La falta de un consenso estadístico y la inconsistencia entre los estudios sobre los miRNAs desregulados impidieron una evaluación estadística completa. Esta inconsistencia destaca la necesidad de estudios de validación sistemáticos más grandes y bien controlados, con uniformidad en los enfoques de investigación y que involucren a diversas poblaciones. La disparidad en los resultados de los biomarcadores de miRNA circulantes puede deberse a la falta de estandarización en los protocolos de estudio, como la recolección de muestras, el procesamiento, las técnicas utilizadas y los controles de normalización.

### ***11. MiRNAs Específicos Propuestos como Biomarcadores en Endometriosis: Análisis en Sangre y Líquido Peritoneal***

La identificación de miRNAs circulantes en sangre (plasma y suero) ha sido un área de investigación activa debido a la naturaleza no invasiva de la obtención de muestras.

#### ***11.1. miRNAs en plasma***

• **miR-20a y miR-17-5p:** miR-20a fue el único miRNA circulante que mostró una subregulación concordante en más de un estudio (Jia et al., 2013) informaron una disminución de 4.53 veces en los niveles de miR-20a en plasma de pacientes con endometriosis y también se encontró subregulado en el tejido endometriótico y el plasma de mujeres con EMT (Agrawal et al., 2018) (**Tabla 2**). Ambos miRNAs, miR-20a y miR-17-5p, forman parte del clúster miR-17-92 y desempeñan un papel importante en la etiopatogénesis de la endometriosis, influyendo en la angiogénesis, la proliferación celular y la transición epitelial-mesenquimal (TEM).

Una baja expresión de miR-20a puede conducir a un aumento de la inflamación y la angiogénesis al potenciar la expresión de HIF1A (factor inducible por hipoxia 1 alfa), COX-2 (ciclooxigenasa-2) y VEGFA (factor de crecimiento endotelial

vascular), así como promover la TEM al aumentar TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) (Agrawal et al., 2018).

- **Familia miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-141):** Estos miRNAs se han encontrado desregulados en múltiples estudios, tanto en tejido como en sangre de pacientes con endometriosis (Agrawal et al., 2018), en donde informaron niveles significativamente más bajos de los tres miRNAs en el plasma de pacientes con endometriosis (Rekker et al., 2015). La familia miR-200 juega un papel crucial en la EMT, un proceso fundamental en la patogénesis de la endometriosis, al regular recíprocamente a los represores transcripcionales ZEB1 y ZEB2, que a su vez inhiben la expresión de E-cadherina, una proteína clave en la adhesión celular. La subregulación de miR-200b induce la EMT, promoviendo la capacidad de las células endometriales de invadir y migrar (**Tabla 2**).

- **miR-31 y miR-145:** Investigadores involucrados en el estudio (Bashti et al., 2018) encontraron una menor expresión de miR-31 y una mayor expresión de miR-145 en plasma de mujeres con endometriosis, aunque la expresión de miR-145 varió con la etapa de la enfermedad. La detección de estos miRNAs podría servir como biomarcadores reguladores no invasivos (**Tabla 2**) (Agrawal et al., 2018).

### **11.1. miRNAs en Suero**

- **miR-30c-5p:** Un estudio reciente identificó que los niveles circulantes de miR-30c-5p eran significativamente más altos en el suero de mujeres diagnosticadas con endometriosis por laparoscopia en comparación con mujeres sanas. Este miRNA demostró un potencial diagnóstico notable. Además, la expresión de miR-30c-5p se mantuvo estable y no se vio afectada por la fase del ciclo menstrual, lo cual es una ventaja importante para un biomarcador. La desregulación de miR-30c-5p se ha asociado con vías moleculares relacionadas con el cáncer y procesos neuronales, incluyendo la neurogénesis, diferenciación neuronal y la guía axonal (**Tabla 2**) (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

- **miR-125b-5p, miR-150-5p, miR-342-3p, y miR-451a:** Estos miRNAs mostraron niveles significativamente aumentados en el suero de pacientes con endometriosis en comparación con los controles. En la investigación identificaron estos miRNAs como posibles biomarcadores (Cosar et al., 2016).
- **miR-3613-5p y let-7b:** En contraste, estos dos miRNAs presentaron niveles significativamente más bajos en el grupo de endometriosis en suero (Moustafa et al., 2020).
- **Desafíos en la estandarización de estudios con suero:** A pesar de la prometedora investigación, existe una gran variabilidad en los miRNAs reportados como candidatos a biomarcadores de endometriosis en suero, incluso cuando se utilizan técnicas similares (Chico-Sordo et al., 2024). Esto se debe principalmente a las diferencias en los controles endógenos utilizados para la normalización de datos (siendo U6snRNA un control común pero no recomendado para miRNAs circulantes debido a su variabilidad), y en la forma de abordar la hemólisis de la muestra. MiR-451a, por ejemplo, está altamente expresado en eritrocitos y se utiliza para detectar la hemólisis, lo que podría confundir su papel como biomarcador directo de endometriosis. Controlar la hemólisis es crucial para garantizar la fiabilidad del biomarcador (Chico-Sordo et al., 2024).

### ***11.2 miRNAs en Tejido Endometrial y Líquido Peritoneal***

El endometrio es un órgano fundamental para la fertilidad en el sistema reproductivo femenino, y su perfil de miRNA puede variar dependiendo de la fase del ciclo menstrual, la receptividad endometrial o en situaciones de fallo de implantación (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024). La biopsia endometrial es una herramienta mínimamente invasiva para obtener muestras de tejido.

- **miR-199a:** Se encontró significativamente subregulado en el endometrio ectópico y los endometriomas ováricos en comparación con el endometrio eutópico y los controles (Agrawal et al., 2018). Este miRNA regula negativamente la expresión de VEGF-A, por lo que su subregulación aumentaría la traducción

de VEGF-A, promoviendo la angiogénesis. También influye en la vía I $\kappa$ B kinase- $\beta$  (IKBK $\beta$ )/NF- $\kappa$ B, aumentando la producción de IL-8, lo que podría mejorar la capacidad invasiva de las células endometriales (**Tabla 2**) (Ahn et al., 2017).

• **miR-143-3p y miR-145-5p:** Estos forman un clúster y se encuentran sobreexpresados en suero y tejido en varios estudios. miR-143 se dirige a FNDC3B (**Tabla 2**) (fibronectina tipo III que contiene 3B), que regula la motilidad celular. Un aumento en la expresión de miR-143 reprime la transcripción de FNDC3B, lo que promovería la invasión y migración celular en la endometriosis (Agrawal et al., 2018).

• **miR-200 familia:** Al igual que en plasma, se ha encontrado que esta familia de miRNAs (miR-200a, miR-200b, miR-141) está subregulada en el endometrio ectópico, lo que respalda su papel en la EMT y la invasividad de las células endometriales (**Tabla 2**) (Agrawal et al., 2018).

• **miR-30a y miR-93:** Se han detectado con una mayor expresión en el tejido endometrial de mujeres con endometriosis (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

• **miR-143 y miR-203a-3p, miR-126-5p, miR-202-3p, miR-424-5p, miR-449b-3p, y miR-556-3p:** Estos miRNAs han mostrado niveles más bajos en el tejido endometrial de pacientes con endometriosis (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

En cuanto al líquido peritoneal, también es una muestra de interés para el estudio de miRNAs en endometriosis (Ahn et al., 2017). Los miRNAs circulantes pueden ser liberados por células dañadas tras su muerte o la interrupción de la integridad celular, o pueden ser secretados activamente para la comunicación intercelular (Agrawal et al., 2018).

**Tabla 2.** Principales miRNAs desregulados en endometriosis según diferentes tipos de muestra (plasma, suero y tejido). La tabla resume sus alteraciones de expresión y funciones asociadas, destacando su potencial como biomarcadores diagnósticos y terapéuticos (tabla propia).

Muestra	miRNAs principales	Alteración	Función / Relevancia
Plasma	miR-20a, miR-17-5p	↓	Inflamación, angiogénesis, EMT (HIF1A, VEGFA, TGF-β).
	Familia miR-200 (200a, 200b, 141)	↓	Regulan ZEB1/ZEB2 y E-cadherina; invasión celular.
	miR-31	↓	Posible biomarcador diagnóstico.
	miR-145	↑	Asociado a progresión de la enfermedad.
Suero	miR-30c-5p	↑	Biomarcador estable (AUC 0.84); vías oncológicas y dolor.
	miR-125b-5p, miR-451a, miR-3613-5p	↑	Panel diagnóstico (AUC 0.94). Atención a hemólisis.
	let-7b, miR-3613-5p	↓	Potenciales marcadores diferenciales.
Tejido End / LP	miR-199a	↓	Regula VEGF-A, NF-κB/IL-8; angiogénesis.
	miR-143, miR-145	↑	Regulan motilidad celular (FNDC3B).
	miR-200 fam., miR-203a, miR-126, otros	↓	Favorecen EMT, adhesión e invasión.

## 12. Sensibilidad y Especificidad como Herramientas Diagnósticas y Desafíos

A pesar del progreso en la investigación de miRNAs, ningún miRNA individual ni ningún panel de ellos ha demostrado cumplir los criterios de un biomarcador diagnóstico con suficiente sensibilidad y especificidad para su uso clínico generalizado (Agrawal et al., 2018). La heterogeneidad en las características de la enfermedad y la presentación variable de los síntomas, así como la presencia de comorbilidades, representan desafíos significativos para la especificidad de los biomarcadores (Ahn et al., 2017).

Las pacientes con endometriosis a menudo presentan una alta incidencia de trastornos autoinmunes y endocrinos, fatiga crónica, alergias y problemas gastrointestinales (Ahn et al., 2017). Estas condiciones pueden implicar



mecanismos patológicos inmunológicos e inflamatorios subyacentes con un aumento periférico de citocinas, lo que podría introducir sesgos en los estudios que utilizan citocinas periféricas como indicadores diagnósticos (Ahn et al., 2017).

### ***13. Uso en la Monitorización de la Progresión de la Enfermedad y Estrategias Terapéuticas Emergentes***

Más allá del diagnóstico, los miRNAs tienen el potencial de ser valiosos para evaluar el pronóstico y monitorear el tratamiento (Agrawal et al., 2018). Aunque la mayoría de los estudios actuales se centran en el diagnóstico, la capacidad de diferenciar entre los estadios III y IV de la enfermedad de los grupos control, como se observó con miR-30c-5p, sugiere un posible papel en la monitorización de la gravedad (Chico-Sordo et al., 2024). Sin embargo, en estudios recientes, las diferencias entre los estadios leves (I/II) y moderados/severos (III/IV) de la endometriosis no siempre fueron estadísticamente significativas para todos los miRNAs evaluados, lo que podría reflejar las limitaciones del propio sistema de clasificación ASRM (American Society of Reproductive Medicine). Los niveles de miRNAs en suero no se ven significativamente alterados por el uso de terapias hormonales o la fase del ciclo menstrual, lo que los hace adecuados para el monitoreo a largo plazo. Estudios futuros y longitudinales son necesarios para determinar cómo estos biomarcadores cambian con el tiempo en respuesta a tratamientos médicos o quirúrgicos eficaces (Chico-Sordo et al., 2024).

Las características de los miRNAs como reguladores maestros de la expresión génica también los convierten en prometedoras dianas terapéuticas (Agrawal et al., 2018). Al modular la expresión de miRNAs, ya sea mediante la introducción de mimicos para aumentar sus niveles o de inhibidores para reducirlos, se pueden revertir los efectos patológicos asociados a su desregulación (Agrawal et al., 2018). Las estrategias terapéuticas emergentes que buscan modular la expresión de miRNAs para tratar la EMT incluyen:

- **Modulación de miR-20a y miR-17-5p:** Dado su papel en la promoción de la inflamación, angiogénesis y proliferación celular en la endometriosis, aumentar

sus niveles (si están subregulados) o inhibir sus vías de señalización podría mitigar estos procesos (**Tabla 3**) (Agrawal et al., 2018).

• **Modulación de la familia miR-200:** Al ser crucial para la EMT, que es un proceso clave en la invasividad y metástasis de las células endometriales, restaurar sus niveles o regular su expresión podría inhibir la progresión de la enfermedad (Tabla 3) (Agrawal et al., 2018).

• **Modulación de miR-199a:** Su subregulación contribuye a la sobreexpresión de VEGF-A y la activación de vías proinflamatorias (NF-κB/IL-8) que aumentan la capacidad invasiva de las células endometriales. Aumentar los niveles de miR-199a podría contrarrestar estos efectos (**Tabla 3**) (Agrawal et al., 2018).

• **Modulación de miR-30c-5p:** Dado su papel en vías relacionadas con el cáncer (como la evasión de la apoptosis y la proliferación) y procesos neuronales (relacionados con el dolor crónico), el estudio de su modulación podría abrir vías para tratamientos dirigidos tanto a la progresión de la enfermedad como al manejo del dolor. Las diferencias en los niveles de miR-30c-5p entre la endometriosis y el cáncer podrían indicar un papel en la activación o no del proceso de malignización celular, lo que podría permitir su uso como herramienta de diagnóstico diferencial (**Tabla 3**) (Chico-Sordo et al., 2024). Además, su implicación en la nocicepción y el dolor neuropático sugiere que modular miR-30c-5p podría ser una estrategia para aliviar el dolor asociado a la endometriosis (**Tabla 3**) (Chico-Sordo et al., 2024).

***Tabla 3.** Estrategias de modulación de miRNAs en endometriosis. Resume los principales miRNAs alterados y las intervenciones propuestas para regular su expresión con fines terapéuticos (tabla propia).*

miRNA	Alteración en EMT	Estrategia de modulación	Efecto esperado
miR-20a, miR-17-5p	Subregulados	Aumentar niveles o inhibir sus vías	Reducir inflamación, angiogénesis y proliferación.
Familia miR-200 (200a, 200b, 141)	Subregulados	Restaurar expresión	Inhibir EMT e invasividad celular.

miRNA	Alteración en EMT	Estrategia de modulación	Efecto esperado
miR-199a	Subregulado	Incrementar niveles	Disminuir VEGF-A, NF-κB/IL-8 → menor angiogénesis e inflamación.
miR-30c-5p	Sobreexpresado	Regular niveles	Control de proliferación, apoptosis y dolor neuropático; posible diagnóstico diferencial con cáncer.

Los desafíos para la terapia con miRNAs incluyen la estabilidad de los miRNAs in vivo, la entrega precisa al tejido u órgano diana (evitando efectos fuera de objetivo y reacciones inmunes adversas), y la minimización de la degradación en el torrente sanguíneo. El desarrollo de sistemas de administración como vectores virales o nanopartículas es fundamental para asegurar que los miRNAs lleguen al órgano deseado (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

14. Conclusiones y Direcciones Futuras

Los miRNAs han surgido como moléculas cruciales en la regulación post-transcripcional y representan candidatos prometedores para el desarrollo de biomarcadores no invasivos y nuevas estrategias terapéuticas para la endometriosis (Agrawal et al., 2018). La identificación de perfiles de miRNAs desregulados en fluidos circulantes como el suero y el plasma, así como en el tejido endometrial, ha profundizado nuestra comprensión de la patofisiología de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de los avances significativos, la falta de consenso y reproducibilidad entre los estudios actuales es un obstáculo importante para la traslación clínica. Esto resalta la necesidad imperiosa de realizar estudios de validación a gran escala y multicéntricos, con una metodología estandarizada en la recolección, procesamiento y análisis de las muestras (incluyendo controles de calidad para la extracción, retro-transcripción y hemólisis). La implementación de directrices como las del WERF (World Endometriosis Research Foundation) y EPHeCT (Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation) es esencial para armonizar los protocolos de investigación (Agrawal et al., 2018).

En lugar de un solo biomarcador, es más probable que un panel de biomarcadores ofrezca un rendimiento diagnóstico mejorado y minimice los falsos positivos y negativos en el diagnóstico diferencial (Agrawal et al., 2018), especialmente considerando la naturaleza heterogénea de la endometriosis y sus comorbilidades (Ahn et al., 2017). Estudios futuros deberían centrarse en:

- El análisis detallado de la relación entre los niveles de miRNAs en suero y las diferentes etapas de la endometriosis, incluyendo los estadios tempranos (I y II), que a menudo son difíciles de diagnosticar (Ahn et al., 2017).
- La cuantificación de la variable dolor en los estudios, ya que los miRNAs también están implicados en los procesos neuronales y el dolor asociado a la endometriosis (Ahn et al., 2017).
- La investigación de las vías moleculares específicas en las que intervienen los miRNAs desregulados, lo que podría conducir a nuevas intervenciones terapéuticas (Agrawal et al., 2018).
- Estudios comparativos con otras condiciones ginecológicas y cancerosas para establecer la especificidad de los biomarcadores de miRNAs en la endometriosis (Agrawal et al., 2018).

La capacidad de diagnosticar la endometriosis de forma no invasiva podría acortar significativamente el retraso en el diagnóstico, lo que aliviaría el sufrimiento de las mujeres, reduciría la necesidad de cirugías invasivas, disminuiría los riesgos quirúrgicos y la carga para los sistemas de atención de la salud (Agrawal et al., 2018). La identificación temprana también podría influir en la toma de decisiones oportunas sobre problemas de fertilidad y permitir estrategias de prevención secundaria. Los miRNAs, aunque complejos, continúan siendo una esperanza para el futuro de los biomarcadores verdaderamente diagnósticos en la endometriosis, más allá del "miraje" actual (Agrawal et al., 2018).

**Capítulo 4:** *Metodologías y desafíos en la validación de miRNAs como biomarcadores clínicos*

El creciente interés en los miRNAs como posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la endometriosis ha puesto de relieve la necesidad de validar rigurosamente sus hallazgos antes de trasladarlos a la práctica clínica. Aunque numerosos estudios han descrito perfiles diferenciales de expresión y han señalado su utilidad potencial en diagnóstico, monitorización y tratamiento, la transición desde el laboratorio hasta la aplicación clínica requiere metodologías estandarizadas y sólidas que aseguren la reproducibilidad y la relevancia clínica de los resultados.

**15. Técnicas para la Investigación y Validación de miRNAs como Biomarcadores**

La identificación y validación de miRNAs como biomarcadores implica un proceso estructurado, generalmente dividido en tres fases principales: descubrimiento, validación y análisis funcional.

1. **Fase de Descubrimiento:** En esta fase, se realiza un cribado de perfiles de expresión de miRNAs para identificar los que están diferencialmente expresados entre los casos (pacientes) y los controles. Esto permite identificar el máximo número posible de miRNAs candidatos (Agrawal et al., 2018).
2. **Fase de Validación:** Los hallazgos de la fase de descubrimiento se corroboran utilizando técnicas más sensibles y específicas. Esta etapa es crucial para confirmar la relevancia clínica de los miRNAs identificados (Agrawal et al., 2018).
3. **Análisis Funcional:** Finalmente, se explora la relevancia funcional de los miRNAs y las relaciones miRNA-mRNA, a menudo utilizando análisis in silico (Agrawal et al., 2018).

Para llevar a cabo estas fases, se emplean diversas técnicas de perfilado de miRNAs:

- **Microarrays:** Son métodos basados en hibridación que se utilizan comúnmente como enfoque inicial para encontrar miRNAs candidatos potenciales en la fase de descubrimiento (Agrawal et al., 2018). Permiten el cribado de un gran número de miRNAs simultáneamente (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

- **PCR en tiempo real (qRT-PCR o RT-qPCR):** Debido a su alta precisión, exactitud y amplio rango, la qRT-PCR sigue siendo el estándar de oro para la cuantificación de miRNAs. Es la técnica más utilizada para validar los miRNAs altamente desregulados identificados por microarrays u NGS. La mayoría de los estudios analizados utilizan la qRT-PCR para la validación de miRNAs (Agrawal et al., 2018).

- **Secuenciación de última generación (NGS):** Las plataformas NGS permiten la secuenciación paralela de millones de fragmentos de DNA después de la transcripción inversa. Ofrecen alta sensibilidad, resolución y excelente reproducibilidad (Agrawal et al., 2018). El NGS es una alternativa para el análisis preliminar de miRNAs, permitiendo un cribado global y eliminando la necesidad de sondas de hibridación específicas de secuencia. Sin embargo, requieren un considerable soporte computacional y presentan variaciones significativas en el rendimiento entre diferentes plataformas (Agrawal et al., 2018).

## ***16. Desafíos en la Reproducibilidad y Estandarización de los Estudios de miRNAs en Endometriosis***

A pesar de los hallazgos prometedores, existen desafíos significativos que impiden el desarrollo de un biomarcador de miRNA no invasivo definitivo para la endometriosis (Agrawal et al., 2018). La falta de consistencia en los resultados entre diferentes estudios ha sido un obstáculo importante para la traducción de los hallazgos a la práctica clínica.

1. **Heterogeneidad de la enfermedad y los síntomas:** La endometriosis es una enfermedad compleja que se manifiesta en diversas ubicaciones y se asocia con un amplio espectro de síntomas y fenotipos (dolor, infertilidad, asintomática) (Ahn et al., 2017). Esta heterogeneidad dificulta la identificación de un conjunto específico de biomarcadores que puedan diferenciar con precisión los distintos tipos y grados de endometriosis (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024; Ahn et al., 2017). Los estudios a menudo no logran estratificar a los pacientes por subtipos de endometriosis o síntomas, lo que limita la aplicabilidad de los resultados .
2. **Inconsistencia de los resultados:** A pesar de numerosos estudios, no existe un único miRNA o un panel de miRNAs que cumpla con los criterios de un biomarcador diagnóstico (Agrawal et al., 2018). La falta de concordancia entre los diferentes estudios es notable, incluso con miRNAs que han sido ampliamente investigados:

- **miR-20a:** fue el único miRNA circulante que mostró una regulación a la baja consistente. Se observó su disminución en plasma y suero de pacientes con endometriosis (Agrawal et al., 2018).

- **miR-15b-5p y miR-199a:** presentan resultados contradictorios. El primero fue reportado como regulado al alza en un estudio y a la baja en otro; algo similar ocurre con miR-199a, cuya expresión en suero mostró direcciones opuestas según el estudio. Estas discrepancias reflejan la falta de reproducibilidad en la investigación (Agrawal et al., 2018).

- **miR-143 y miR-145:** también han sido explorados por su rol en la etiopatogénesis. En varios estudios se encontraron regulados al alza en suero y tejidos, aunque con resultados inconsistentes para miR-145, lo que limita su valor como biomarcador (Agrawal et al., 2018).

- **miR-30c-5p:** se ha destacado recientemente como un biomarcador prometedor en suero, mostrando niveles significativamente más altos en pacientes con endometriosis. Además, se mantuvo estable independientemente de la fase del

ciclo menstrual y permitió diferenciar estadios avanzados (III y IV) (Chico-Sordo et al., 2024) .

3. **Falta de estandarización en la metodología:** La disparidad en los protocolos de estudio es una limitación principal para la reproducibilidad (Agrawal et al., 2018).

• **Recolección y procesamiento de muestras:** La elección de suero o plasma, así como el manejo y almacenamiento, afectan los perfiles de miRNAs. La hemólisis es una fuente importante de error, por lo que debe controlarse (Agrawal et al., 2018).

• **Controles de normalización:** No existe consenso en la qRT-PCR. El U6snRNA, aunque usado, no es fiable en muestras circulantes. Se recomienda emplear dos o más miRNAs estables (ej. miR-30e-5p, miR-15b-5p) (Chico-Sordo et al., 2024).

• **Fase del ciclo menstrual:** Algunos estudios no hallan variaciones, pero otros sí muestran cambios en perfiles endometriales y sanguíneos según la fase o incluso la hora de la toma de muestra (Agrawal et al., 2018).

• **Tamaño de la muestra:** Muchos estudios iniciales tienen tamaños de muestra pequeños, lo que limita la generalización de los hallazgos y su reproducibilidad (Ahn et al., 2017).

### ***17. Implicaciones y Direcciones Futuras para la Implementación Clínica***

Para avanzar en este campo, es imperativo establecer procedimientos operativos estándar (SOPs) para la recolección, el procesamiento y el almacenamiento de muestras, así como para las técnicas de perfilado de RNA (Agrawal et al., 2018). Iniciativas como el EPHeCT buscan unificar la recolección de muestras y el registro de datos para facilitar una investigación global y colaborativa (Agrawal et al., 2018).



Solo con una mayor uniformidad en los enfoques de investigación y la inclusión de poblaciones diversas será posible establecer un panel de miRNAs que pueda diagnosticar la endometriosis de manera no invasiva con suficiente sensibilidad y especificidad (Agrawal et al., 2018). Se necesitan estudios de validación sistemáticos más grandes y bien controlados para superar las discrepancias actuales y sentar las bases para biomarcadores diagnósticos confiables y herramientas terapéuticas (Ahn et al., 2017).

Los miRNAs no solo prometen ser herramientas diagnósticas, sino que también podrían ser valiosos para evaluar el pronóstico y monitorizar el tratamiento, además de servir como importantes dianas terapéuticas en la endometriosis (Agrawal et al., 2018). La capacidad de diagnosticar la endometriosis de forma no invasiva podría acortar el tiempo hasta el diagnóstico, reducir el riesgo quirúrgico, los años de malestar, la progresión de la enfermedad, las comorbilidades asociadas y los costes sanitarios (Agrawal et al., 2018).

***Capítulo 5: Conclusiones e Implicaciones Clínicas de los miRNAs en la Endometriosis***

A lo largo de este trabajo hemos analizado de manera exhaustiva la literatura científica disponible sobre el papel de los miRNAs en la fisiopatología, diagnóstico y posible tratamiento de la endometriosis. Los resultados de esta revisión confirman que los miRNAs constituyen elementos centrales en la regulación de procesos biológicos claves de la enfermedad, como la inflamación, la angiogénesis, la proliferación celular y la resistencia hormonal (Ahn et al., 2017; Agrawal et al., 2018). Su expresión diferencial en fluidos biológicos como plasma, suero y líquido peritoneal, así como en tejido endometrial, los convierte en candidatos de gran interés como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y el seguimiento clínico.

***18. Discusión***

A pesar del considerable interés en los miRNAs como potenciales biomarcadores diagnósticos no invasivos para la endometriosis, la integración de los hallazgos actuales revela un panorama complejo. Solo el miR-20a ha mostrado una desregulación consistente (disminución) en plasma y suero en más de un estudio. Otros miRNAs como miR-15b-5p y miR-199a, aunque desregulados en múltiples estudios, presentan direcciones inconsistentes de expresión (Agrawal et al., 2018). La familia miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-141) también ha sido identificada como desregulada en varios estudios. Más recientemente, miR-30c-5p ha surgido como un candidato prometedor, mostrando niveles significativamente más altos en suero de pacientes con endometriosis, independientemente de la fase del ciclo menstrual o de la presencia de hemólisis (Chico-Sordo et al., 2024). Sin embargo, un estudio previo reportó niveles disminuidos de miR-30c-5p, lo que subraya la inconsistencia entre las investigaciones. Esta baja especificidad y la superposición con otras condiciones inflamatorias y autoinmunes, así como varios tipos de cáncer, recalcan la necesidad de paneles de biomarcadores en lugar de miRNAs individuales para lograr una capacidad diagnóstica robusta (Agrawal et al., 2018). Los vacíos de conocimiento son notables, derivados de la heterogeneidad y la falta de estandarización en el diseño de los estudios, las

poblaciones de pacientes (incluyendo las etapas de la enfermedad), los tipos de muestras (suero vs. plasma), los grupos de control, los controles endógenos de qRT-PCR, las plataformas de perfilado de miRNAs e incluso la hora de recolección de las muestras (Agrawal et al., 2018). La hemólisis, un factor crucial, también afecta los niveles de miRNAs circulantes y debe ser monitoreada. Enlazando con la hipótesis, se confirma parcialmente que los miRNAs circulantes son candidatos prometedores para biomarcadores no invasivos, con varios miRNAs individuales y paneles que muestran un alto potencial diagnóstico. No obstante, la falta de validación clínica a gran escala, la necesidad de estudios más amplios y bien controlados, y la uniformidad en los enfoques de investigación con poblaciones diversas siguen siendo barreras significativas que impiden su traducción a la práctica clínica rutinaria (Agrawal et al., 2018).

### **19. Viabilidad diagnóstica de los miRNAs**

Los estudios analizados muestran perfiles de desregulación de distintos miRNAs en pacientes con endometriosis en comparación con mujeres sanas, destacando la subregulación de miR-20a, miR-17-5p y de la familia miR-200 (Rekker et al., 2015; Jia et al., 2013). Estos hallazgos sugieren que un panel combinado de miRNAs podría mejorar la capacidad diagnóstica (Cosar et al., 2016). Sin embargo, la heterogeneidad de la enfermedad y la falta de estandarización metodológica en la recogida y procesamiento de muestras limitan su aplicabilidad clínica inmediata (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024).

Aunque algunos miRNAs individuales, como miR-30c-5p, han mostrado un potencial diagnóstico prometedor (Chico-Sordo et al., 2024), hasta la fecha ninguno ha alcanzado el nivel de validación requerido para sustituir a la laparoscopia como método diagnóstico estándar. Por ello, es más probable que el futuro del diagnóstico se centre en la integración de paneles de miRNAs junto con otros biomarcadores moleculares, clínicos e imagenológicos, en lugar de un único marcador aislado.

### **20. Implicaciones terapéuticas y monitorización clínica**

Además de su potencial diagnóstico, los miRNAs ofrecen un atractivo campo de estudio como dianas terapéuticas. La modulación de su expresión, mediante mimicos o inhibidores, podría permitir revertir procesos patológicos característicos de la endometriosis. Por ejemplo, restaurar los niveles de miR-199a podría reducir la angiogénesis y la inflamación mediada por VEGF-A y NF- $\kappa$ B (Agrawal et al., 2018), mientras que regular la familia miR-200 podría interferir en la TEM, clave en la invasividad de las células endometriales (Rekker et al., 2015).

Asimismo, la posibilidad de monitorizar los niveles de miRNAs en sangre de forma longitudinal, independientemente de la fase del ciclo menstrual o del uso de terapias hormonales, abre la puerta a su utilización en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y en la evaluación de la respuesta a tratamientos médicos o quirúrgicos (Sardo et al., 2025). Esto representa un avance relevante frente a las limitaciones actuales, ya que la endometriosis es una patología crónica y recurrente que requiere un control clínico a largo plazo.

## ***21. Desafíos y limitaciones***

No obstante, debemos ser conscientes de las limitaciones actuales. La falta de consistencia en los resultados entre distintos grupos de investigación refleja la necesidad urgente de estandarizar los procedimientos de recogida de muestras, control de hemólisis y normalización de datos (Agrawal et al., 2018; Chico-Sordo et al., 2024). Además, muchos estudios presentan tamaños muestrales reducidos y poblaciones homogéneas, lo que dificulta la extrapolación de los resultados a diferentes contextos clínicos.

La heterogeneidad intrínseca de la endometriosis añade otra capa de complejidad. Se trata de una enfermedad multifactorial y polimórfica, con fenotipos clínicos muy variables que incluyen desde mujeres asintomáticas hasta pacientes con dolor pélvico crónico severo o infertilidad (Chauhan et al., 2022). Es improbable que un único perfil de miRNAs pueda reflejar de forma uniforme todas estas manifestaciones, lo que refuerza la necesidad de desarrollar paneles combinados y adaptados a subtipos específicos de la enfermedad.

## **22. Proyecciones clínicas y avances futuros**

La integración de los miRNAs en la práctica clínica podría transformar la forma en que diagnosticamos y tratamos la endometriosis. Su utilización como biomarcadores no invasivos acortaría de manera significativa el retraso diagnóstico, que actualmente puede alcanzar hasta una década en muchos países, mejorando así el pronóstico reproductivo y la calidad de vida de las pacientes (Sardo et al., 2025). Además, su combinación con otras tecnologías emergentes, como la metabolómica, la proteómica y la inteligencia artificial aplicada al análisis de datos clínicos, podría dar lugar a herramientas de cribado más precisas y personalizadas.

En el ámbito terapéutico, los miRNAs se perfilan como moléculas capaces de guiar el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas dirigidas. A medida que se optimicen los sistemas de liberación específicos, como nanopartículas o vectores virales, se incrementará la viabilidad de los tratamientos basados en la modulación de miRNAs (Chico-Sordo & García-Velasco, 2024). En este contexto, es fundamental que la investigación clínica avance en paralelo al desarrollo tecnológico, garantizando la seguridad y eficacia de estas aproximaciones.

## **23. Reflexión final**

En conclusión, los miRNAs representan una oportunidad única para superar las barreras diagnósticas y terapéuticas de la endometriosis. Aunque todavía nos encontramos en una fase exploratoria, la evidencia acumulada hasta el momento respalda su viabilidad como biomarcadores y dianas terapéuticas. La consolidación de protocolos estandarizados, la realización de estudios multicéntricos y la colaboración internacional son pasos indispensables para lograr su implementación clínica.

Desde mi perspectiva como investigador en formación dentro del ámbito de la biología reproductiva, considero que el estudio de los miRNAs no solo contribuye

al avance del conocimiento científico, sino que tiene un potencial transformador real en la vida de millones de mujeres afectadas por la endometriosis. El reto futuro será trasladar este conocimiento desde el laboratorio hasta la práctica clínica, en un proceso que combine rigor científico, innovación tecnológica y sensibilidad hacia las necesidades de las pacientes.

**Bibliografía (30)**

Agrawal, S., Tapmeier, T. T., Rahmioglu, N., Kirtley, S., Zondervan, K. T., & Becker, C. M. (2018). The miRNA mirage: How close are we to finding a non-invasive diagnostic biomarker in endometriosis? a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020599>

Ahn, S. H., Singh, V., & Tayade, C. (2017). Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertility and Sterility*, 107(3), 523–532. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.01.009/ASSET/E6430F6E-9E38-4D88-A1A9-A05C87AC2BFA/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>

Bashti, O., Noruzinia, M., Garshasbi, M., & Abtahi, M. (2018). miR-31 and miR-145 as Potential Non-Invasive Regulatory Biomarkers in Patients with Endometriosis. *Cell Journal*, 20(1), 84–89. <https://doi.org/10.22074/CELLJ.2018.4915>,

Chauhan, S., More, A., Chauhan, V., & Kathane, A. (2022). Endometriosis: A Review of Clinical Diagnosis, Treatment, and Pathogenesis. *Cureus*, 14(9). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.28864>

Chico-Sordo, L., & García-Velasco, J. A. (2024). MicroRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Female Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12979. <https://doi.org/10.3390/IJMS252312979>

Chico-Sordo, L., Ruiz-Martínez, T., Toribio, M., González-Martín, R., Spagnolo, E., Domínguez, F., Hernández, A., & García-Velasco, J. A. (2024). Identification of miR-30c-5p microRNA in Serum as a Candidate Biomarker to Diagnose Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS25031853>

Cosar, E., Mamillapalli, R., Ersoy, G. S., Cho, S. Y., Seifer, B., & Taylor, H. S. (2016). Serum microRNAs as diagnostic markers of endometriosis: a comprehensive array-based analysis. *Fertility and Sterility*, 106(2), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.013>

*Endometriosis con Cirugia Robotica*. (n.d.). Retrieved June 16, 2025, from <http://www.icirugiarobotica.com/noticias/ginecologia-endometriosis/>

*Endometriosis images and severity - gynsurgery.org*. (n.d.). Retrieved June 16, 2025, from <https://www.gynsurgery.org/endometriosis-images-severity/>

Jia, S. Z., Yang, Y., Lang, J., Sun, P., & Leng, J. (2013). Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Human Reproduction*, 28(2), 322–330. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DES413>,

*Micro-ARN - Labster*. (n.d.). Retrieved March 18, 2024, from

<https://theory.labster.com/es/micrornas/>

Moustafa, S., Burn, M., Mamillapalli, R., Nematian, S., Flores, V., & Taylor, H. S. (2020). Accurate diagnosis of endometriosis using serum microRNAs. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 223(4), 557.e1-557.e11.

<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.050>

Rekker, K., Saare, M., Roost, A. M., Kaart, T., Sõritsa, D., Karro, H., Sõritsa, A., Simón, C., Salumets, A., & Peters, M. (2015). Circulating miR-200-family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertility and Sterility*, 104(4), 938-946.e2.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.029>

Sardo, A. D. S., Becker, C. M., Renner, S. P., Suvitie, P. A., Tarriel, J. E., Vannuccini, S., Garcia Velasco, J. A., Verguts, J., & Mercurio, A. (2025). Management of women with endometriosis in the 21st century. In *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins.

<https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000001027>

Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. *Essays in Biochemistry*, 65(4), 625–639. <https://doi.org/10.1042/EBC20200032>