

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 349**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

G16H 10/60 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2015 PCT/EP2015/064609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15197858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2015 E 15731951 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3161149**

54 Título: **Métodos que emplean ADN y miARN circulantes como biomarcadores para la infertilidad femenina**

30 Prioridad:

27.06.2014 EP 14306042

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.03.2021

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR;
TRAYER, SABINE y
SCALICI, ELODIE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 815 349 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos que emplean ADN y miARN circulantes como biomarcadores para la infertilidad femenina

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere en general a los campos de la medicina reproductiva. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para determinar la reserva ovárica y la función ovárica.

10 **Estado de la técnica**

En la actualidad, no existe un enfoque fiable de cuantificación de ácidos nucleicos libres de células disponible comercialmente para estimar la reserva ovárica de la mujer, predecir la respuesta a la estimulación de la mujer, el resultado de la FIV y ninguna terapia dirigida a estos ácidos nucleicos libres de células para mejorar el éxito de la TRA.

15 Los datos de fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) indican claramente resultados decepcionantes, incluso en los programas más exitosos. De hecho, en Francia, la tasa de éxito de la TRA varía del 25 % al 28 % en términos de nacidos vivos por recuperación de ovocitos. Algunos defectos que conducen a problemas con la implantación de embriones aún no se han explicado y la presencia de niveles anormales de ácidos nucleicos libres de células en la sangre podría constituir otra área de infertilidad inexplicable.

25 Durante el desarrollo folicular, los ovocitos están en estrecho contacto con las células del cúmulo circundante (CC) para formar el complejo cúmulo-ovocito (COC). La comunicación entre los ovocitos y las CC se produce a través de uniones en hendidura (Albertini *et al.*, 2001). Esta señalización paracrina es crucial para la adquisición de competencia en el desarrollo en ovocitos y CC (Gilchrist *et al.*, 2008). Estas regulaciones recíprocas están cuidadosamente moduladas por algunos genes clave que están ellos mismos regulados por miARN (Assou *et al.*, 2013). Los microARN pertenecen a la familia de los "ARN pequeños" y se conservan evolutivamente desde invertebrados hasta vertebrados (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Los miARN se identificaron por primera vez en *Caenorhabditis elegans* a principios de los noventa (Lee *et al.*, 1993). Son moléculas de ARN monocatenario no codificante de 19-25 nucleótidos de longitud que surgen de regiones genómicas intergénicas o intragénicas. En los mamíferos, los miARN usualmente son complementarios a una región pequeña en la 3' UTR (región no traducida) de los ARN mensajeros (ARNm).

35 Algunos miARN se encuentran en los fluidos corporales. Dado que están contenidos en exosomas, son muy estables en los fluidos corporales porque están protegidos de las ARNas. El uso potencial de estos miARN circulantes como novedosos biomarcadores de diagnóstico/pronóstico no invasivos es el foco de muchas investigaciones (Mitchell *et al.*, 2008) y ya se utilizan como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de varios trastornos ginecológicos y del embarazo (Carletti *et al.*, 2009). Los microARN (miARN) son moléculas de ARN pequeñas (19-25 nucleótidos), monocatenarias no codificantes que se unen específicamente a y regulan postranscripcionalmente varios ARN mensajeros (ARNm) y (Thomas *et al.*, 2010). Los miARN desempeñan un papel fisiológico importante y las desregulaciones de miARN pueden conducir a patologías. En fertilidad, los miARN están asociados con la regulación funcional de las células somáticas gonadales (células de Leydig y Sertoli en los testículos, y células de la granulosa y del cúmulo en el ovario) involucradas en la síntesis de esteroides. Por ejemplo, en ratones macho, la delección de Dicer (una proteína esencial para la maduración de miARN) en las células de Sertoli conduce a la infertilidad debido a la ausencia completa de espermatozoides y la degeneración testicular progresiva (Hossain *et al.*, 2012). En ratones hembra, la invalidación de Dicer conduce a la infertilidad debido a múltiples defectos en las funciones ováricas, incluyendo los ciclos anormales y la respuesta anormal a la gonadotropina que conduce a un problema de ovulación (Nagaraja *et al.*, 2008). Los miARN podrían tener un papel importante en la regulación de las funciones de las células foliculares, tales como la esteroidogénesis, la apoptosis, la luteinización, así como en el proceso de ovulación (Hawkins *et al.*, 2010). Por ejemplo, el tratamiento de las células de la granulosa mural de ratón con hormona luteinizante conduce a la desregulación de un conjunto de miARN (particularmente la sobreexpresión de miR-132 y miR-212) que posiblemente sean importantes para el control de las funciones ováricas (Fiedler *et al.*, 2008). La sobreexpresión de miR-93 podría alterar el desarrollo del ovario. De hecho, el miR-93 se dirige al ARNm que codifica LHX8, una proteína que contiene un homeodominio Lim necesario para la transición del folículo primordial al primario (Pangas *et al.*, 2006).

55 Numerosos estudios han demostrado que las hormonas del eje hipotálamico-pituitario-gonadal, que son esenciales para la maduración sexual y la función reproductora en mamíferos, también están implicadas en la regulación de algunos miARN. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) estimula la síntesis y la secreción de gonadotropinas hipofisarias, la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH) que a continuación regulan la producción de esteroides gonadales y la gametogénesis (Conn *et al.*, 1994; Kaiser *et al.*, 1997). La GnRH también induce la expresión de múltiples miARN, particularmente miR-132 y miR-212, que están codificados por el mismo gen que se induce por GnRH (Godoy *et al.*, 2011). La LH actúa sobre las células de la granulosa ovárica para inducir la ovulación y la luteinización, la reanudación de la meiosis de los ovocitos y la expansión de las células del cúmulo, que son etapas cruciales para una ovulación adecuada. Además, la LH actúa como factor de supervivencia al prevenir la apoptosis de las células de la granulosa (Robker *et al.*, 1998; Chaffin *et al.*, 2001). Curiosamente, la LH también regula positivamente miR-132, miR-212 y miR-21 en las células de la granulosa mural (Fiedler *et al.*, 2008). MiR-21 se sobreexpresa en muchos tumores, incluyendo cáncer de mama, páncreas, colorrectal y esofágico y, por lo

tanto, se considera un oncomiARN (Cho *et al.*, 2007; Verghese *et al.*, 2008; Dillhoff *et al.*, 2008). El agotamiento de miR-21 induce la apoptosis dependiente de caspasa de las células de la granulosa de ratón *in vitro* e *in vivo* (Carletti *et al.*, 2010), destacando el papel antiapoptótico fisiológico de miR-21 en los tejidos normales. El agotamiento de miR-200b y miR-429 inhibe la síntesis de LH reprimiendo la transcripción del gen que codifica la subunidad de LH. Esto da como resultado una menor concentración sérica de LH y la ausencia del aumento de LH, lo que conduce a un fallo de ovulación (Hasuwa *et al.*, 2013). Por lo tanto, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario requiere miR-200b y miR-429 para asegurar la ovulación. Finalmente, miR-122 participa en la regulación negativa de la expresión del receptor de LH al aumentar la expresión de la proteína de unión al ARNm del receptor de LH (LRBP) a través de la activación de SREBP (Azhar *et al.*, 2013; Menon *et al.*, 2013).

La FSH tiene un papel crucial tanto en el desarrollo del folículo como en la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa. Varios miARN, incluyendo miR-143, miR-125b, miR-21 y la familia let-7, están involucrados en el desarrollo folicular en el ratón (Yao *et al.*, 2009). La expresión de estos ARN es muy baja en los folículos primordiales, pero se vuelven fácilmente detectables en las células de la granulosa de los folículos primarios, secundarios y antrales. MiR-143, let-7a y miR-15b están regulados negativamente por FSH (Yao *et al.*, 2009). Además, miR-133b está involucrado en la producción de estrógenos inducida por FSH, uniéndose a la 3'UTR de *Foxl2* y reduciendo así el nivel de proteína FOXL2 en las células de la granulosa (Dai *et al.*, 2013). FOXL2 se expresa en los ovarios y es necesaria para la función de las células de la granulosa (Schmidt *et al.*, 2004), particularmente a través de la regulación de los genes de esteroidogénesis, incluyendo StAR y CYP19A1, que son esenciales para promover la producción de estradiol (Pisarska *et al.*, 2011; Caburet *et al.*, 2012).

La implicación de los miARN en la regulación hormonal durante la foliculogénesis y en la comunicación entre los ovocitos y el nicho podría aprovecharse para identificar nuevos biomarcadores no invasivos de fertilidad. Además, el desarrollo de terapias que bloqueen la expresión o imiten las funciones de miARN específicos podría representar una nueva estrategia terapéutica para muchos trastornos ginecológicos.

De manera similar, las moléculas de ADN libre de células (cfADN), que son liberadas principalmente por células apoptóticas o necróticas, también se encuentran en los fluidos y pueden usarse como biomarcadores de afecciones patológicas (Schwarzenbach *et al.*, 2011). De hecho, se ha detectado cfADN en semen humano (Chou *et al.*, 2004). Este ADN seminal libre de células contiene información epigenética de ADN que es esencial para una espermatogénesis adecuada (Wu *et al.*, 2013). El cfADN circulante en el torrente sanguíneo también se utiliza para detectar anomalías ginecológicas y el cfADN fetal en la sangre materna constituye un biomarcador no invasivo de aneuploidía fetal (Lo *et al.*, 1999; Bischoff *et al.*, 2002; Bischoff *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2009; Lambert-Messerlian *et al.*, 2013). Recientemente, se informó que el aumento de los niveles de cfADN en plasma se asocia con tasas bajas de embarazo en los programas de FIV (Czamanski-Cohen *et al.*, 2013). Sin embargo, la única correlación fue entre el cfADN y el resultado del embarazo, una vez que la paciente estaba embarazada.

A. Sørensen *et al.*, GENES, vol. 5(3), páginas 684-708, (25-08-2014) divulga microARN relacionados con el síndrome de ovario poliquístico (SOP) también en el fluido folicular.

E. Scalici *et al.*, HUMAN REPRODUCTION, vol.29(12), páginas 2661-2669, (29-09-2014) divulga ADN libre de células en el fluido folicular como un biomarcador de la calidad del embrión.

No existe un método conocido para evaluar la reserva ovárica de una paciente individual, por lo que la determinación de la reserva ovárica es importante en el tratamiento de la infertilidad.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de la medicina reproductiva. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para determinar la reserva ovárica determinando el nivel de ácidos nucleicos libres de células o el nivel de miR-30a, miR-140, let-7b o miR-574-3p en la extracción de ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

Los inventores estudiaron la relación entre los niveles de ácido nucleico circulante (ADN libre de células y microARN) en el suero/plasma de la mujer y los parámetros de reserva/función ovárica y los resultados de la FIV. Los inventores demuestran que el análisis de dichos ácidos nucleicos libres de células en el suero o plasma es informativo sobre la reserva ovárica, las funciones y los resultados de la FIV. Además, los inventores demuestran que el análisis de dicho nivel de ácidos nucleicos libres de células en suero o plasma puede usarse como un método no invasivo para evaluar la reserva ovárica, las funciones y las predicciones de los resultados de la FIV y podría representar dianas terapéuticas para mejorar el éxito de la TRA.

Los inventores también demostraron la expresión diferencial de miARN en muestras de fluido folicular de mujeres con SOP y LFOR en comparación con mujeres con reserva ovárica normal. Los inventores también demostraron expresión diferencial de miARN de fluido folicular de acuerdo con el tratamiento con gonadotropina y la respuesta ovárica.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la reserva ovárica en una paciente que lo necesita, que comprende las etapas que consisten en i) proporcionar una muestra de fluido folicular, ii) extraer los ácidos nucleicos libres de células de la muestra de fluido folicular, y iii) determinar el nivel de ácidos nucleicos libres de células en la extracción de ácido nucleico.

5 El término "reserva ovárica" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la capacidad del ovario para proporcionar ovocitos o folículos ováricos que sean aptos para la fertilización dando como resultado un embarazo sano y exitoso. Con la edad materna avanzada, la cantidad de ovocitos o folículos ováricos que se pueden reunir con éxito para un posible embarazo disminuye, lo que constituye un factor importante en la correlación inversa entre la edad y la fertilidad femenina.

El término "muestra biológica" se refiere a sangre, suero, plasma, fluido folicular individual o muestra de fluido folicular de folículos preovulatorios individuales.

15 El método de la invención es aplicable preferiblemente a mujeres pero puede ser aplicable a otros mamíferos (por ejemplo, primates, perros, gatos, cerdos, vacas, ratones...).

20 Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una secuencia nucleica codificante o no codificante. Los ácidos nucleicos incluyen ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Por lo tanto, los ejemplos de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, ADN, ARNm, ARNt, ARNr, ARNmt, miARN, ARNpi, snoARN y snARN. El término "ácido nucleico" también se refiere a miARN circulante confinado dentro de exosomas). De acuerdo con la invención, el término "ácido nucleico" se refiere a ácidos nucleicos presentes en la muestra de fluido folicular. El término "ácido nucleico" también se refiere a los ácidos nucleicos que se originan en el ovario o en los folículos ováricos que pueden entrar en la circulación sanguínea.

El experto en la técnica puede utilizar cualquier método bien conocido en la técnica para extraer el ácido nucleico libre de células de la muestra preparada. Por ejemplo, se puede utilizar el método descrito en el ejemplo.

30 En una realización particular, el método de la invención comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de ácido nucleico libre de células en la extracción de ácido nucleico, ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia, y iii) concluir que la paciente tiene una reserva ovárica alta cuando el nivel determinado en la etapa i) es menor que el valor de referencia, y concluir que la paciente tiene una reserva ovárica baja cuando el nivel determinado en la etapa i) es superior al valor de referencia.

35 En una realización particular, el valor de referencia es un valor umbral o un valor de corte que se puede determinar experimental, empírica o teóricamente. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como se reconocerá por un experto en la técnica. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Típicamente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar utilizando una curva de característica operativa del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar los niveles de ácido nucleico (obtenidos de acuerdo con el método de la invención) con un valor umbral definido. Se divulga que el valor umbral se deriva de los niveles de ácido nucleico (o relación, o puntuación) determinados en una muestra de sangre, suero o plasma derivada de una o más pacientes sometidas a FIV o ISCI. Además, la medición retrospectiva de los niveles de ácido nucleico (o relación, o puntuaciones) en muestras históricas de sangre, suero o plasma debidamente almacenadas de pacientes sometidas a FIV o ISCI puede usarse para establecer estos valores umbral.

50 Se divulga que el valor de referencia es 0,4 ng/μl.

La determinación del nivel del ácido nucleico se puede realizar mediante una diversidad de técnicas bien conocidas en la técnica. En una realización particular, se puede realizar una PCR cuantitativa para determinar el nivel de ADN tal como se describe en El Messaoudi *et al.*, 2013; Mouliere *et al.*, 2013; Thierry *et al.*, 2013; Umetani *et al.*, 2006 y el documento WO2012/028746. En particular, la determinación del nivel del ácido nucleico puede realizarse mediante ALU-qPCR y las técnicas descritas en los ejemplos.

60 En una realización particular, el método de la invención comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de ácido nucleico libre de células en la extracción de ácido nucleico, ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia, y iii) concluir que la paciente tiene una función ovárica normal y no padece trastornos ováricos cuando el nivel determinado en la etapa i) es menor que el valor de referencia, y concluir que la paciente tiene una función ovárica anormal y padece trastornos ováricos cuando el nivel determinado en la etapa i) es superior al valor de referencia.

65 El término "trastornos ováricos" tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades seleccionadas de, pero sin limitación, cáncer de ovario, síndrome de ovario poliquístico (SOP), insuficiencia ovárica prematura (POF),

reserva ovárica de función baja (LFOR), y trastornos ginecológicos bien conocidos en la técnica.

En un aspecto adicional de la presente invención, se miden los niveles de miARN.

5 Como se usa en el presente documento, el término "miR" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la secuencia de miARN disponible públicamente en la base de datos <http://microna.sanger.ac.uk/sequences/>.

10 Por consiguiente, el método de acuerdo con la presente invención también comprende la etapa de determinar el nivel de al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-30a, miR-140, let7-b y miR-574-3p en la extracción de ácido nucleico de la muestra de fluido folicular.

15 El método de la invención puede comprender además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de al menos un miARN en la extracción de ácido nucleico con un valor de referencia, en el que la detección de un diferencial en el nivel de expresión del miARN entre la extracción de ácido nucleico y el valor de referencia es indicativa de la reserva ovárica de la paciente,

20 Un mayor nivel de expresión de miR-30a, miR-191 y miR-574-3p y un menor nivel de expresión de miR-140, let7-b, miR-320a, miR-21 y miR-30d son indicativos de que una paciente tiene una reserva ovárica baja, tiene una función ovárica anormal, o padece trastornos ováricos.

Un nivel de expresión más bajo de miR-30a, miR-191 y miR-574-3p y un nivel de expresión más alto de miR-140, let7-b, miR-320a, miR-21 y miR-30d son indicativos de que una paciente tiene una reserva ovárica normal o alta, tiene una función ovárica normal, o no padece trastornos ováricos.

25 MiR-30a se sobreexpresó significativamente ($p = 0,006$) y miR-140 y let7-b se regularon negativamente ($p = 0,01$ para ambos) en depósitos de FF de mujeres con síndrome de ovario poliquístico en comparación con mujeres con reserva ovárica normal. El análisis ROC mostró que la combinación de niveles intrafoliculares de miR-30a, miR-140 y let7-b podría discriminar entre el síndrome de ovario poliquístico y la reserva ovárica normal con una especificidad del 83,8 % y una sensibilidad del 70 % (área bajo la curva ROC, AUC = 0,83 [0,73-0,92]; $p < 0,0001$).

30 Por consiguiente, un nivel de expresión más alto de miR-30a y un nivel de expresión más bajo de miR-140 y let7-b son indicativos de una paciente que tiene una reserva ovárica baja y que padece síndrome de ovario poliquístico, y un nivel de expresión más bajo de miR-30a y un nivel de expresión más alto de miR-140 y let7-b son indicativos de una paciente que tiene una reserva ovárica normal o alta y que no padece síndrome de ovario poliquístico.

35 La expresión de FF de miR-30a y miR-191 se reguló positivamente de forma significativa en pacientes con baja reserva ovárica funcional en comparación con mujeres con reserva ovárica normal ($p = 0,01$ para ambos casos). Su combinación fue muy sensible (85,9 %) y específica (71,4 %) para la identificación de la reserva ovárica funcional baja (AUC = 0,84 [0,67-0,86]; valor $p < 0,0001$).

40 Por consiguiente, un nivel de expresión más alto de miR-30a y miR-191 es indicativo de una paciente que tiene una reserva ovárica baja y que padece una reserva ovárica funcional baja, y un nivel de expresión más bajo de miR-30a y miR-191 es indicativo de una paciente que tiene una reserva ovárica alta o normal y que no tiene una reserva ovárica funcional baja.

45 Se divulgan métodos particularmente adecuados para evaluar la eficacia de un tratamiento de fertilización *in vitro*. Por consiguiente, la divulgación también se refiere a un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de hiperestimulación ovárica controlada (EOC) en una paciente que comprende:

- 50
- i) proporcionar dicha muestra de sangre, suero, plasma o fluido folicular de la paciente;
 - ii) determinar la función y los trastornos ováricos mediante la realización del método de la invención; y
 - iii) concluir que la paciente es respondedora o no respondedora al tratamiento de EOC.

55 A continuación, después de tal método, el embriólogo puede adaptar la duración del tratamiento de EOC o realizar el tratamiento de EOC en una paciente respondedora que tiene un nivel bajo de ADN libre de células, una reserva ovárica alta, una función ovárica normal y que no padece trastornos ováricos.

60 Por consiguiente, después de tal método, el tratamiento de EOC puede no realizarse en una paciente no respondedora y que tenga un nivel alto de ADN libre de células, una reserva ovárica baja, una función ovárica anormal y que padezca trastornos ováricos. En dicha paciente no respondedora, el embriólogo puede realizar un tratamiento de EOC cuando el nivel de ADN libre de células disminuye por el tratamiento de trastornos ováricos.

65 El tratamiento de EOC puede basarse en al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante.

El término "tratamiento de trastornos ováricos" tiene su significado general en la técnica y se refiere al tratamiento de

trastornos ováricos que padecen las pacientes con trastornos ováricos. El término "tratamiento de trastornos ováricos" también se refiere a moléculas pre-miR o anti-miR para restablecer el nivel correcto de microARN y el nivel bajo de ADN libre de células en la sangre.

5 También se divulga un kit para realizar los métodos descritos anteriormente, en el que dicho kit comprende medios para determinar el nivel de ácidos nucleicos libres de células. Típicamente, los kits incluyen cebadores, sondas, macromatrices o micromatrices. El kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de hibridación particular, incluyendo matrices en fase sólida, cuando sea aplicable, y estándares. Como alternativa, el kit puede comprender cebadores de
10 amplificación que pueden estar preetiquetados o pueden contener un resto de unión o de purificación por afinidad. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de amplificación particular.

15 La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

20 **Figura 1: Algunos microARN están asociados con biomarcadores de infertilidad y biomarcadores de reserva ovárica.**

Relación entre los niveles en suero y fluido folicular de miARN circulantes específicos y la concentración de LH, AMH, AFC (recuento de folículos antrales) y el estado de la reserva ovárica. miR-474-3p se regula positivamente de forma significativa en el SOP. SOP (síndrome de ovario poliquístico), IO (insuficiencia ovárica) o reserva ovárica funcional baja.

25

Figura 2: ADN libre de células como biomarcador de reserva ovárica

Impacto de la edad y el nivel de AMH en el nivel de cfADN en muestras de suero de mujeres sometidas a FIV.

30 **Figura 3: ADN libre de células como biomarcador de la función ovárica**

Impacto de los niveles hormonales (FSH, LH y estradiol) sobre el nivel de cfADN en muestras de suero de mujeres sometidas a FIV.

35 **Figura 4:** El modelo esquemático que muestra que el perfil de expresión de miARN en muestras de FF proporciona potentes herramientas para la detección de trastornos de la reserva ovárica y la predicción de resultados de la FIV durante la FIV. La expresión de algunos miARN de FF varía de acuerdo con el tratamiento con gonadotropinas. HPhMG, gonadotropina menopáusica humana altamente purificada; r-FSH, hormona foliculoestimulante; SOP, síndrome de ovario poliquístico; LFOR, reserva ovárica de función baja.

40 **Figura 5: Nivel de ADN libre de células en depósitos de fluido folicular (FF) según el estado de la reserva ovárica de las pacientes, los parámetros de reserva ovárica y la duración de la infertilidad.** **A**, contenido de cfADN intrafolicular de FF en pacientes con reserva ovárica normal frente a pacientes con trastornos de la reserva ovárica (insuficiencia ovárica y síndrome de ovario poliquístico); *p = 0,03. **B**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con los parámetros de reserva ovárica; panel izquierdo: AFC (<10 frente a ≥10, *p = 0,04); panel derecho: AMH (≤1 frente a >1 ng/ml, *p = 0,06). **C**, niveles de cfADN de FF de acuerdo con la duración de la infertilidad (1 frente a ≥5 años, *p = 0,049).

45 **Figura 6: Nivel de cfADN en depósitos de fluido folicular de acuerdo con el protocolo de estimulación ovárica y la respuesta ovárica.** **A**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con la duración de la estimulación ovárica (≤10 frente a >10 días), *p = 0,008.
50 **B**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con la dosis total de gonadotropinas (<3000 frente a ≥3000 UI/1, *p = 0,01). **C**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con el número de ovocitos recuperados (≤6 frente a >6 ovocitos, *p = 0,045).

55 **Figura 7:** Nivel de cfADN en depósitos de fluido folicular de acuerdo con el resultado embrionario el día 2 y 3. **A**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con el número total de embriones el día 2 (≤2 frente a >2, *p = 0,03). **B**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con, panel izquierdo: el número de embriones de alta calidad (grado 1-2) por paciente (0 frente a ≥1, *p = 0,002) el día 2, panel derecho: relación entre el número de embriones de alta calidad y número total de embriones (<0,2 frente a ≥0,2, *p = 0,04) el día 2. **C**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con, panel izquierdo: el número de embriones de alta calidad (grado 1-2) por paciente (0 frente a ≥1, *p = 0,006) el día 3, panel derecho: relación entre el número de embriones de alta calidad y número total de embriones (<0,2 frente a ≥0,2, *p = 0,02) el día 3. **D**, contenido de cfADN de FF de acuerdo con, panel izquierdo: tasa de fragmentación el día 3 (<20 % frente a ≥20 %, p = 0,18), y panel derecho: relación entre el número de blastómeros y el número total de embriones el día 3 (<6 frente a 6-8, *p = 0,02).

65 **Figura 8:** Comparación de los niveles de cfADN en depósitos de fluido folicular de pacientes con reserva ovárica normal (n = 94) y pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) (n = 17); *p = 0,049.

Figura 9: Comparación de la expresión relativa de miARN en depósitos de fluido folicular (FF) de mujeres con diferentes estados de reserva ovárica (reserva ovárica normal, síndrome de ovario poliquístico (SOP) y reserva ovárica de función baja (LFOR)). **A**, miR-30a de FF; **B**, miR-140 de FF; **C**, let-7b de FF; **D**, miR-191 de FF.

Figura 10: A, Comparación del nivel de expresión de miR-29a y miR-140 de FF en relación con el tipo de tratamiento (gonadotropina menopáusica humana altamente purificada, hMG, frente a hormona foliculoestimulante recombinante, r-FSH). **B**, Expresión diferencial de miR-140 de FF de acuerdo con la dosis total de gonadotropinas (<3000 frente a ≥3000 UI/l). **C**, Comparación del nivel de expresión de miR-320a de FF en relación con el número de ovocitos maduros recuperados (≤2 frente a >2 ovocitos maduros).

Figura 11: Vías involucradas en los procesos reproductivos y que incluyen los miARN circulantes miR-29a, miR-320a, let-7b y miR-30a, y su interacción con hormonas esteroideas.

Figura 12: Cuantificación de cfADN el día 3 del ciclo menstrual en muestras de suero de 92 mujeres. Media ± DE = 0,25 ± 0,14. **A**. El nivel de cfADN en suero fue significativamente mayor en mujeres con LFOR en comparación con mujeres con reserva ovárica normal (p = 0,045). El nivel de cfADN en suero tendió a ser más alto en mujeres con SOP en comparación con mujeres con reserva ovárica normal (p = 0,05). Media (todas las pacientes) = 0,25 ± 0,4; Media de reserva ovárica normal = 0,19 ± 0,27. **B**. El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN en suero predijo significativamente LFOR (AUC = 0,64; Se = 52 %; SP = 75 %; corte >0,17). El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN en suero predijo significativamente SOP (AUC = 0,65; Se = 95 %; SP = 34 %; corte >0,06). **C**. El nivel de cfADN en suero fue significativamente mayor en mujeres mayores (edad >36 o edad ≥36 años) en comparación con mujeres jóvenes (edad <36 o edad ≤36 años) (p = 0,037; p = 0,024, respectivamente). **D**. El nivel de cfADN en suero el día 3 del ciclo menstrual se correlacionó significativa y positivamente con la edad de las mujeres (r = 0,27; p = 0,02). **E**. Para mujeres sometidas a procedimiento de FIV/ICSI (n = 26). El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN fue significativamente más alto en las muestras de suero de mujeres que obtuvieron menos de 6 ovocitos el día de los ovocitos (≤6 ovocitos) en comparación con aquellas que obtuvieron más de 6 ovocitos (>6 ovocitos) (p = 0,013). El nivel de cfADN el día 3 del ciclo menstrual podría predecir el número de ovocitos recuperados y, por lo tanto, el pronóstico de la FIV/ICSI. Correlación de Spearman+++ : r = -0,42; p = 0,03. **F**. Para mujeres sometidas a procedimiento de FIV/ICSI (n = 26). El nivel de cfADN en suero se correlacionó significativa y negativamente con el número de ovocitos recuperados durante el procedimiento de FIV/ICSI (r = -0,42; p = 0,03). El nivel de cfADN el día 3 del ciclo menstrual podría predecir el número de ovocitos recuperados y, por lo tanto, el pronóstico de la FIV/ICSI. **G**. Para pacientes con reserva ovárica normal y con LFOR (SOP se excluyó de este análisis). Comparación con el nivel de AMH el día 3 del ciclo menstrual, biomarcador clásico, utilizado para evaluar la reserva ovárica. El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN fue significativamente mayor en muestras de suero de mujeres con AMH ≤1 ng/ml o ≤2 ng/ml en comparación con aquellas con AMH >1 ng/ml o >2 ng/ml, respectivamente (p = 0,046; p = 0,004, respectivamente). **H**. El nivel de cfADN en suero el día 3 del ciclo menstrual se correlacionó de manera significativa y negativa con el nivel de AMH en suero el día 3 del ciclo menstrual (r = -0,32; p = 0,006). **I**. Todas las pacientes fueron incluidas en este análisis (n = 92). Comparación con AMH, biomarcador clásico, utilizado para evaluar la reserva ovárica. El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN fue significativamente mayor en las muestras de suero de mujeres con AMH ≤2 ng/ml en comparación con aquellas con AMH entre 2 y 5 ng/ml (p = 0,013). El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN tendió a ser más alto en las muestras de suero de mujeres con AMH ≥5 ng/ml en comparación con aquellas con AMH entre 2 y 5 ng/ml (p = 0,09).

Figura 13: Expresión de microARN el día 3 del ciclo menstrual en muestras de suero de 70 mujeres. La expresión de let-7b en suero fue mayor en mujeres mayores (edad ≥38 años) en comparación con mujeres menores de 38 años. Comparación de perfiles de expresión de microARN y LH el día 3 del ciclo menstrual, utilizados para evaluar la función ovárica. La expresión de miR-30d y miR-320a disminuyó significativamente en mujeres con niveles altos de LH (>5 UI/l) en comparación con mujeres con niveles normales de LH (entre 3-5 UI/l) (p <0,03; p <0,02; p <0,02, respectivamente).

Ejemplos

EJEMPLO 1:

La presente invención se refiere a un método no invasivo para predecir la reserva ovárica de una mujer.

Esta divulgación comprende las etapas que consisten en:

- i) Proporcionar una muestra de suero o plasma,
- ii) extraer los ácidos nucleicos libres de células (ADN libre de células y microARN) de la muestra,
- iii) determinar el nivel de ácidos nucleicos libres de células (ADN libre de células y microARN) en las extracciones de ácido nucleico
- iiii) tratar mujeres con moléculas pre-miR o anti-miR para restablecer el nivel adecuado de microARN en la sangre.

Varios estudios han demostrado que los miARN están implicados en la señalización intercelular (Valadi *et al.*, 2007). De hecho, los miARN pueden secretarse en el medio extracelular por las células donante para actuar sobre otras células. Estos miARN circulantes están protegidos de la degradación en pequeñas vesículas llamadas exosomas y pueden encontrarse en fluidos biológicos, tales como suero o plasma. Con el fin de identificar los miARN que están implicados en la comunicación entre las CC y los ovocitos y que regulan genes clave implicados en la foliculogénesis y la función ovárica, se analizaron mediante secuenciación profunda los miARN presentes en ovocitos MII maduros y en las CC asociadas (Assou *et al.*, 2013). Se encontró que solo tres miARN se expresaban en ovocitos (miR-184, miR-100 y miR-10a) y 32 en las CC. Entre los miARN expresados en las CC, se seleccionaron algunos basándose en su posible participación en la foliculogénesis y se investigó si podían detectarse también en muestras de suero de mujeres que se sometieron a FIV usando RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Materiales y métodos

Pacientes y muestras de suero

Este estudio prospectivo incluyó a 70 mujeres que fueron a consulta por problemas de infertilidad en el laboratorio EYLAU-UNILABS en París. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito para el uso de muestras de suero el Día 3 del ciclo natural. La edad de las mujeres varió de 23 a 47 años. El estado hormonal inicial se evaluó en cada paciente el día 3 del ciclo.

Recogida de muestras de suero

Se recogieron muestras de sangre en tubos separadores de suero y se centrifugaron para separar las células sanguíneas del suero. A continuación, el suero se filtró y se almacenó a -80 °C hasta la extracción del ácido nucleico.

Extracción y cuantificación de miR

Los microARN se extrajeron de muestras de suero con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp de QIAGEN y a continuación se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando la tecnología TaqMan. Taqman proporciona cebadores de tallo-bucle preformulados diseñados para cada miARN. Para la PCR en tiempo real, se usó una sonda fluorogénica para permitir la detección del producto de PCR específico a medida que se acumula durante los ciclos de PCR.

Extracción y cuantificación de ADN libre de células

La cuantificación de ADN libre de células en muestras de suero de mujeres infértiles sometidas a FIV se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real de repeticiones de ALU utilizando un conjunto de cebadores ya publicado (ALU115) (Umetani *et al.*, 2006). Se mezclaron 20 µl de cada muestra de suero con 20 µl de un tampón que contenía 25 ml/l de Tween 20, 50 mmol/l de Tris y 1 mmol/l de EDTA y a continuación se digirieron con 16 µg de proteinasa K (PK) (Qiagen) a 50 °C durante 20 minutos seguido de inactivación por calor e insolubilización a 95 °C durante 5 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min y los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80 °C hasta la cuantificación de cfADN. El cfADN se cuantificó mediante qPCR para determinar las repeticiones de ALU humanas usando dos conjuntos de cebadores que generan un amplicón de 115 pb (cebadores ALU115) y un amplicón de 247 pb (cebadores ALU247), respectivamente. Para cada ALU-qPCR, se añadió 1 µl de cada muestra de FF digerida con PK a una mezcla de reacción (volumen final: 10 µl) que contenía 0,25 µM de cebadores directos e inversos (ALU115 o ALU247) y 5 µl de mezcla maestra 2X LightCycler®480 SYBR Green I (Roche Applied Science, Alemania). Las concentraciones de cfADN en suero se calcularon basándose en una curva estándar preparada con diluciones sucesivas de ADN genómico. Se añadió un control negativo (sin plantilla) en cada placa de qPCR. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Resultados

Algunos microARN que se encuentran en las células del cúmulo están presentes en el suero

Análisis cuantitativo de RT-qPCR en tiempo real de la expresión de miR-21 en células del cúmulo (CC) y muestras de suero de mujeres infértiles.

Por ejemplo, miR-21 se puede medir tanto en CC como en suero. Muchos otros miR están presentes tanto en el suero como en las células del cúmulo, y otros están presentes tanto en el fluido folicular (u ovario en general) como en el suero, y podrían representar buenos candidatos para biomarcadores.

Algunos microARN están asociados con biomarcadores de infertilidad

Relación entre el nivel en suero de miARN circulantes específicos y la concentración de LH, AMH, cfADN y el IMC. El nivel de miR-30d, -320a, -21, -125a, -191 y let-7b, que se expresan en células del cúmulo, se cuantificó en muestras de suero de mujeres infértiles. Los niveles en suero de miR-30d y miR-320a se compararon en mujeres con

concentración de LH normal (2-5 UI/l) o anormal (>5 UI/l). Los niveles en suero de miR-21 se compararon en mujeres con cantidades bajas o altas de cfADN; niveles en suero de let-7b en mujeres con concentraciones normales (≥ 2 ng/l) o bajas de AMH (<2 ng/l). Niveles en suero de miR-125a y miR-191 en función del IMC. Los valores P se calcularon utilizando la prueba t no pareada, utilizando el software GraphPad.

5 Se evaluaron las posibles relaciones entre los marcadores hormonales de reserva ovárica el día 3 del ciclo y la expresión de miARN circulante. Primero, se comparó el nivel de LH el día 3 con el nivel en suero de miR-30d y miR-320a, que se expresan en las CC en contacto con ovocitos MII maduros. Los inventores demostraron que el nivel de miR-30d y miR-320a circulantes era significativamente menor ($p = 0,02$ y $0,01$, respectivamente) en mujeres con LH alta (>5 UI/l). Curiosamente, la expresión de miR-30d se altera después del tratamiento con FSH de células de la granulosa de rata en cultivo (Yao *et al.*, 2010), lo que sugiere que estos miARN podrían regularse por al menos dos hormonas gonadotropinas (LH y FSH). El hallazgo de una correlación negativa entre los niveles de miR-320a y LH podría proporcionar una explicación para la disminución de miR-320a en el fluido folicular observado en pacientes con SOP (Sang *et al.*, 2013). La hormona antimülleriana (AMH), que se expresa por las células de la granulosa y controla la formación de folículos primarios al inhibir el reclutamiento folicular excesivo por parte de la FSH (Weenen *et al.*, 2004), es un marcador de reserva ovárica, SOP e insuficiencia ovárica prematura (Visser *et al.*, 2006). Además, el nivel de AMH se usa comúnmente para predecir la respuesta ovárica durante los procedimientos de FIV (Broer *et al.*, 2013). Los datos muestran que let-7b circulante aumenta en muestras de suero de mujeres con niveles bajos de AMH (<2 ng/ml). Este miARN también se expresa en COC bovinos, lo que sugiere un papel importante en la comunicación entre ovocitos y CC (Miles *et al.*, 2012). Otro informe destacó un papel de let-7b en la competencia meiótica y la maduración de los ovocitos (Kim *et al.*, 2013). Los datos preliminares sugieren que let-7b podría proporcionar una nueva herramienta de pronóstico no invasiva antes de un procedimiento de FIV. También se investigó la posibilidad de que los niveles altos de cfADN pudieran influir en la expresión de miARN en el suero. Los inventores también encontraron que miR-21 estaba significativamente subexpresado en muestras de suero de pacientes con niveles relativamente altos (>0,4 ng/ μ l de suero) de cfADN circulante ($p = 0,03$) (Umetani *et al.*, 2006). Dado que el agotamiento de miR-21 conduce a la apoptosis de las células de la granulosa (Carletti *et al.*, 2010), podría explicar el aumento de la liberación de cfADN en el suero y, por defecto, la apoptosis ovárica. Por lo tanto, este evento podría detectarse en la sangre cuantificando el cfADN circulante.

30 Se puede considerar un índice de masa corporal (IMC) alto como un indicador de infertilidad femenina y la desregulación de algunos miARN se ha visto implicada en la obesidad. Por lo tanto, se compararon los niveles circulantes de miARN expresados en las CC y el IMC de las pacientes y se encontró una disminución drástica del nivel en suero de miR-125a y miR-191 cuando el IMC >25 ($p = 0,001$ para ambos casos). Estos miARN nunca se han relacionado con la obesidad o la infertilidad, aunque se informó que miR-191 se expresaba en el fluido folicular (Sang *et al.*, 2013).

Estos resultados preliminares sugieren que los microARN circulantes representan una herramienta aún inexplorada para el diagnóstico/monitorización de la infertilidad/respuesta ovárica.

40 **Comparación de miR de expresión y biomarcadores de reserva ovárica:**

Asimismo, los inventores detectaron variaciones significativas de los niveles de miARN del fluido folicular (FF) comparando sus expresiones con los biomarcadores clásicos de reserva ovárica, nivel de AMH en suero y AFC el día 3 del ciclo menstrual, divididos en tres grupos (es decir, nivel de AMH: <1, 1-3, >3 ng/ml; AFC: <10, 10-19, >19). Estos puntos de corte se definieron basándose en algunos trabajos publicados anteriormente (Ficicioglu *et al.*, 2014; Ocal *et al.*, 2011; Jayaprakasan *et al.*, 2010; Lauritsen *et al.*, 2014).

De hecho, los niveles de miR-30a de FF fueron significativamente más altos en mujeres con una concentración en suero de AMH muy baja (<1 ng/ml) que en aquellas con un nivel de AMH normal (comprendido entre 1-3 ng/ml) ($p = 0,03$). (figura 1A, panel izquierdo). De manera similar, miR-191 de FF tendió a aumentar en el grupo de pacientes con niveles bajos de AMH en comparación con el grupo con niveles normales de AMH ($p = 0,13$) (figura 1B, panel izquierdo). La expresión de miR-140 disminuyó significativamente en los depósitos de FF del grupo de mujeres con niveles más altos de AMH en suero (>3 ng/ml) en comparación con mujeres con niveles normales de AMH ($p = 0,007$) (figura 2C, panel izquierdo). Al igual que miR-140 de FF, los niveles de let-7b de FF tendían a ser más bajos en mujeres con niveles elevados de AMH en suero que en aquellas con niveles normales de AMH ($p = 0,07$) (figura 1D). Además, miR-30a y miR-191 de FF se expresaron significativa y altamente en mujeres con AFC bajo (<10) en comparación con aquellas con un AFC incluido entre 10 y 19 ($p = 0,03$; $p = 0,02$, respectivamente) (figura 1A y 1B, paneles derechos). También se observó una disminución significativa de las expresiones de miR-140 en depósitos de FF de pacientes con AFC alto (>19) en comparación con las mujeres con un AFC comprendido entre 10 y 19 ($p = 0,04$) (figura 1C, panel derecho). Asimismo, usando el cálculo de la correlación de rango de Spearman, se encontraron correlaciones significativas y negativas entre la expresión de miR-140 de FF y los niveles en suero de AMH y AFC, respectivamente ($r = -0,19$; $p = 0,04$; $r = -0,29$, $p = 0,003$, respectivamente).

Además, después de comparar las expresiones de miARN de FF y los demás biomarcadores potenciales, lo que refleja la función ovárica (es decir, los niveles de FSH, LH, E2 el día 3 del ciclo menstrual), se encuentra que los niveles de miR-320a de FF estaban correlacionados significativa y negativamente con las tasas de LH iniciales en suero ($r = -$

0,18; $p = 0,045$). De hecho, los depósitos de FF relacionados con mujeres con niveles elevados de LH en suero (>5 UI/l) contenían niveles significativamente bajos de expresión de miR-320 que las mujeres con niveles iniciales normales de LH (3-5 UI/l) ($p = 0,01$) (figura 1E).

5 Siempre para identificar entre los miARN candidatos de FF, los relacionados con el estado de reserva ovárica, se compararon las expresiones de miARN con los biomarcadores clásicos de reserva ovárica (es decir, AMH y AFC). Entre los miARN anteriores relacionados con el SOP, miR-140 se expresa negativamente de forma significativa en las muestras de FF de pacientes con niveles más altos de AMH y AFC, respectivamente. Además, los niveles de expresión let-7b de FF tendían a ser más bajos en muestras de FF de mujeres con niveles más altos de AMH. Por lo tanto, estas observaciones confirman estos resultados anteriores, que demostraron subexpresiones de miR-140 y let-7b de FF en caso de SOP. Además, miR-30a se expresa positivamente de forma significativa en FF de pacientes con niveles bajos de AMH y AFC, respectivamente. Asimismo, los niveles de expresión de miR-191 de FF tienden a ser más altos para las mujeres con baja AMH, y aumentaron significativamente para aquellas con bajo AFC. Además, estos resultados son según los datos anteriores, sobreexpresiones informadas de estos dos miARN de FF en pacientes con insuficiencia ovárica (IO).

miR-320a: Recientemente, varios estudios informaron hallazgos divergentes con respecto a los niveles de expresión de miR-320a de FF de mujeres con SOP (Sang *et al.*, 2013; Roth *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014). De hecho, Sang *et al.*, mostraron una expresión significativamente menor de miR-320a de FF en pacientes con SOP (Sang *et al.*, 2013), aunque Roth *et al.*, no identificaron una expresión diferencial de miR-320 de FF en estos pacientes (Roth *et al.*, 2014). Por el contrario, Yin *et al.*, encontraron que la expresión de miR-320 estaba regulada positivamente en FF de pacientes con SOP (Yin *et al.*, 2014). Como se informó por Roth *et al.*, los niveles de expresión de miR-320 no difirieron significativamente entre los pacientes con SOP y los pacientes sanos de nuestra cohorte. Sin embargo, se observó que los niveles de expresión de miR-320 fueron significativamente más bajos en FF relacionado con mujeres con altas tasas de LH iniciales. Dado que en la mayoría de las mujeres con SOP, el nivel en suero de LH aumenta comúnmente, este resultado aparece de acuerdo con el resultado anterior, descrito por Sang *et al.*

Asimismo, se estableció que el SOP se caracteriza típicamente por una maduración alterada de los ovocitos, lo que conduce a una pequeña cantidad de ovocitos maduros, recogidos en la recuperación de los ovocitos (Qiao y Feng, 2011).

Los inventores también demostraron que la expresión de miR-21 está asociada con biomarcadores de reserva ovárica. Como se muestra en la figura 1 B, miR-21 aumenta en muestras de suero de mujeres con niveles altos de AMH y un AFC alto.

Como se muestra en la figura 1 G, miR-574-3p se regula positivamente de forma significativa en pacientes con SOP.

ADN libre de células como biomarcador de la reserva ovárica (figura 2)

40 Impacto de la edad y el nivel de AMH en el nivel de cfADN en muestras de suero de mujeres sometidas a FIV. La concentración baja de AMH es <2 ng/l. El cfADN se midió mediante análisis cuantitativo de RT-qPCR en tiempo real utilizando cebadores ALU. Los valores P se calcularon con pruebas t no pareadas, utilizando el software GraphPad.

El cfADN se libera en la circulación después de la necrosis y apoptosis celular fisiológica y patológica. Basándonos en el hallazgo de que la abundancia de cfADN puede cambiar en situaciones anormales, se planteó la hipótesis de que un aumento en cfADN podría reflejar trastornos de la reserva ovárica. Se espera que un aumento del nivel de cfADN pueda estar correlacionado con un resultado de embarazo. Por lo tanto, se cuantificó el cfADN en el suero de mujeres candidatas a FIV y se comparó con la edad y el nivel de AMH en sangre. El nivel de cfADN es más alto en el suero de pacientes mayores (38 años y más) que en las más jóvenes. Asimismo, el nivel en suero de cfADN es más alto en mujeres con niveles anormales de AMH (<2 ng/ μ l) que en las tienen niveles normales de AMH. El cfADN podría constituir un nuevo biomarcador de reserva ovárica.

ADN libre de células como biomarcador de la función ovárica (figura 3)

55 Impacto de los niveles hormonales (FSH, LH y estradiol) sobre el nivel de cfADN en muestras de suero de mujeres sometidas a FIV. Nivel normal de FSH = 3-9 UI/l; los niveles anormales son <3 o >9 UI/l. La concentración normal de LH es >2 UI/l y ≤ 5 UI/l. La concentración normal de estradiol (E2) es ≤ 45 pg/ml y la anormal es >45 pg/ml. El cfADN se midió mediante análisis cuantitativo de RT-qPCR en tiempo real utilizando cebadores ALU. Los valores P se calcularon con pruebas t no pareadas, utilizando el software GraphPad.

60 El nivel de cfADN se ha comparado con el nivel de FSH, LH y estradiol (E2) el día 3 del ciclo.

Los datos sugieren que la concentración en suero de ácidos nucleicos libres de células podría estar relacionada con el estado y las funciones hormonales del ovario. Estos hallazgos sugieren que los ácidos nucleicos libres de células pueden usarse como biomarcadores no invasivos del resultado de la fertilización *in vitro*.

Conclusiones:

Modelo sobre cómo los ácidos nucleicos libres de células podrían usarse como nuevos biomarcadores no invasivos de infertilidad y resultado de la FIV.

5 El perfil de ácidos nucleicos circulantes, tales como microARN y ADN libre de células, abre nuevas perspectivas para el diagnóstico/pronóstico de trastornos ováricos y para la predicción de resultados de la fertilización *in vitro* (calidad del embrión y embarazo).

10 Debido a su accesibilidad y estabilidad (los miARN circulan confinados dentro de los exosomas), podrían usarse diferentes miARN circulantes, en solitario o en combinación, como biomarcadores no invasivos de cánceres ginecológicos y trastornos ginecológicos.

EJEMPLO 2:

Materiales y métodos

Pacientes

20 Este estudio prospectivo incluyó a 100 mujeres inscritas en el programa de FIV convencional (n = 31) o ICSI (n = 69) en el Departamento ART-PGD del Hospital Universitario de Montpellier. Las características de las pacientes se detallan en la Tabla 1. La edad de las mujeres fue de 34,3 ± 4,5 años (media ± DE; rango: 23 a 43 años) y el índice de masa corporal (IMC) fue de 23,3 ± 4,2 kg/m² (media ± DE; rango: 17 y 39 kg/m²). La duración de la infertilidad fue de 3,5 ± 1,7 años (media ± DE). Para el 61 % de las parejas, este fue el primer ciclo de FIV o ICSI y el 39 % restante de las parejas se había sometido al menos a un ciclo (número medio de ciclos ± DE: 2,1 ± 1,3). En el 11 % de las parejas no se detectó una causa específica de infertilidad, mientras que en las otras parejas, se identificaron factores masculinos (37 %), femeninos (36 %) o mixtos (16 %). Basándose en el nivel de AMH y AFC el día 3 del ciclo menstrual, 94 de las 100 pacientes tenían una reserva ovárica normal y 6 tenían una reserva ovárica funcional baja (LFOR). Los niveles iniciales de FSH, LH y E2 también se cuantificaron el día 3 del ciclo menstrual en cada paciente (Tabla 1).

Tabla 1: Nivel de cfADN en depósitos de fluido folicular de acuerdo con las características clínicas de las pacientes.

Variable	Media	n (total = 100)	Mín-Máx	DE	cfADN de FF (ng/μl) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
Edad (años)	34,3	-	23-43	4,5	-	-
<37 años	-	64	-	-	1,9 ± 2,7 [0,1-2,5]	0,19
≥37 años	-	36	-	-	1,5 ± 1,0 [1,1-1,8]	NS
IMC (kg/m ²)	23,3	-	17-39	4,2	-	-
18,5 ≤ IMC <25	-	58	-	-	1,9 ± 2,6 [1,2-2,6]	ref
IMC <18,5	-	10	-	-	1,2 ± 1,1 [0,4-1,9]	0,54 NS
25 ≤ IMC <30	-	24	-	-	1,7 ± 1,6 [1,0-2,4]	0,56 NS
IMC ≥30	-	8	-	-	1,6 ± 1,5 [0,3-2,8]	0,93 NS
Duración de la infertilidad (años)*	3,5	-	1-9	1,7	-	-
1	-	8	-	-	1,1 ± 1,6 [0-2,4]	ref
2-4	-	68	-	-	1,4 ± 1,3 [1,1-1,7]	0,08 NS
≥5	-	23	-	-	2,9 ± 3,8 [1,3-4,5]	0,049

(continuación)

Variable	Media	n (total = 100)	Mín-Máx	DE	cfADN de FF (ng/μl) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
Etiología de la infertilidad						
Factor masculino	-	37	-	-	1,5 ± 1,1 [1,1-1,9]	ref
Factor femenino	-	36	-	-	1,9 ± 2,1 [1,2-2,6]	0,72 NS
Alteraciones tubáricas (%)	-	9 (25)	-	-	1,3 ± 1,6 [0,1-2,5]	0,28 NS
Endometriosis (%)	-	21 (58,3)	-	-	2,1 ± 2,5 [0,9-3,2]	0,67 NS
Disfunción ovulatoria (%)	-	1 (2,8)	-	-	-	-
Trastornos ováricos (%)	-	4 (11,1)	-	-	2,3 ± 1,3 [0,1-4,4]	0,28 NS
Factor uterino (%)	-	1 (2,8)	-	-	-	-
Infertilidad mixta	-	16	-	-	1,7 ± 3,1 [0,1-3,4]	0,08 NS
Infertilidad inexplicable	-	11	-	-	2,0 ± 3,7 [0-4,5]	0,23 NS
Infertilidad primaria	-	61	-	-	2,1 ± 2,7 [1,5-2,8]	0,08
Infertilidad secundaria	-	39	-	-	1,1 ± 0,8 [0,8-1,4]	NS
Número de ciclo de FIV/ICSI	2,1	-	1-4	1,3	-	-
1	-	39	-	-	1,2 ± 0,9 [0,9-1,5]	0,39
>1	-	61	-	-	2,1 ± 2,7 [1,4-2,8]	NS
Evaluación inicial						
FSH (UI/l)*	7,4	-	0,1-19	2,4	-	-
<10	-	87	-	-	1,6 ± 2,0 [1,2-2,1]	0,42
≥10	-	12	-	-	2,4 ± 3,7 [0-4,7]	NS
LH (UI/l)*	5,7	-	1-11,2	1,9	-	-
3-5	-	32	-	-	1,4 ± 1,3 [0,9-1,8]	ref
<3	-	5	-	-	2,0 ± 1,0 [0,7-3,3]	0,1 NS
>5	-	60	-	-	1,8 ± 2,6 [1,1-2,4]	0,7 NS
E2 (pg/ml)*	40,7	-	4-99	17,8	-	-
≤45	-	66	-	-	1,8 ± 2,5 [1,2-2,5]	0,56
>45	-	32	-	-	1,5 ± 1,6 [1,0-2,1]	NS
AMH (ng/ml)*	2,7	-	0,2-8,6	1,6	-	-
≤1	-	5	-	-	4,3 ± 5,0 [0-10,4]	0,06
>1	-	90	-	-	1,6 ± 2,0 [1,2-2,0]	NS
AFC*	13,7	-	3-25	5,7	-	-
<10	-	24	-	-	2,3 ± 2,6 [1,2-3,4]	0,04
≥10	-	63	-	-	1,5 ± 2,2 [1,0-2,1]	
Reserva ovárica normal	-	94	-	-	1,7 ± 2,3	ref

ES 2 815 349 T3

(continuación)

Variable	Media	n (total = 100)	Mín-Máx	DE	cfADN de FF (ng/μl) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
					[1,3-2,2]	
Insuficiencia ovárica	-	6	-	-	2,1 ± 1,4 [0,6-3,6]	0,29 NS
Protocolo con agonistas**	-	48	-	-	1,4 ± 2,0 [0,9-2,0]	0,09 NS
Protocolo con antagonistas	-	50	-	-	1,8 ± 1,8 [1,3-2,3]	
Tratamiento de estimulación ovárica						
Días de estimulación	10	-	7-14	1,2	-	-
7-10	-	71	-	-	1,5 ± 1,9 [1,0-1,9]	0,008
>10	-	29	-	-	2,4 ± 2,8 [1,4-3,5]	
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2414,7	-	875-4950	932,5	-	-
<3000	-	66	-	-	1,5 ± 2,1 [1,0-2,0]	0,01
>3000	-	34	-	-	2,2 ± 2,3 [1,4-3,0]	
Protocolo con agonistas						
Días de estimulación	10	-	8-14	1,1	-	-
8-10	-	37	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,4]	0,05 NS
>10	-	11	-	-	2,7 ± 3,6 [0,3-5,1]	
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2324	-	900-4200	797,8	-	-
<3000	-	34	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,5]	0,049
≥3000	-	14	-	-	2,4 ± 3,2 [0,5-4,2]	
	10	-	7-13	1,2	-	-
7-10	-	33	-	-	1,5 ± 1,6 [1,0-2,1]	0,11
>10	-	17	-	-	2,2 ± 2,3 [1,0-3,4]	NS
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2475,5	-	875-4950	982,7	-	-
<3000	-	31	-	-	1,6 ± 2,0 [0,9-2,3]	0,13
≥3000	-	19	-	-	2,0 ± 1,6 [1,3-2,8]	NS
Respuesta hormonal ovárica en el desencadenamiento de la ovulación						
Nivel máximo de E2 (pg/ml)	1793,2	-	341-4768	799	-	-
1000-2000	-	56	-	-	1,8 ± 2,1 [1,2-2,3]	ref
<1000	-	12	-	-	2,4 ± 3,5 [0,2-4,6]	0,71 NS
>2000	-	32	-	-	1,4 ± 1,8 [0,8-2,1]	0,23 NS
Nivel de progesterona (ng/ml)						
<1	0,8	-	0,1-1,6	0,3	-	-
≥1	-	76	-	-	1,7 ± 2,1 [1,2-2,2]	0,82
	-	24	-	-	1,8 ± 2,6 [0,7-2,9]	NS
Nivel de LH (UI/l)						
	2,0	-	0,1-6,0	1,5	-	-

(continuación)

Variable	Media	n (total = 100)	Mín-Máx	DE	cfADN de FF (ng/μl) Media ± DE [95 % de IC]	valor p	
	<2	-	38	-	-	1,9 ± 2,0 [1,3-2,6]	0,62
	≥2	-	24	-	-	2,3 ± 3,5 [0,8-3,7]	NS
FIV	-	-	31	-	-	1,7 ± 2,4 [0,8-2,5]	0,44
ICSI	-	-	69	-	-	1,8 ± 2,2 [1,3-2,3]	NS

DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; FSH, hormona foliculoestimulante; LH, hormona luteinizante; E2, 17β-estradiol; AMH, hormona anti-Mülleriana; AFC, recuento de folículos antrales. *Número total de pacientes <100. Valores p: Prueba de Mann-Whitney.

Además, El cfADN también se cuantificó en depósitos de FF de 17 mujeres con SOP que se clasificaron de acuerdo con los criterios de Rotterdam (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 2004; 19: 41-7). Las características clínicas de los pacientes con SOP se informan por separado en la Tabla S1.

El consentimiento informado por escrito de cada paciente para la recogida/análisis de muestras de FF se obtuvo el día de la recuperación de los ovocitos. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Regenerativa y Bioterapia y los métodos se realizaron de acuerdo con las directrices aprobadas.

Protocolo de fertilización *in vitro* y recogida de muestras de fluido folicular

Cuarenta y ocho pacientes recibieron un protocolo con agonistas de GnRH diario (Decapeptyl, IpsenPharma) y las demás un protocolo con antagonistas. Estos dos protocolos incluían la estimulación ovárica mediante FSH recombinante (r-FSH) (Puregon, MSD, Courbevoie, Francia). La respuesta ovárica a la estimulación se monitorizó cuantificando el nivel de E2 en suero y mediante la evaluación por ultrasonidos del crecimiento folicular y endometrial. La duración de la estimulación ovárica fue de 10 ± 1,2 días y la dosis total de gonadotropina fue de 2414,7 ± 932,5 UI/l (media ± DE) (Tabla 2). La ovulación se desencadenó mediante una única inyección de 250 μg de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Ovitrelle, Merck Serono, Lyon, Francia), cuando al menos tres folículos alcanzaron el diámetro de 17 mm o más en el examen por ultrasonidos.

Tabla 2: Nivel de cfADN en depósitos de fluido folicular de acuerdo con protocolos de EOC y respuesta ovárica a la estimulación.

Variable	Media	n (total = 100)	Mín-Máx	DE	cfADN de FF (ng/μl) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
Protocolo con agonistas**	-	48	-	-	1,4 ± 2,0 [0,9-2,0]	0,09
Protocolo con antagonistas	-	50	-	-	1,8 ± 1,8 [1,3-2,3]	NS
Tratamiento de estimulación ovárica						
Días de estimulación	10 -	-	7-14	1,2	-	-
7-10	-	71	-	-	1,5 ± 1,9 [1,0-1,9]	0,008
>10	-	29	-	-	2,4 ± 2,8 [1,4-3,5]	
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2414,7	-	875-4950	932,5	-	-
<3000	-	66	-	-	1,5 ± 2,1 [1,0-2,0]	0,01
≥3000	-	34	-	-	2,2 ± 2,3 [1,4-3,0]	
Protocolo con agonistas						
Días de estimulación	10	-	8-14	1,1		
8-10	-	37	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,4]	0,05
>10	-	11	-	-	2,7 ± 3,6 [0,3-5,1]	NS

25

(continuación)

Variable	Media	n (total = 100)	Mín-Máx	DE	cfADN de FF (ng/μl) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2324	-	900-4200	797,8		
<3000	-	34	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,5]	0,049
≥3000	-	14	-	-	2,4 ± 3,2 [0,5-4,2]	
Protocolo con antagonistas						
Días de estimulación	10	-	7-13	1,2		
7-10	-	33	-	-	1,5 ± 1,6 [1,0-2,1]	0,11
>10	-	17	-	-	2,2 ± 2,3 [1,0-3,4]	NS
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2475,5	-	875-4950	982,7		
<3000	-	31	-	-	1,6 ± 2,0 [0,9-2,3]	0,13
≥3000	-	19	-	-	2,0 ± 1,6 [1,3-2,8]	NS
Respuesta hormonal ovárica en el desencadenamiento de la ovulación						
Nivel máximo de E2 (pg/ml)	1793,2	-	341-4768	799	-	-
1000-2000	-	56	-	-	1,8 ± 2,1 [1,2-2,3]	ref
<1000	-	12	-	-	2,4 ± 3,5 [0,2-4,6]	0,71 NS
>2000	-	32	-	-	1,4 ± 1,8 [0,8-2,1]	0,23 NS
Respuesta hormonal ovárica en el desencadenamiento de la ovulación						
Nivel de progesterona (ng/ml)	0,8	-	0,1-1,6	0,3	-	-
<1	-	76	-	-	1,7 ± 2,1 [1,2-2,2]	0,82 NS
≥1	-	24	-	-	1,8 ± 2,6 [0,7-2,9]	
Nivel de LH (UI/l)	2,0	-	0,1-6,0	1,5	-	-
<2	-	38	-	-	1,9 ± 2,0 [1,3-2,6]	0,62 NS
≥2	-	24	-	-	2,3 ± 3,5 [0,8-3,7]	
E2, 17β-estradiol; LH, hormona luteinizante; FIV, fertilización <i>in vitro</i> ; ICSI, inyección intracitoplasmática de espermatozoides. **excepto dos estimulaciones ováricas leves. Valores p: Prueba de Mann-Whitney.						

La recuperación de ovocitos se realizó mediante aspiración transvaginal guiada por ultrasonidos 36 h después de la administración de hCG y todos los folículos se aspiraron sin enjuagar. Se agruparon todas las muestras de FF recogidas del mismo paciente y se aislaron los complejos cúmulo-ovocito para procedimientos convencionales de FIV o ICSI.

Antes de la ICSI, se eliminaron las células del cúmulo y coronales para evaluar la tasa de madurez de los ovocitos. En promedio, se obtuvieron $9,5 \pm 4,7$ ovocitos (promedio ± DE) (Tabla S2) y se mantuvieron individualmente en microgotas de 30 μl de medio de cultivo (Vitrolife) en aceite, a 37 °C, en O₂ al 5 %, CO₂ al 6 %, N₂ al 89 % y en atmósfera húmeda. Los ovocitos se consideraron fertilizados normalmente si se observaron dos pronúcleos y dos cuerpos polares 18-20 h después de la microinyección o inseminación. La escisión temprana se comprobó 25 o 27 h después de la microinyección o inseminación, respectivamente. Los días 2 y 3, la morfología del embrión se evaluó mediante la observación microscópica de los criterios morfológicos, tal como el número de blastómeros, la regularidad de los blastómeros y la tasa de fragmentación. La calidad del embrión se clasificó de 1 a 4, como se describe en la Tabla S3. Un embrión de alta calidad (grado 1 y 2) se definió como un embrión con 4-5 o 6-8 blastómeros regulares, el día 2 o 3, respectivamente, y que contenía menos del 20 % de fragmentos. El día 3, se seleccionaron embriones de alta calidad para transferencia o congelación, mientras que los demás se cultivaron hasta el día 5 y se congelaron por vitrificación (recomendación de Irvine Scientific), según su calidad, evaluada mediante puntuación de Gardner (Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. La puntuación de blastocitos afecta a la implantación y el resultado del embarazo: hacia una única transferencia de blastocitos. Fertil Steril 2000; 73: 1155-8). Cuatro semanas después de la transferencia, se confirmó la gestación clínica por la presencia de al menos un saco gestacional y la visualización de la actividad del corazón embrionario en el examen por ultrasonidos.

25 Preparación de fluido folicular

Se juntaron todas las muestras de FF del mismo paciente y se centrifugó un volumen de 15 ml a 3000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0,45 μm para eliminar los restos celulares y a continuación se almacenaron a -80 °C hasta la cuantificación de cfADN. Se recolectaron un total de 117 depósitos de FF para este estudio.

Extracción y cuantificación de ADN libre de células mediante ALU-qPCR

Se prepararon depósitos de FF para la cuantificación de cfADN como se informó previamente (Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, *et al.* Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006; 52: 1062-9). Específicamente, 20 μ l de cada depósito de FF se digirieron con 16 μ g de proteinasa K (PK) (Qiagen) en 20 μ l de tampón (25 ml/l de Tween 20, 50 mmol/l de Tris y 1 mmol/l de EDTA) a 50 °C durante 20 min, seguido de inactivación por calor de PK e insolubilización a 95 °C durante 5 min. Después de la centrifugación a 10 000 g durante 5 min, se retiraron los sobrenadantes y se almacenaron a -80 °C para la cuantificación de cfADN.

El cfADN se cuantificó mediante qPCR, usando cebadores ALU 115 (Umetani *et al.*, 2006). Cada reacción de ALU-qPCR incluyó 1 μ l del depósito de FF digerido con PK y una mezcla de reacción que contenía 0,25 μ M de cebadores ALU 115 directos e inversos y 5 μ l de mezcla maestra 2X LightCycler@480 SYBR Green I (Roche Applied Science, Alemania). La concentración de cfADN en depósitos de FF se determinó utilizando una curva estándar obtenida por diluciones sucesivas de ADN genómico (Umetani *et al.*, 2006). Se integró un control negativo (sin plantilla) en cada placa de qPCR y cada depósito de FF se analizó por cuadruplicado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado para cada variable. Los datos paramétricos continuos se presentan como media \pm desviación estándar (DE) y las variables categóricas como números y porcentajes. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney y las correlaciones de Spearman para comparar los niveles de cfADN de acuerdo con variables cuantitativas, basándose en la normalidad de la distribución evaluada usando la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó un análisis multivariado para modelar la probabilidad clínica de embarazo. Se ajustó un modelo de regresión logística en el que se incluyeron todas las variables asociadas con un valor p inferior a 0,20 en el análisis univariado. A continuación, un procedimiento por etapas permitió obtener el modelo multivariado final. La capacidad del nivel de cfADN de FF para predecir el resultado de embarazo clínico se determinó mediante la construcción de la curva operativa del receptor (ROC) y el cálculo del área bajo la curva (AUC) con intervalos de confianza (IC) del 95 %. Se calcularon la sensibilidad y la especificidad para el punto de corte óptimo. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software R (versión 2.15.2). Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$.

Resultados

Nivel de ADN libre de células en depósitos de FF en relación con el estado de la reserva ovárica y la duración de la infertilidad

La concentración de cfADN en los depósitos de FF de las 17 pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) fue significativamente mayor que en los depósitos de FF de pacientes con reserva ovárica normal ($n = 94$) ($2,9 \pm 3,1$ ng/ μ l frente a $1,7 \pm 2,3$ ng/ μ l, $p = 0,049$) (figura 8). En general, los niveles de cfADN fueron significativamente más altos en los depósitos de FF de pacientes con trastornos de la reserva ovárica (incluyendo LFOR y SOP) que en los depósitos de FF de mujeres con reserva ovárica normal ($2,7 \pm 2,7$ ng/ μ l frente a $1,7 \pm 2,3$ ng/ μ l, $p = 0,03$) (figura 5A). Dado el perfil clínico específico del SOP, se decidió excluir a estas 17 pacientes del análisis posterior. Además, las concentraciones de cfADN fueron significativamente más altas en los depósitos de FF de pacientes con AFC bajo (<10) que en muestras de mujeres con AFC normal (≥ 10) ($2,3 \pm 2,6$ ng/ μ l frente a $1,5 \pm 2,2$ ng/ μ l, respectivamente, $p = 0,04$) (figura 5B, panel izquierdo y Tabla 1). Asimismo, el nivel de cfADN de FF tendió a ser más alto en mujeres con una concentración en suero de AMH muy baja el día 3 del ciclo menstrual (≤ 1 ng/ml) que en aquellas con AMH >1 ng/ml ($4,3 \pm 5,0$ ng/ μ l frente a $1,6 \pm 2,0$ ng/ μ l, respectivamente, $p = 0,06$) (figura 5B, panel derecho y Tabla 1). Finalmente, los niveles de cfADN de FF aumentaron progresivamente con la duración de la infertilidad y fueron significativamente más altos en pacientes que habían estado intentando concebir durante más de cinco años en comparación con las mujeres que lo intentaron solo durante un año ($2,9 \pm 3,8$ ng/ μ l frente a $1,1 \pm 1,6$ ng/ μ l, $p = 0,049$) (figura 5C y Tabla 1).

Concentración de ADN libre de células en depósitos de fluido folicular de acuerdo con el protocolo de EOC y la respuesta ovárica

El nivel de cfADN de FF no varió significativamente entre las mujeres que recibieron agonistas de GnRH y las tratadas con antagonistas (Tabla 2). Por otro lado, fue significativamente mayor después de una estimulación ovárica prolongada (>10 días) que después de un tratamiento corto (7-10 días) ($2,4 \pm 2,8$ ng/ μ l frente a $1,5 \pm 1,9$ ng/ μ l, $p = 0,008$) (figura 6A y Tabla 2). Asimismo, el análisis de correlación de Spearman mostró que el nivel de cfADN de FF se correlacionó significativa y positivamente con la duración de la estimulación ovárica ($r = 0,2$; $p = 0,04$). Además, el nivel de cfADN fue significativamente mayor en los depósitos de FF de mujeres que recibieron una dosis total alta de gonadotropinas (≥ 3000 UI/l) que en las mujeres tratadas con dosis más bajas (<3000 UI/l) ($2,2 \pm 2,3$ ng/ μ l frente a $1,5 \pm 2,1$ ng/ μ l, $p = 0,01$) (figura 6B y Tabla 2). Se obtuvo un resultado similar cuando solo se consideraron las pacientes que recibieron un protocolo con agonistas ($2,4 \pm 3,2$ ng/ μ l frente a $1,1 \pm 1,1$ ng/ μ l, $p = 0,049$) (Tabla 2). Además, los depósitos de FF de pacientes con un número bajo de ovocitos recuperados (≤ 6) tenían una concentración de cfADN

significativamente mayor que los de mujeres con un número mayor de ovocitos recuperados (>6) ($2,8 \pm 3,5$ ng/μl frente a $1,4 \pm 1,5$ ng/μl, $p = 0,045$) (figura 6C y Tabla S2).

Concentración de ADN libre de células en depósitos de fluido folicular y resultados embrionarios

5 El día 2 después de la fertilización, se encontró que las cohortes de ovocitos que dieron lugar a un pequeño número de embriones (≤ 2 embriones) estaban relacionadas con depósitos de FF con un nivel de cfADN significativamente más alto en comparación con las cohortes de ovocitos de las que se obtuvieron al menos tres embriones ($2,5 \pm 2,9$ ng/μl frente a $1,6 \pm 2,0$ ng/μl, respectivamente, $p = 0,03$) (figura 7A y Tabla 3). Además, los embriones de $1,8 \pm 1,9$ y $1,5 \pm 1,5$ (media \pm DE) de cada cohorte de embriones (es decir, los embriones obtenidos para cada paciente) se consideraron de alta calidad (grado 1 y 2) el día 2 y el día 3, respectivamente. En estas primeras etapas de escisión, la concentración de cfADN fue significativamente mayor en los depósitos de FF relacionados con cohortes de embriones que incluían solo embriones de mala calidad (grados 3 y 4), en comparación con los relacionados con cohortes con al menos un embrión de alta calidad (el día 2: $3,0 \pm 3,4$ ng/μl frente a $1,3 \pm 1,5$ ng/μl, $p = 0,002$; el día 3: $2,5 \pm 3,0$ ng/μl frente a $1,4 \pm 1,7$ ng/μl, $p = 0,006$, respectivamente) (figura 7B y 7C, paneles izquierdos y Tabla 3). Asimismo, el análisis de correlación de Spearman indicó que existían correlaciones significativas y negativas entre la concentración de cfADN de FF y el número de embriones de alta calidad (grados 1 y 2) los días 2 y 3 ($r = -0,21$, $p = 0,04$; $r = -0,21$; $p = 0,04$, respectivamente). Además, el nivel de cfADN fue significativamente más alto en los depósitos de FF relacionados con cohortes de embriones con menos del 20 % de embriones de alta calidad los días 2 y 3 en comparación con los relacionados con cohortes de embriones que incluían más del 20 % de embriones de alta calidad (día 2: $2,5 \pm 3,1$ ng/μl frente a $1,3 \pm 1,5$ ng/μl, $p = 0,04$; día 3: $2,4 \pm 3,0$ ng/μl frente a $1,3 \pm 1,4$ ng/μl, $p = 0,02$, respectivamente) (figura 7B y 7C, paneles derechos y Tabla 3). Además, la relación entre el número de embriones de grado 1-2 y el número total de embriones calculado los días 2 y 3 se correlacionó de manera significativa y negativa con el nivel de cfADN de FF ($r = -0,27$; $p = 0,01$ y $r = -0,23$; $p = 0,03$, respectivamente).

25 Teniendo en cuenta cada criterio morfológico individualmente el día 3, los niveles de cfADN tendían a ser más altos en los depósitos de FF relacionados con embriones con una tasa de fragmentación alta (≥ 20 %) que con una tasa de fragmentación baja (<20 %) ($2,6 \pm 3,5$ ng/μl frente a $1,4 \pm 1,3$ ng/μl, respectivamente, $p = 0,18$) (figura 7D, panel izquierdo y Tabla 3). Además, se calculó la relación entre el número total de blastómeros y el número total de embriones para cada cohorte de embriones para estimar la cinética de desarrollo global. El día 3, los niveles de cfADN fueron significativamente más altos en los depósitos de FF correspondientes a las cohortes de embriones con una relación baja del número total de blastómeros/número total de embriones (<6; desarrollo retardado) que en aquellos con una cinética de desarrollo normal (relación entre 6 y 8) ($2,8 \pm 2,7$ ng/μl frente a $1,8 \pm 2,8$ ng/μl, respectivamente, $p = 0,02$) (figura 7D, panel derecho y Tabla 3).

Tabla 3: Niveles de cfADN en los depósitos de fluido folicular de acuerdo con el resultado del desarrollo embrionario en las primeras etapas (día 2 y día 3).

Resultado del desarrollo embrionario	Media	DE	n	cfADN de FF (ng/μl)	valor p
				Media \pm DE [95 % de IC]	
El día 2					
Número total de embriones	5,3	3,7	-	-	-
≤ 2	-	-	20	$2,5 \pm 2,9$ [1,2-3,9]	0,03
>2	-	-	78	$1,6 \pm 2,0$ [1,1-2,0]	
Embriones de grado 1-2	1,8	1,9	-	-	-
Ninguno grado 1-2	-	-	26	$3,0 \pm 3,4$ [1,7-4,4]	0,002
≥ 1 grado 1-2	-	-	65	$1,3 \pm 1,5$ [0,9-1,4]	
Embriones de grado 1-2/todos los embriones	0,3	0,28	-	-	-
relación <0,2	-	-	34	$2,5 \pm 3,1$ [1,5-3,6]	0,04
relación $\geq 0,2$	-	-	57	$1,3 \pm 1,5$ [0,9-1,7]	
El día 3					
Embriones de grado 1-2	1,5	1,5	-	-	-
Ninguno grado 1-2	-	-	32	$2,5 \pm 3,0$ [1,4-3,6]	0,006
≥ 1 grado 1-2	-	-	59	$1,4 \pm 1,7$ [1,0-1,8]	

(continuación)

Resultado del desarrollo embrionario	Media	DE	n	cfADN de FF (ng/μl)	valor p
Embriones de grado 1-2/todos los embriones	0,29	0,3	-	-	-
relación <0,2	-	-	39	2,4 ± 3,0 [1,4-3,4]	0,02
relación ≥0,2	-	-	52	1,3 ± 1,4 [0,9-1,7]	
% de fragmentación	0,19	0,11	-	-	-
% de fragmentación <20	-	-	60	1,4 ± 1,3 [1,0-1,7]	0,18 NS
% de fragmentación ≥20	-	-	31	2,6 ± 3,4 [1,3-3,9]	
Número total de blastómeros/número total de embriones			-	-	-
relación = 6-8	-	-	45	1,8 ± 2,8 [1,0-2,6]	ref
relación <6	-	-	11	2,8 ± 2,7 [1,0-4,6]	0,02
relación >8	-	-	35	1,4 ± 1,2 [1,0-1,8]	0,39 NS

DE, desviación típica. Valores p: Prueba de Mann-Whitney.

Valor predictivo del ADN libre de células en los depósitos de fluido folicular para el resultado de embarazo clínico

5

Después del ajuste para el rango de intentos de FIV/ICSI y el número de embriones, el nivel de cfADN de FF se asoció de forma significativa e independiente con el resultado de embarazo clínico [Relación de probabilidad ajustada: 0,69 [0,5; 0,96], p = 0,03] (Tabla 4). El área bajo la curva ROC, que cuantifica el potencial de predicción del embarazo clínico de la concentración de cfADN de FF, fue 0,73 [0,66-0,87] con un 88 % de especificidad y un 60 % de sensibilidad. Por otro lado, el número de embriones de alta calidad (grados 1 y 2) no predijo significativamente el resultado de embarazo clínico (p = 0,42), lo que sugiere que en nuestra población, el valor predictivo del nivel de cfADN de FF fue mayor que el número de embriones de primera calidad.

10

Tabla 4. Modelo logístico multivariado que muestra la predicción del embarazo clínico de acuerdo con el nivel de cfADN en los depósitos de fluido folicular.

15

Parámetros	OR en bruto [95 % de IC]	valor p	OR ajustada [95 % de IC]*	valor p
Probabilidad de obtener un embarazo clínico				
cfADN de FF (ng/μl)	0,75 [0,55; 1,03]	0,08	0,69 [0,5; 0,96]	0,03
Número de rango de FIV/ICSI = 1 frente a >1	2,5 [1,0; 6,27]	0,05	3,6 [1,3; 9,8]	0,01
Número de embriones	1,15 [1,0; 1,3]	0,04	1,18 [1,01; 1,37]	0,03
OR, Relación de probabilidad; *Ajustado al rango de intentos de FIV/ICSI y el número de embriones.				

Análisis

20

Este estudio demuestra que el contenido de cfADN en muestras de FF agrupadas de la misma paciente está relacionado significativamente con el estado de reserva ovárica de la mujer, lo que sugiere que un nivel alto de cfADN de FF podría reflejar un microambiente folicular deficiente. También muestra que los niveles de cfADN fueron significativamente más altos en los depósitos de FF después de una estimulación ovárica fuerte o prolongada que después de un tratamiento corto o una estimulación con dosis bajas de gonadotropinas. Finalmente, los datos indican que el cfADN de FF podría usarse para predecir el resultado de embarazo clínico. En conjunto, los resultados sugieren que la cuantificación de cfADN de FF podría considerarse para mejorar la estrategia y los resultados de la FIV.

25

30

La cantidad de cfADN fue significativamente mayor en los depósitos de FF de mujeres con una larga duración de la infertilidad (más de 5 años). La infertilidad prolongada se asocia a menudo con un mayor estrés en parejas infértiles (Chiba H, Mori E, Morioka Y, Kashiwakura M, Nadaoka T, Saito H, *et al.* Stress of female infertility: relations to length of treatment. Gynecol Obstet Invest 1997;43: 171-7; Lynch CD, Sundaram R, Maisog JM, Sweeney AM, Buck Louis GM. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort studythe LIFE

study. *Hum Reprod* 2014;29: 1067-75). Curiosamente, Curiosamente, un estudio reciente informó que el nivel de cfADN en sangre era más alto en pacientes sometidas a FIV y que sufrían estrés (Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Levitas E, Lunenfeld E, Douvdevani A, *et al.* Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. *Arch Womens Ment Health* 2014;17: 251-3). Por lo tanto, un periodo prolongado de estrés, causado por la ausencia de embarazo, podría conducir a un aumento de eventos apoptóticos en las células foliculares y, en última instancia, a niveles más altos de cfADN de FF. Además, se ha demostrado que las técnicas de relajación pueden ser beneficiosas durante el proceso de FIV, para reducir los niveles de cfADN en plasma y mejorar los resultados del embarazo (Czamanski-Cohen *et al.*, 2014).

Los niveles de cfADN fueron significativamente más altos en los depósitos de FF de mujeres que padecían SOP o, más generalmente, con trastornos de la reserva ovárica (SOP y LFOR). El SOP es la endocrinopatía más común en mujeres en edad reproductiva. Se han descrito diversas anomalías bioquímicas en este síndrome, tal como hiperinsulinemia, que conduce a niveles elevados de insulina sérica e hiperandrogenismo a través de la estimulación de la secreción de andrógenos ováricos (Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 219-31). Recientemente, se informó que una alta concentración de insulina promueve la apoptosis en células de la granulosa de ovario de rata cultivadas primarias (Ni XR, Sun ZJ, Hu GH, Wang RH. High Concentration of Insulin Promotes Apoptosis of Primary Cultured Rat Ovarian Granulosa Cells Via Its Increase in Extracellular HMGB1. *Reprod Sci* 2015; 22: 271-7). Por lo tanto, Por lo tanto, el alto contenido de cfADN de FF en pacientes con SOP podría explicarse por un aumento de la apoptosis en las células de la granulosa debido a la hiperinsulinemia. Además, informamos previamente que los niveles de cfADN son significativamente más altos en folículos pequeños en comparación con los grandes (Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejeux E, *et al.* Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod* 2014;29: 2661-9). El SOP se asocia con anomalías de la madurez folicular, tal como un mayor número de pequeños folículos preantrales (Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, *et al.* The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20: 370-85; Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2008;14: 367-78). Estos pequeños folículos podrían contener altos niveles de cfADN, lo que explica por qué la concentración de cfADN es alta en los depósitos de FF de pacientes con SOP. También se muestra que la concentración de cfADN de FF es alta en mujeres con reserva ovárica deficiente (AFC <10 o AMH ≤1 ng/ml) (Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010;93: 855-64; Ficicioglu C, Cenksoy PO, Yildirim G, Kaspar C. Which cut-off value of serum anti-Müllerian hormone level can predict poor ovarian reserve, poor ovarian response to stimulation and *in vitro* fertilization success? A prospective data analysis. *Gynecol Endocrinol* 2014;30: 372-6). Dado que la disminución de la reserva ovárica es causada por la apoptosis acelerada en el ovario (Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 1996;51: 314-23; Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1996;66: 593-8; Vital Reyes VS, Téllez Velasco S, Hinojosa Cruz JC, Reyes Fuentes A. [Ovarian apoptosis]. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69: 101-7), esto podría conducir a una importante liberación de fragmentos de ADN dentro de los folículos ováricos. Además, para optimizar su respuesta ovárica, las mujeres con escasa reserva ovárica reciben grandes dosis de gonadotropina y el día de la recuperación de los ovocitos, el médico intentará aspirar con más asiduidad los folículos más pequeños para aumentar el número de ovocitos. Por lo tanto, en este caso, los fluidos foliculares de folículos más pequeños se volverán proporcionalmente más representados en el grupo que en respondedores normales con una cohorte sincronizada de folículos más grandes. Estas observaciones sugieren que el contenido de cfADN en los folículos antrales podría depender de (i) el estado ovárico basal (aumento de cfADN en el caso de disfunción ovárica) y/o de (ii) la madurez folicular después del reclutamiento mediante protocolos de EOC.

De hecho, el nivel de cfADN de FF fue significativamente mayor después de un protocolo de EOC prolongado (>10 días) o después de la administración de altas dosis de gonadotropinas (≥3000 UI/l). Además, el estado de la reserva ovárica influye fuertemente en la respuesta ovárica a los protocolos de EOC (Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, *et al.* The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20: 370-85; Younis JS, Skournik A, Radin O, Haddad S, Bar-Ami S, Ben-Ami M. Poor oocyte retrieval is a manifestation of low ovarian reserve. *Fertil Steril* 2005;83: 504-7; La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20: 124-40). Por ejemplo, actualmente se recomienda la estimulación ovárica fuerte o prolongada para mujeres con riesgo de respuesta ovárica deficiente (Ficicioglu C, Cenksoy PO, Yildirim G, Kaspar C. Which cutoff value of serum anti-Müllerian hormone level can predict poor ovarian reserve, poor ovarian response to stimulation and *in vitro* fertilization success? A prospective data analysis. *Gynecol Endocrinol* 2014;30: 372-6; Lan VT, Linh NK, Tuong HM, Wong PC, Howles CM. Anti-Müllerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. *Reprod Biomed Online* 2013;27: 390-9). Por consiguiente, las pacientes que recibieron estimulación prolongada o dosis altas de gonadotropina se superponen parcialmente con pacientes con niveles altos de cfADN intrafolicular relacionados con una reserva ovárica baja. Además, un nivel alto de cfADN de FF después de una estimulación prolongada o fuerte podría representar un efecto real de los protocolos de EOC, con posibles consecuencias perjudiciales en los resultados de la FIV/ICSI. Por ejemplo, fuertes dosis suprafisiológicas de gonadotropina podrían inducir la apoptosis de las células foliculares (Liu S, Feng HL, Marchesi D, Chen ZJ, Hershlag A. Dose-dependent effects of gonadotropin on oocyte developmental competence and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2011;23: 990-6), lo

que sugiere la necesidad de adaptar específicamente los tratamientos de estimulación al perfil de cada paciente. Por el contrario, el contenido de cfADN de FF no difirió de acuerdo con el tipo de protocolos de EOC (agonista frente a antagonista). En consonancia, se detectaron niveles similares de apoptosis en células de la granulosa expuestas a tratamientos con agonistas o antagonistas (Lavorato HL, Oliveira JB, Petersen CG, Vagnini L, Mauri AL, Cavagna M, *et al.* GnRH agonist versus GnRH antagonist in IVF/ICSI cycles with recombinant LH supplementation: DNA fragmentation and apoptosis in granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;165: 61-5).

La concentración de cfADN de FF también fue significativamente mayor en pacientes de las que se recuperaron pocos ovocitos (≤ 6) (Broekmans FJ, Verweij PJ, Eijkemans MJ, Mannaerts BM, Witjes H. Prognostic models for high and low ovarian responses in controlled ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod* 2014;29: 1688-97) o se obtuvieron pocos embriones (≤ 2). Esta observación confirma que un nivel alto de cfADN de FF se asocia significativamente con una respuesta ovárica deficiente a los protocolos de EOC. Además, sugiere que el nivel de cfADN de FF está relacionado tanto con la cantidad como con la calidad de los ovocitos recuperados, dos características clave para la producción de embriones. De hecho, se reconoce ampliamente que el entorno folicular influye fuertemente en la competencia del desarrollo de los ovocitos (Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martínez F, Bernabeu R, *et al.* Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002; 17: 1017-22; Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online* 2006;12: 500-6; Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7: 40; Carpintero NL, Suárez OA, Mangas CC, Varea CG, Rioja RG. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. *J Hum Reprod Sci* 2014; 7: 187-93). Por este motivo, el cfADN de FF podría representar un nuevo biomarcador prometedor de la calidad del microambiente folicular. Un microambiente folicular deficiente, con altos niveles de cfADN, podría afectar a la capacidad de desarrollo de los ovocitos y el desarrollo embrionario, lo que provocaría el fracaso de la FIV. Dado que se encuentra que la estimulación ovárica fuerte o prolongada conduce a un nivel alto de cfADN de FF, podría recomendarse adaptar la duración de la estimulación y la dosis de gonadotropina a cada paciente para limitar la producción de cfADN de FF. De hecho, la conservación del microambiente folicular es primordial para obtener ovocitos competentes y, por lo tanto, embriones competentes.

Este estudio confirma la observación anterior (Scalici *et al.*, 2014) de que los niveles de cfADN en muestras de FF se correlacionan significativamente con la calidad del embrión durante el desarrollo temprano, cuando los embriones dependen de la reserva materna de ovocitos (los días 2 y 3). De hecho, los niveles de cfADN fueron significativamente más altos en los depósitos de FF relacionados con las cohortes de ovocitos que dieron solo embriones de mala calidad, embriones con una alta tasa de fragmentación (≥ 20 %) o embriones con retraso en el desarrollo (relación del número total de blastómeros/número total de embriones < 6). Estos embriones de mala calidad provienen de cohortes de ovocitos rodeados de FF que contiene altos niveles de cfADN, lo que sugiere un efecto negativo de un entorno folicular rico en cfADN sobre la calidad del embrión (Scalici *et al.*, 2014). De acuerdo con estos resultados, el alto nivel de ADN mitocondrial en el medio de cultivo embrionario también se asoció significativamente con una alta tasa de fragmentación en las escisiones embrionarias tempranas (Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod* 2013;28: 2652-60).

Finalmente, el nivel de cfADN de FF en un modelo multivariado predijo de forma independiente y significativa el resultado de embarazo clínico con alta especificidad (88 %). El potencial predictivo del nivel de cfADN de FF fue mayor que el del número de embriones de alta calidad (según criterios morfológicos). Por lo tanto, este modelo predictivo podría usarse como una herramienta complementaria para determinar la probabilidad de éxito de la FIV. Recientemente, se informó una asociación significativa entre la relación ADN mitocondrial/ADN genómico en medio de cultivo de embriones y el resultado de la implantación (Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol Hum Reprod* 2014;20: 1238-46). Además, Czamanski-Cohen *et al.* encontraron un nivel más alto de cfADN en muestras de suero de pacientes con bajas tasas de embarazo después de la FIV, lo que sugiere que los fragmentos de ADN circulantes de células maternas apoptóticas podrían tener un efecto dañino. Dado que hay un movimiento de componentes fluidos entre los folículos y la vasculatura (Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 2010;82: 1021-9), estos fragmentos podrían provenir de eventos apoptóticos masivos que se producen en los ovarios y contribuyen a aumentar el nivel de cfADN en muestras de FF.

Además, la cuantificación de cfADN en depósitos de FF, rápida y fácil de realizar, podría proporcionar una imagen general de la calidad del microambiente folicular, influyendo en los resultados de la FIV. Por lo tanto, esta cuantificación podría asociarse con el método basado en la morfología para mejorar la selección de embriones para reemplazo o congelación y, en consecuencia, la posibilidad de éxito de la FIV. Este biomarcador podría constituir una herramienta complementaria para mejorar el manejo de la infertilidad femenina y desarrollar un programa de atención personalizada.

Tabla S1: Características clínicas y respuesta ovárica a la estimulación de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) (n = 17).

Variable	Media	n (total = 17)	DE
Edad (años)	33,5	-	4,2
<37 años	-	14	-
≥37 años	-	3	-
IMC (kg/m ²)	26,7	-	5,9
18,5 ≤ IMC <25	-	6	-
IMC <18,5	-	1	-
25 ≤ IMC <30	-	5	-
IMC ≥30	-	5	-
Duración de la infertilidad (años)	3,8	-	1,3
1	-	1	-
2-4	-	12	-
≥5	-	4	-
Infertilidad primaria	-	6	-
Infertilidad secundaria	-	11	-
Número de ciclo de FIV/ICSI	1,9	-	1,2
1	-	7	-
>1	-	10	-
Evaluación inicial			
FSH (UI/l)	5,8	-	1,8
LH (UI/l)	6,9	-	3,5
E2 (pg/ml)	36,3	-	15,1
AMH (ng/ml)	7,4	-	3,5
AFC	26	-	11,5
Protocolo con agonistas	-	13	-
Protocolo con antagonistas	-	4	-
Días de estimulación	10	-	1,7
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	1917,2	-	751,7
Respuesta hormonal ovárica en el desencadenamiento de la ovulación			
Nivel máximo de E2 (pg/ml)	2068,9	-	847,2
Nivel de progesterona (ng/ml)	0,7	-	0,4
Nivel de LH (UI/l)	2,4	-	1,8

DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; FSH, hormona foliculoestimulante; LH, hormona luteinizante; E2, 17β-estradiol; AMH, hormona anti-Mülleriana; AFC, recuento de folículos antrales; FIV, fertilización *in vitro*; ICSI, inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Tabla S2: Nivel de cfADN en depósitos de fluido folicular de acuerdo con la recuperación de ovocitos, la fertilización y resultados de la escisión temprana.

Recuperación de ovocitos, fertilización y resultados de una escisión temprana	Media	DE	n	cfADN de FF (ng/ml) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
Ovocitos	9,5	4,7	-	-	-
≤6	-	-	25	2,8 ± 3,5 [1,4-4,2]	0,045
>6	-	-	75	1,4 ± 1,5 [1,0-1,7]	
Zona pelúcida vacía	0,4	0,8	-	-	-
Zona pelúcida no vacía	-	-	87	1,5 ± 1,8 [1,1-1,9]	0,3 NS
≥1 Zona pelúcida vacía	-	-	24	2,4 ± 3,2 [1,2-3,7]	
Ovocitos maduros (MII)	7,2	4,1	-	-	-
<5	-	-	19	2,4 ± 3,1 [1,0-3,9]	0,25 NS
≥5	-	-	50	1,5 ± 1,6 [1,1-2,0]	
Ovocitos maduros/ovocitos	0,76	0,21	-	-	-
relación <0,75	-	-	26	1,5 ± 1,5 [0,8-2,1]	0,45 NS
relación ≥0,75	-	-	43	2,0 ± 2,4 [1,2-2,7]	
Ovocitos inmaduros (GV, MI)	1,8	1,9	-	-	-
<3	-	-	67	1,9 ± 2,5 [1,3-2,5]	0,97 NS
≥3	-	-	33	1,4 ± 1,4 [1,0-1,9]	

(continuación)

Recuperación de ovocitos, fertilización y resultados de una escisión temprana	Media	DE	n	cfADN de FF (ng/ml) Media ± DE [95 % de IC]	valor p
Ovocitos inmaduros/ovocitos	0,18	0,18	-	-	-
relación <0,25	-	-	70	1,9 ± 2,5 [1,3-2,5]	0,26 NS
relación ≥0,25	-	-	30	1,3 ± 1,5 [0,8-1,9]	
Ovocitos atréticos	0,3	0,8	-	-	-
Ovocito atrético	-	-	85	1,7 ± 2,3 [1,2-2,3]	0,44 NS
≥1 ovocito atrético	-	-	15	1,7 ± 1,3 [1,0-2,4]	
Ovocitos atréticos/ovocitos	0,02	0,07	-	-	-
relación ≤0,1	-	-	88	1,7 ± 2,3 [1,2-2,2]	0,19 NS
relación >0,1	-	-	12	1,9 ± 1,3 [1,0-2,7]	
Fertilización					
% de fertilización por FIV/ICSI	0,65	0,3	-	-	-
<0,65	-	-	20	1,9 ± 1,7 [1,2-2,7]	
≥0,65	-	-	79	1,7 ± 2,4 [1,2-2,2]	0,27 NS
25-27 horas después de la fertilización					
Escisión temprana	1,8	2,6	-	-	-
No	-	-	36	1,9 ± 2,7 [1,0-2,9]	
≥1	-	-	55	1,7 ± 2,0 [1,1-2,2]	0,72 NS
Escisión temprana/2PN	0,41	0,88	-	-	-
relación ≤0,5	-	-	68	2,0 ± 2,6 [1,4-2,6]	
relación >0,5	-	-	21	1,0 ± 0,8 [0,7-1,4]	0,18 NS
% de fragmentación	0,07	0,09	-	-	-
<10 %	-	-	31	1,3 ± 1,3 [0,9-1,8]	
≥10 %	-	-	24	2,1 ± 2,6 [1,0-3,2]	0,25 NS

DE, desviación estándar; MII, ovocito bloqueado en metafase II meiótica; GV, vesícula germinal; MI, ovocito bloqueado en metafase meiótica I; FIV, fertilización *in vitro*; ICSI, inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Valores p: Prueba de Mann-Whitney.

Tabla S3: Clasificación de la calidad embrionaria el día 2 y el día 3 después de la fertilización.

Criterios morfológicos	grado			
	1	2	3	4
Número de blastómeros				
Día 2	4-5	4-5	4-5	<4 o >5
Día 3	6-8	6-8	6-8	<6 o >8
Regularidad de los blastómeros	Regular	Regular	Regular o irregular	Regular o irregular
Tasa de fragmentación (%)	≤10	10-19	20-40	<40
				>40

La calidad del embrión se clasificó de 1 a 4 (1-2 para embriones de alta calidad; 3-4 para embriones de mala calidad), basándose en los siguientes criterios morfológicos: número de blastómeros, regularidad de los blastómeros y tasa de fragmentación

5 EJEMPLO 3:**Materiales y métodos****Pacientes**

10 Este estudio prospectivo incluyó a 131 mujeres que se sometieron a FIV convencional (n = 32) o ICSI (n = 99) en el Departamento ART-PGD del Hospital Universitario de Montpellier, Francia. Su edad media fue 34,7 ± 4,5 años (media ± DE; rango: 19 a 43 años) y el índice de masa corporal (IMC) fue de 23,4 ± 4,5 kg/m² (media ± DE; rango: 17 y 37,5 kg/m²) (Tabla 7). La duración de la infertilidad fue de 3,6 ± 1,5 años (media ± DE) y la infertilidad fue primaria en 78 parejas y secundaria en las otras 53. Se detectaron factores masculinos, femeninos y mixtos en el 31,3 %, 37,4 % y el 25,2 % de los casos, respectivamente, mientras que la infertilidad fue inexplicable en el 6,1 % de las parejas. Este fue el primer intento de FIV o ICSI para el 38,9 % de ellos, mientras que el 61,1 % ya se había sometido al menos a un ciclo (número medio de ciclos ± DE: 2,1 ± 1,3). Entre las 131 mujeres, 91 tenían una reserva ovárica normal y 10 tenían LFOR, basándose en el nivel en suero de AMH y AFC, evaluadas el día 3 del ciclo menstrual. Las otras 30 mujeres tenían SOP, de acuerdo con los criterios de Rotterdam (Rotterdam, 2004). También se midieron los niveles en suero de hormona foliculoestimulante (FSH) basal, hormona luteinizante (LH) y 17βestradiol (E2) en cada paciente el día 3 del ciclo menstrual. Las características clínicas de todas las mujeres y de los tres grupos (reserva ovárica normal, SOP y LFOR) se detallan en la Tabla 7.

Los pacientes fueron informados sobre la recogida/análisis de muestras de FF y dieron su consentimiento informado por escrito el día de la recuperación de ovocitos. La Junta de Revisión Institucional local aprobó esta investigación.

Procedimiento FIV

5 Se administró diariamente un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Decapeptyl, IpsenPharma) a 63 mujeres y se utilizó un protocolo con antagonistas en 64. Los cuatro pacientes restantes recibieron un tratamiento suave y, por lo tanto, fueron excluidas del análisis sobre el efecto del tratamiento en la expresión de miARN. Estos dos protocolos incluían EOC con dos tipos de gonadotropinas: FSH recombinante (r-FSH) (Puregon, MSD, Courbevoie, Francia o GonalF, Merck Serrono, Lyon, Francia), o gonadotropina menopáusica humana (hMG) altamente purificada (Menopur, Ferring, Gentilly, Francia). La duración de la EOC fue de $10,5 \pm 1,4$ días y la dosis total de gonadotropina fue de 2501 ± 673 UI/l (media \pm DE) (Tabla 7). La respuesta ovárica a la estimulación se monitorizó midiendo la concentración en suero de E2 y mediante la evaluación por ultrasonidos del crecimiento folicular y endometrial. La ovulación se desencadenó con una inyección de 250 μ g de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Ovitrelle, Merck Serono, Lyon, Francia) cuando al menos tres folículos alcanzaron el diámetro de 17 mm o más en el examen por ultrasonidos. En el día de desencadenamiento de la ovulación, también se evaluó la respuesta hormonal ovárica cuantificando los niveles en suero de E2, LH y progesterona (Tabla 7).

20 Los ovocitos se recuperaron mediante aspiración transvaginal guiada por ultrasonidos 36 h después de la inyección de hCG. Para cada paciente, se aspiraron todos los folículos sin enjuagar, se aislaron complejos cúmulo-ovocito para FIV o ICSI convencionales, y se recogieron todas las muestras de FF.

25 Antes de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, se evaluó la tasa de madurez de los ovocitos (77 %) después de la denudación. En promedio, se recogieron $7,6 \pm 4,5$ ovocitos (media \pm DE) y $6 \pm 3,7$ ovocitos maduros (MII) (media \pm DE) por paciente (Tabla 8). Los ovocitos se cultivaron individualmente en microgotas de 30 μ l de medio de cultivo (Vitrolife) en aceite a 37 °C en O₂ al 5 %, CO₂ al 6 % y N₂ al 89 %, en atmósfera húmeda. La presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares, 18-20 h después de la microinyección o la inseminación confirmó que los ovocitos cultivados se fertilizaron normalmente (tasa de fertilización general = 64 %). Para cada paciente, se obtuvieron $4,1 \pm 3,3$ embriones de los ovocitos fertilizados el día 2. Entre estos embriones, $1,3 \pm 1,4$ se escindieron temprano a las 25 o 27 h después de la microinyección o la inseminación, respectivamente. El día 3, la calidad del embrión se evaluó basándose en criterios morfológicos (número de blastómeros, regularidad de blastómeros y tasa de fragmentación). En promedio, $1,2 \pm 1,6$ embriones/paciente (media \pm DE) se consideraron de alta calidad porque contenían 6-8 blastómeros regulares y menos del 20 % de fragmentos. Uno o dos embriones de alta calidad se transfirieron al útero el día 3, mientras que los demás se cultivaron hasta el día 5. Los blastocitos se clasificaron de acuerdo con el sistema de puntuación desarrollado por Gardner (Gardner *et al.*, 2000). El día 5, solo los blastocitos expandidos (clasificados como grado 4 o 5) con masa celular interna y trofotodermo calificados como A o B se vitrificaron usando un sistema cerrado, siguiendo el procedimiento recomendado por Irvine Scientific. Cuatro semanas después de la transferencia de embriones, se confirmó el embarazo clínico mediante la observación de al menos un saco gestacional y de la actividad cardíaca embrionaria en el examen por ultrasonidos. Los resultados de la FIV/ICSI de todas las mujeres y en los tres grupos (reserva ovárica normal, SOP y LFOR) se informan en la Tabla 8.

Preparación de muestras de FF

45 El día de la recuperación de los ovocitos, se recogieron y combinaron todas las muestras de FF de un paciente (n = 131 depósitos). Se centrifugó un volumen de 15 ml de cada depósito a 3000 g durante 15 min. A continuación, se eliminaron los sobrenadantes, se filtraron a través de filtros de 0,45 μ m para eliminar los restos celulares y se almacenaron a -80 °C.

Extracción de miARN

50 Se usó el kit de ácido nucleico circulante de QIAamp® (ref. 55114; Qiagen) para el aislamiento y purificación de miARN circulantes de 3 ml de cada depósito de FF de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se mezclaron 3 ml de depósito de FF, 400 μ l de proteinasa K de Qiagen y 4,2 ml de tampón ACL mediante agitación vorticial de pulsos y se incubaron a 60 °C durante 30 min. Después de la incubación, se añadieron 9 ml de tampón ACB al lisado y se mezclaron mediante agitación vorticial de pulsos. A continuación, la mezcla se transfirió a una columna QIAamp Mini mediante presión de vacío para adsorber los miARN en una pequeña membrana de sílice. A continuación, cada membrana se lavó en tres etapas para eliminar los contaminantes residuales. Se eluyeron microARN circulantes de alta pureza en 40 μ l de tampón AVE.

60 Análisis de expresión de miARN de FF por RT-qPCR

65 Se generó ADN complementario (ADNc) usando el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan y cebadores de tallo-bucle específicos de miARN para let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140, miR-191 y miR-320a (ref 4427975, Life Technologies). La mezcla de reacción de 15 μ l contenía 5 μ l de depósito de FF, 0,15 μ l de dNTP 100 mM, 1,5 μ l de tampón 10xRT, 1 μ l de enzima MultiScribe RT (50 U/ μ l), 0,19 μ l de inhibidor de RNasa (20 U/ μ l), 4,16 μ l de agua sin nucleasa y 3 μ l de cebador Taqman RT. La transcripción inversa se realizó a 16 °C durante 30 min y después a 42 °C

durante 30 min, seguida de una etapa inactivado a 85 °C durante 5 min y una etapa de retención a 4 °C. La PCR cuantitativa se realizó por duplicado para cada muestra utilizando LightCycler 480® (Roche Applied Science, Alemania); se añadió un control negativo (agua) para cada depósito de FF. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 10 µl, que consistía en 3 µl de ADNc, 5 µl de Taqman Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) y 2 µl de cebador (Life Technologies). La mezcla se incubó en una placa de 384 pocillos, a 95 °C durante 10 min, seguido de 50 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Además, se usó miR-16 como control interno, debido a su estabilidad en los fluidos corporales (Kroh *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012), para normalizar los niveles de expresión de miARN. La expresión relativa de los seis miARN (let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140, miR-191 y miR-320a) en cada depósito de FF se calculó en relación con la de miR-16 utilizando la ecuación $2^{-\Delta Ct}$, en la que ΔCt se determinó mediante la fórmula: Ct miARN diana - Ct miR-16.

Se eligieron estos seis miARN porque estudios previos informaron que se expresan en FF (Sang *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015).

15 **Análisis de la ruta**

Se usó Pathway Studio® (Elsevier) para identificar los procesos biológicos en los que los miARN detectados en los depósitos de FF están involucrados en el sistema reproductor. Las rutas clave incluyeron el desarrollo folicular, la proliferación celular, la apoptosis, la esteroidogénesis, la meiosis y la implantación de embriones. Las interacciones entre algunos miARN y las hormonas esteroideas también se integraron en este análisis de rutas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado para cada variable. Los datos paramétricos continuos se presentan como la media \pm desviación estándar (DE) y las variables categóricas con números y porcentajes. Para las variables cuantitativas se usaron la prueba de Mann-Whitney, t de Student, Anova o Kruskal Wallis, basándose en la normalidad de la distribución, evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó un análisis multivariado para investigar la expresión diferencial de miARN relacionada con los trastornos de la reserva ovárica (SOP y LFOR). Se ajustó un modelo de regresión logística en el que se incluyeron todas las variables asociadas con un valor p inferior a 0,20 en el análisis univariado. A continuación, un procedimiento por etapas permitió obtener el modelo multivariado final. La capacidad de los niveles de miARN de FF para predecir trastornos de la reserva ovárica (SOP y LFOR), los blastocitos y resultados de embarazo clínico se evaluó mediante la construcción de las curvas de la característica operativa del receptor (ROC) y el cálculo del área bajo la curva ROC (AUC) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %. Se calculó la sensibilidad y la especificidad del punto de corte óptimo. Las pruebas estadísticas se realizaron con el software R (versión 2.15.2). Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$.

Resultados

40 **Expresión diferencial de miARN en muestras de FF de mujeres con SOP en comparación con mujeres con reserva ovárica normal**

La comparación de los perfiles de expresión mostró que miR-30a se regulaba positivamente de forma significativa ($p = 0,006$), mientras que miR-140 y let-7b se regulaban negativamente de forma significativa ($p = 0,01$ para ambos casos) en grupos de FF de pacientes con SOP en comparación con mujeres con reserva ovárica normal (figura 9). Además, estos tres miARN se asociaron de forma significativa e independiente con el SOP en el análisis multivariado (relación de probabilidad ajustada, AOR: 5,0 [1,86; 13,68], $p = 0,001$; 0,52 [0,29; 0,94], $p = 0,03$; 1,0 [0,99; 1,0], $p = 0,02$, respectivamente) (Tabla 5). A continuación, la sensibilidad y la especificidad de la relación entre la expresión diferencial de miR-30a, miR-140 y let-7b de FF y el SOP se determinaron usando el análisis de la curva ROC y calculando el AUC. Los valores de AUC para el rendimiento individual de los perfiles de expresión de miR-30a de FF, miR-140 de FF y let-7b de FF en la discriminación del SOP fueron 0,67 (0,57-0,76), 0,67 (0,57-0,76) y 0,67 (0,57-0,76) ($p = 0,02$, $p = 0,007$, $p = 0,003$), respectivamente (Tabla 6). Al combinar los tres miARN en el análisis multivariado, el valor de AUC aumentó a 0,83 (0,73-0,92) ($p < 0,0001$) (Tabla 6). Además, la sensibilidad y la especificidad de miR-30a de FF, miR-140 de FF y let-7b de FF fueron del 57,7 %, 57,7 % y del 53,9 % y del 85,1 %, 81,1 % y del 75,7 %, respectivamente (Tabla 6). La combinación de estos tres miARN aumentó la sensibilidad de la predicción al 70 % con una especificidad del 83,8 %. Estos resultados indican que la combinación de miR-30a, miR-140 y let-7b, que se expresan diferencialmente en muestras de FF de pacientes con SOP en comparación con mujeres con reserva ovárica normal, proporciona el valor de AUC más grande con alta sensibilidad y especificidad, y sugieren que estos tres miARN representan nuevos biomarcadores potenciales de SOP.

60 **Expresión diferencial de miARN en muestras de FF de mujeres con LFOR en comparación con mujeres con reserva ovárica normal**

La comparación de la expresión de ARNm en depósitos de FF de mujeres con LFOR y con reserva ovárica normal mostró que miR30a y miR-191 estaban regulados positivamente ($p = 0,01$ para ambos casos) en el grupo de LFOR en comparación con pacientes con reserva ovárica normal (figura 9A y 10D). Sin embargo, sólo se encontró una asociación significativa y positiva entre la expresión de miR-191 de FF y LFOR, utilizando un modelo de regresión

logística [relación de probabilidad en bruto, COR: 1,4 [1,03; 1,93], $p = 0,03$] (Tabla 5). Los valores de AUC de la potencia de discriminación individual de miR-30a y miR-191 de FF para la predicción de LFOR fueron 0,79 (0,68-0,87) y 0,77 (0,67-0,86) ($p < 0,0001$, $p = 0,002$), respectivamente (Tabla 6). La combinación de estos dos miARN mejoró la detección de LFOR y el AUC correspondiente alcanzó 0,84 (0,67-0,86) con un valor $p < 0,0001$ (Tabla 6). Además, esta combinación fue muy sensible (85,9 %) y específica (71,4 %) (Tabla 6), lo que sugiere que, conjuntamente, miR-30a y miR-191 son nuevos biomarcadores prometedores para la identificación de mujeres con LFOR.

Expresión diferencial de miARN de FF de acuerdo con el tratamiento con gonadotropinas y la respuesta ovárica.

La expresión de los seis miARN fue comparable en los depósitos de FF de mujeres que recibieron protocolos con agonistas o antagonistas. Por el contrario, la expresión de miR-29a y miR-140 de FF varió significativamente de acuerdo con el tratamiento con gonadotropina. Específicamente, la expresión de miR-29a se redujo significativamente y la expresión de miR-140 aumentó significativamente en los depósitos de FF de mujeres tratadas con hMG en comparación con las pacientes que fueron estimuladas con r-FSH ($p = 0,03$; $p = 0,02$, respectivamente) (figura 12A). Además, cualquiera que sea el tipo de gonadotropina, miR-140 se reguló positivamente de forma significativa en los depósitos de FF de mujeres que recibieron dosis totales más altas de gonadotropinas (≥ 3000 UI/l) en comparación con las tratadas con dosis más bajas (< 3000 UI/l) ($p = 0,03$) (figura 12B). Asimismo, el análisis de correlación de Spearman mostró que el nivel de miR-140 de FF se asoció significativa y positivamente con la dosis total de gonadotropinas ($r = 0,21$; $p = 0,02$).

El día de la recuperación de los ovocitos, el nivel de miR-320a en los depósitos de FF se correlacionó significativa y positivamente con el número de ovocitos maduros (MII) ($r = 0,24$; $p = 0,02$). Los depósitos de FF de mujeres con un número bajo de ovocitos maduros (≤ 2) contenían niveles de miR-320 de FF significativamente más bajos que los relacionados con un número de ovocitos maduros superior a 2 ($p = 0,04$) (figura 12C).

Expresión de let-7b de FF y desarrollo de blastocitos

Al considerar solo el grupo de mujeres con reserva ovárica normal ($n = 91$), se encuentra una correlación significativa y negativa entre el nivel de expresión de let-7b de FF y la tasa de blastulación ($r = -0,33$, $p = 0,003$). De hecho, la baja expresión de let-7b de FF se asoció significativamente con la probabilidad de obtener un blastocito [COR = 1,0 [0,99; 1,0], $p = 0,04$]. El valor AUC del potencial de let-7b de FF para predecir el desarrollo de blastocitos fue de 0,66 (0,55-0,76) con una sensibilidad del 77,2 % y una especificidad del 59,1 % ($p = 0,02$; a un valor de corte $\leq 273,2$). Asimismo, los niveles de let-7b de FF también se correlacionaron significativa y negativamente con la tasa de blastocitos expandidos en mujeres con reserva ovárica normal ($r = -0,28$, $p = 0,009$). La probabilidad de obtener un blastocito expandido se asoció significativamente con la expresión intrafolicular de let-7b [COR = 1,0 [0,99; 1,0], $p = 0,02$]. Además, el valor de AUC que definió el rendimiento de let-7b de FF en la predicción de la formación de blastocitos expandidos fue 0,67 (0,54-0,79), con una sensibilidad del 70 % y una especificidad del 64,3 % ($p = 0,02$; a un valor de corte $\leq 247,9$).

Valor predictivo de miR-29a de FF para un resultado de embarazo clínico

En el grupo con reserva ovárica normal ($n = 91$), la expresión de miR-29a de FF predijo significativamente el resultado de embarazo clínico [COR = 2,08 [1,0; 4,3], $p = 0,049$]. Además, el análisis de la curva ROC indicó que el rendimiento de miR-29a de FF para la predicción de embarazo clínica alcanzó 0,68 (0,55-0,79) con una sensibilidad del 83,3 %, pero con una baja especificidad (53,5 %) ($p = 0,01$; valor de corte $> 0,32$). Además, la comparación de la potencia de discriminación de la expresión de miR-29a de FF y del porcentaje de embriones de alta calidad para la predicción de embarazo clínico mostró que el valor de AUC relacionado con la expresión de miR-29a de FF era más alto que el del porcentaje de embriones de alta calidad (AUC = 0,59 [0,46-0,72]; $p = 0,27$).

Funciones biológicas de los miARN candidatos en el sistema reproductor

MiR-29a, miR-320a, let-7b y miR-30a, identificados como expresados diferencialmente en depósitos de FF, están implicados en varias rutas del sistema reproductor. Se usó Pathway Studio® para generar una vista esquemática de los diferentes roles reguladores de estos miARN en los procesos reproductivos, tal como el crecimiento folicular, la apoptosis, la esteroidogénesis, la meiosis y la implantación de embriones (figura 15). El esquema también integró las interacciones con las hormonas esteroideas (estrógeno y progesterona). Las funciones potenciales de estos miARN, su localización en el folículo ovárico y sus dianas principales se resumen en la Tabla 9.

Análisis

Este estudio investigó los perfiles de expresión de seis miARN circulantes (let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140, miR-191 y miR-320a) en depósitos de FF de pacientes sometidas a procedimientos de FIV/ICSI y encontró que se expresan de manera diferencial de acuerdo con el estado de la reserva ovárica de la mujer, los tratamientos con gonadotropinas y/o los resultados de la FIV (figura 4). Los datos sugieren que estos miARN circulantes podrían representar nuevas herramientas potentes para monitorizar la FIV, al identificar de manera eficiente a las mujeres con trastornos de la

reserva ovárica (SOP o LFOR) y al predecir los resultados de la FIV, tal como el desarrollo de blastocitos o los resultados de embarazo clínico.

Se demuestra, por primera vez, que la expresión de let-7b y miR-140 se reduce significativamente, mientras que miR-30a se regula positivamente en muestras de FF de pacientes con SOP. Además, la combinación de estos tres miARN se asocia significativamente con el SOP, con alta especificidad y sensibilidad. Por lo tanto, podrían constituir nuevos biomarcadores específicos para identificar fácil y eficazmente a mujeres con SOP. Estudios anteriores informaron que let-7b se expresa en células de la granulosa y del cúmulo en ovarios de mamífero y también de seres humanos (Yao *et al.*, 2009; Miles *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Assou *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015). El SOP se caracteriza por anomalías en el desarrollo folicular, lo que sugiere que el "diálogo" normal entre los ovocitos y las células de la granulosa en los folículos de crecimiento temprano podría estar alterado (Franks *et al.*, 2008). Por consiguiente, la disminución significativa de la expresión de let-7b de FF observada en pacientes con SOP podría reflejar esta foliculogénesis anormal. De hecho, se ha informado que let-7b podría desempeñar un papel específico en el desarrollo folicular ovárico (Yao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015). Específicamente, let-7b regula la ruta de señalización de TGF- β en el ovario de cabra al dirigirse a los genes del receptor de activina I y Smad2/3 (Zhang *et al.*, 2013). La desregulación de TGF- β contribuye a anomalías reproductivas en el SOP, tal como la perturbación del desarrollo del folículo (Raja-Khan *et al.*, 2014). En consecuencia, la regulación negativa de let-7b en los folículos ováricos podría conducir a la desregulación de la ruta de señalización de TGF- β y, en última instancia, contribuir al desarrollo del SOP. La expresión anormal del receptor de estrógenos (RE) también podría contribuir a un desarrollo folicular deficiente y al fallo ovulatorio en el SOP (Jakimiuk *et al.*, 2002). MiR-140 desempeña una función como supresor tumoral y se regula negativamente en el cáncer de mama a través de la señalización de ER α (Zhang *et al.*, 2012). Estos hallazgos sugieren que las modificaciones de la expresión de ER α observadas en el SOP podrían influir negativamente en la expresión de miR-140 en los folículos ováricos. Finalmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-30a en células de la granulosa humana cultivadas promueve la expresión de BCL2A1, IER3 y ciclina D2 al reprimir FOXL-2 (Wang *et al.*, 2015). FOXL-2 codifica un factor de transcripción en forma de horquilla que es esencial para el desarrollo ovárico (Crisponi *et al.*, 2001). La inactivación condicional de FOXL-2 en ratones da como resultado folículos de sexo inverso con características de folículos quísticos, incluida la producción elevada de andrógenos por las células de la teca y la transformación morfológica de las células de la granulosa, como en el SOP (Uhlenhaut *et al.*, 2009; Murphy, 2010). Además, el hirsutismo inducido por andrógenos, descrito en pacientes con SOP, también se observa en mujeres portadoras de mutaciones FOXL-2 (Meduri *et al.*, 2010). Basándose en estas observaciones, se plantea la hipótesis de que la sobreexpresión de miR-30 en depósitos de FF de mujeres con SOP podría conducir a la inhibición/regulación negativa de FOXL-2 en los folículos ováricos, promoviendo así el desarrollo de síntomas de SOP. A diferencia de dos estudios anteriores (Sang *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014), la expresión de miR-320a de FF no se vio afectada en nuestro grupo de mujeres con SOP. Sin embargo, el nivel de expresión de miR-320a fue significativamente menor en los depósitos de FF de mujeres con menos de dos ovocitos maduros (≤ 2) en comparación con mujeres con más de dos ovocitos maduros. En el ratón, la inactivación de miR-320a en los ovocitos disminuyó significativamente la proporción de ovocitos maduros que se desarrollaron en embriones (Feng *et al.*, 2015). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que miR-320a es indicativo de la cantidad y calidad de ovocitos maduros y que su expresión intrafolicular podría ser modulada por la calidad de la respuesta ovárica de las pacientes sometidas a FIV.

A continuación, se encontró que la expresión de miR-30a y miR-191 es significativamente mayor en depósitos de FF de mujeres con LFOR en comparación con mujeres con estado de reserva normal. Además, la combinación de estos dos miARN circulantes discriminó significativamente a las mujeres con LFOR, con alta sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, podrían representar nuevos biomarcadores específicos para la identificación de mujeres con LFOR. Ya se analizó el vínculo entre la sobreexpresión de miR-30a y la regulación negativa de FOXL-2 en las células de la granulosa (Wang *et al.*, 2015). Además, la reducción/ablación de la expresión de FOXL-2 o las mutaciones de FOXL-2 afectan significativamente al desarrollo folicular (Murphy, 2010). De hecho, en ratones, la alteración de FOXL-2 provoca insuficiencia ovárica al bloquear el desarrollo folicular (Uda *et al.*, 2004). Asimismo, las mutaciones de FOXL-2 dan como resultado POF e infertilidad en mujeres por agotamiento de la reserva folicular, lo que podría deberse a la alteración del ensamblaje del folículo o al reclutamiento elevado de folículos primordiales (Murphy, 2010). Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que la sobreexpresión de miR-30 en los folículos ováricos puede causar la represión del gen FOXL-2 en las células foliculares y, en consecuencia, conducir a una disminución de la reserva ovárica. Además, miR-191 es una diana del RE en el cáncer de mama (Nagpal *et al.*, 2013) y un estudio reciente informó que algunos miARN relacionados con el riesgo de cáncer de mama también están asociados con el riesgo de insuficiencia ovárica (Rah *et al.*, 2015).

La expresión de FF de algunos miARN también se moduló mediante el tratamiento con gonadotropinas. MiR-29a se reguló negativamente de forma significativa y miR-140 se sobreexpresó en depósitos de FF de mujeres que fueron estimuladas con hMG en comparación con las tratadas con r-FSH. Esto es según un estudio anterior que muestra que miR-29a se regula negativamente de forma significativa por el tratamiento con FSH en células de granulosa de rata cultivadas, lo que influye en la producción de progesterona (Yao *et al.*, 2010). Los datos sugieren que los tratamientos con gonadotropina podrían afectar a la expresión de miARN intrafolicular y, en última instancia, la eficacia de la FIV. También se encuentra que la alta dosis total de gonadotropinas se asoció con la regulación positiva de miR-140. Esto probablemente refleja una posible relación dosis-efecto de las gonadotropinas en el perfil de expresión de miR-140 de FF. Se requieren más estudios para investigar los mecanismos biológicos implicados en el efecto de las gonadotropinas en la expresión intrafolicular de estos miARN.

La importancia de los miARN en el desarrollo embrionario temprano se ha demostrado en muchas especies de mamíferos (Suh y Blelloch, 2011). Aunque Feng *et al.*, no observaron una expresión diferencial significativa de let-7b en muestras de FF según la calidad del embrión (Feng *et al.*, 2015), se encontró que el nivel de let-7b de FF se relacionó significativamente con el potencial de desarrollo embrionario. De hecho, los niveles de let-7b en FF predijeron significativamente la formación y expansión de blastocitos en mujeres con reserva ovárica normal. Previamente se demostró que let-7 puede regular el tiempo de desarrollo en *Caenorhabditis elegans* (Reinhart *et al.*, 2000). Sin embargo, el papel de let-7b en la formación de blastocitos sigue sin estar claro. Let-7b de FF podría representar un nuevo biomarcador predictivo del desarrollo de blastocitos que podría ser útil para definir la mejor estrategia de cultivo de embriones durante la FIV.

Además, los niveles de miR-29a de FF predijeron significativamente el resultado de embarazo clínico con mayor sensibilidad (83,3 %) en comparación con la proporción de embriones de alta calidad en nuestra cohorte. MiR-29a se expresa en gran medida en el útero de rata durante la implantación embrionaria y su expresión está regulada por la activación de blastocitos y la decidualización uterina (Xia *et al.*, 2014). Curiosamente, la expresión de miR-29a podría influir en el resultado del embarazo al actuar tanto en el lado folicular como en el endometrial, lo que respalda la hipótesis de que los entornos foliculares y endometriales favorables son necesarios para la concepción.

En conclusión, el estudio muestra que, durante la FIV, el perfil de expresión de miARN en muestras de FF humanas proporciona biomarcadores para identificar de forma eficaz y sencilla los trastornos de la reserva ovárica y para predecir el desarrollo de blastocitos y los resultados de embarazo clínico. Estos nuevos biomarcadores potenciales podrían usarse en la práctica diaria para mejorar las estrategias personalizadas de la FIV e identificar nuevas dianas terapéuticas en el manejo de la infertilidad femenina.

Tabla 5: Modelo logístico multivariado que muestra la asociación de ARNm de FF específicos con el síndrome de ovario poliquístico (SOP) y la reserva ovárica de función baja (LFOR). OR, Relación de probabilidad, FF, fluido folicular.

	Análisis univariado		Análisis multivariado	
Expresión relativa de microARN de FF relacionada con SOP				
MicroARN de FF	OR en bruto [95 % de IC]	valor p	OR ajustada [95 % de IC]	valor p
miR-30a de FF	4,5 [1,94; 10,57]	p<0,001	5,0 [1,86; 13,68]	0,001
miR-140 de FF	0,6 [0,37; 0,96]	0,03	0,52 [0,29; 0,94]	0,03
let-7b de FF	1,0 [0,99; 1,0]	0,01	1,0 [0,99; 1,0]	0,02
Expresión relativa de microARN de FF relacionada con LFOR				
MicroARN de FF	OR en bruto [95 % de IC]	valor p	OR ajustada [95 % de IC]	valor p
miR-30a de FF	4,0 [0,87; 18,23]	0,07	2,8 [0,56; 13,92]	0,21
miR-191 de FF	1,4 [1,03; 1,93]	0,03	1,4 [0,98; 1,87]	0,07

Tabla 6: Potencia de discriminación de expresiones de miARN de FF para la identificación de SOP y LFOR. Los miARN se analizaron individualmente y en combinación.

Análisis de ROC	Predicción de SOP				Predicción de LFOR		
	miR-30a de FF	miR-140 de FF	let-7b de FF	Combinación de FF miR-30a, miR-140 y let-7b de FF	miR-30a de FF	miR-191 de FF	Combinación de miR-30a y miR-191 de FF
AuROC (95 % de IC)	0,67 (0,57-0,76)	0,67 (0,57-0,76)	0,67 (0,57-0,76)	0,83 (0,73-0,92)	0,79 (0,68-0,87)	0,77 (0,67-0,86)	0,84 (0,67-0,86)
valor p	0,02	0,007	0,003	<0,0001	<0,0001	0,002	<0,0001
Sensibilidad (%)	57,7	57,7	53,9	70,0	100	57,1	85,9
Especificidad (%)	85,1	81,1	75,7	83,8	53,9	92,3	71,4
Valor predictivo positivo (%)	57,7	51,7	41,9	60	16,3	40	31,3

(continuación)

	Predicción de SOP				Predicción de LFOR		
Valor predictivo negativo (%)	85,1	84,5	81,2	88,6	100	96	97,1
Valor de corte	>0,49	≤0,92	≤93,95	-	>0,14	>2,98	-

Tabla 7: Características clínicas de todas las pacientes (n = 131) y de cada grupo: mujeres con reserva ovárica normal (n = 91), con SOP (n = 30) o LFOR (n = 10). DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; E2, 17β-estradiol; AMH, hormona anti-Mülleriana; AFC, recuento de folículos antrales; r-FSH, hormona foliculoestimulante recombinante; HP-hMG, gonadotropina menopáusica humana altamente purificada *Excepto cuatro mujeres que recibieron estimulación leve.

Variable	Total (n = 131)		Reserva ovárica normal (n = 91)		SOP (n = 30)		LFOR (n = 10)	
	Media ± DE	n (%)	Media ± DE	n (%)	Media ± DE	n (%)	Media ± DE	n (%)
Edad (años)	34,7 ± 4,5	-	34,3 ± 5,1	-	33,1 ± 3,8	-	36,8 ± 4,6	-
IMC (kg/m ²)	23,4 ± 4,5	-	22,8 ± 3,7	-	25,4 ± 5,3	-	22,1 ± 4,6	-
18,5 ≤ IMC <25	-	83 (63,4)	-	66 (72,5)	-	11 (36,7)	-	7 (70,0)
IMC <18,5	-	9 (6,9)	-	4 (4,4)	-	3 (10,0)	-	1 (10,0)
25 ≤ IMC <30	-	29 (22,1)	-	17 (18,7)	-	11 (36,7)	-	1 (10,0)
IMC ≥30	-	10 (7,6)	-	4 (4,4)	-	5 (16,6)	-	1 (10,0)
Duración de la infertilidad (años)	3,6 ± 1,5	-	3,3 ± 1,6	-	3,9 ± 1,6	-	3,8 ± 1,4	-
Etiología de la infertilidad								
Factor masculino	-	41 (31,3)	-	37 (40,6)	-	2 (6,6)	-	2 (20,0);
Factor femenino	-	49 (37,4)	-	38 (41,8)	-	8 (26,7)	-	5 (50,0)
Infertilidad mixta	-	33 (25,2)	-	8 (8,8)	-	20 (66,7)	-	3 (30,0)
Infertilidad inexplicable	-	8 (6,1)	-	8 (8,8)	-	0 (0)	-	0 (0)
Infertilidad primaria	-	78 (59,5)	-	57 (62,6)	-	14 (46,7)	-	7 (70,0)
Infertilidad secundaria	-	53 (40,5)	-	34 (37,4)	-	16 (53,3)	-	3 (30,0)
Número de ciclo de FIV/ICSI	2,1 ± 1,3	-	2,2 ± 1,3	-	1,9 ± 1,1	-	2,2 ± 1,4	-
1	-	51 (38,9)	-	34 (37,4)	-	12 (40,0)	-	5 (50,0)
>1	-	80 (61,1)	-	56 (62,7)	-	18 (60,0)	-	5 (50,0):
Evaluación inicial								
FSH (UI/l)	8,3 ± 1,8	-	7,2 ± 2,3	-	6,1 ± 1,7	-	11,6 ± 3,1	-
LH (UI/l)	7,1 ± 3,7	-	5,6 ± 2,1	-	8,2 ± 4,5	-	7,4 ± 4,5	-
E2 (pg/ml)	47,7 ± 35,2	-	45,9 ± 39,2	-	41,9 ± 15,4	-	55,3 ± 20,9	-
AMH (ng/ml)	4,1 ± 2,4	-	3,1 ± 1,7	-	8,0 ± 5,1	-	1,1 ± 0,5	-
AFC	16 ± 6	-	16 ± 6	-	27 ± 11	-	6 ± 2	-
Protocolo con agonistas*	-	63 (48,1)	-	39 (42,9)	-	19 (63,3)	-	5 (50)
Protocolo con antagonistas	-	64 (48,9)	-	48 (52,7)	-	11 (36,7)	-	5 (50,0)

(continuación)

Variable	Total (n = 131)		Reserva ovárica normal (n = 91)		SOP (n = 30)		LFOR (n = 10)	
	Media ± DE	n (%)	Media ± DE	n (%)	Media ± DE	n (%)	Media ± DE	n (%)
Días de estimulación	10,5 ± 1,4	-	10 ± 1,3	-	10,4 ± 1,7	-	11,1 ± 1,3	-
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2501 ± 673	-	2321,7 ± 912,5	-	1851,4 ± 706,3	-	3330 ± 400,1	-
r-FSH	-	73 (55,8)	-	45 (49,4)	-	24 (80,0)	-	4 (40,0);
HP-hMG	-	54 (41,2)	-	42 (46,2)	-	6 (20,0)	-	6 (60,0),
Respuesta hormonal ovárica en el desencadenamiento de la ovulación								
Nivel máximo de E2 (pg/ml)	1552 ± 668,2	-	1764,5 ± 728,3	-	1656,9 ± 737,6	-	1234,7 ± 538,7	-
Nivel de progesterona (ng/ml)	0,8 ± 0,4	-	0,9 ± 0,4	-	0,8 ± 0,4	-	0,7 ± 0,4	-
Nivel de LH (UI/l)	2,1 ± 1,7	-	2,0 ± 1,4	-	2,4 ± 2,1	-	2,0 ± 1,6	-
FIV	-	32 (24,4)	-	23 (25,3)	-	5 (16,7)	-	4 (40,0)
ICSI	-	99 (75,6)	-	68 (74,7)	-	25 (83,3)	-	6 (60,0)

Tabla 8: Resultados de la FIV de todas las pacientes (n = 131) y de cada grupo; mujeres con reserva ovárica normal (n = 91), con SOP (n = 30) o LFOR (n = 10). DE, desviación estándar; MII, ovocito bloqueado en metafase meiótica II.

	Total (n = 31)			Reserva ovárica normal (n = 91)			SOP (n = 30)			LFOR (n = 10)		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Resultados de la FIV												
Ovocitos recuperados	7,6	4,5	-	9,0	4,2	-	9,1	4,8	-	4,7	4,5	-
Ovocitos maduros (MII)	6,0	3,7	-	7,8	4,1	-	6,4	3,6	-	3,7	3,4	-
	≤2	-	14	-	-	9	-	-	1	-	-	4
	>2	-	85	-	-	59	-	24	-	-	-	2
Tasa de madurez (%)	77	-	-	81	-	-	71	-	-	80	-	-
Tasa de fertilización de la FIV/ICSI (%)	64	-	-	67	-	-	60	-	-	65	-	-
25-27 horas después de la fertilización												
Escisión temprana	1,3	1,4	-	2,2	2,1	-	1,2	1,6	-	0,5	0,5	-
El día 2												
Embrión	4,1	3,3	-	4,8	3,7	-	4,6	3,3	-	2,8	3,0	-
El día 3												
Embriones de alta calidad	1,2	1,6	-	1,6	1,8	-	1,2	1,7	-	0,8	1,3	-
Tasa de fragmentación total (%)	15	-	-	14	-	-	17	-	-	15	-	-
El día 5												
Tasa de blastulación (blastocito/embriones de cultivo prolongado) (%)	31	-	-	46	-	-	38	-	-	8	-	-
Tasa de blastocitos expandidos (blastocitos expandidos/blastocitos) (%)	45	-	-	52	-	-	38	-	-	-	-	-
Tasa de embarazo clínico por transferencia (%)	27	-	-	38	-	-	29	-	-	14	-	-
Embarazo único	-	-	31	-	-	22	-	-	9	-	-	1
Embarazo múltiple	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	0

Tabla 9: MiARN circulantes expresados en el complejo cúmulo-ovocito (COC), células de la granulosa (GC), células del cúmulo (CC) y en el fluido folicular (FF): sus funciones y objetivos principales en los folículos ováricos.

miARN	Expresión	Especie	Regulación	Genes diana	Funciones	Referencias
let-7b	CC	Ser humano	-	-	Regulación de COC	Assou <i>et al.</i> (2013)
	CG	Porcino	-	-	Atresia del folículo ovárico	Cao <i>et al.</i> (2015)
	CG	Ratón	-	-	Desarrollo folicular	Yao <i>et al.</i> (2009)
	Ovario	Cabra	-	Receptor de activina I, Smad 2/3	Desarrollo folicular	Zhang <i>et al.</i> (2013)
	COC	Bovino	-	-	Ovogénesis	Miles <i>et al.</i> (2012)
miR-29a	CC	Ser humano	-	DNMT 3A/3B	Reanudación de la meiosis	Santonocito <i>et al.</i> (2014)
	GC (cultivo)	Rata	Regulación por FSH	COL4A1 y BMF	Producción de progesterona	Yao <i>et al.</i> (2010)
miR-30a	GC COV43 (cultivo)	Ser humano	-	FOXL2, BCL2A1, IER3 y ciclina D2	Proliferación celular	Wang <i>et al.</i> (2015)
miR-320a	FF	Ser humano	-	-	Calidad del embrión	Feng <i>et al.</i> (2015)
	FF	Ser humano	-	-	SOP	Sang <i>et al.</i> (2013)
	CG	Ratón	Regulación por FSH y por miR-383	E2F1 y SF-1	Proliferación celular, secreción de estrógenos	Yin <i>et al.</i> (2014)
	Ovocitos/embriones	Ratón	-	Genes de la ruta de señalización de Wnt	Calidad de los ovocitos/Desarrollo embrionario	Feng <i>et al.</i> (2015)

EJEMPLO 4:

5

Ácidos nucleicos circulantes en muestras de suero como biomarcadores de la reserva ovárica, la función ovárica y trastornos.

Cuantificación de cfADN el día 3 del ciclo menstrual en muestras de suero de 92 mujeres. Media \pm DE = 0,25 \pm 0,14

10

Los inventores demostraron que el nivel de cfADN en suero era significativamente mayor en mujeres con LFOR en comparación con mujeres con reserva ovárica normal ($p = 0,045$) (figura 12A). El nivel de cfADN en suero tendió a ser más alto en mujeres con SOP en comparación con mujeres con reserva ovárica normal ($p = 0,05$) (figura 12A)

15

El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN en suero predijo significativamente LFOR (AUC = 0,64; Se = 52 %; SP = 75 %; corte $>0,17$). El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN en suero predijo significativamente SOP (AUC = 0,65; Se = 95 %; SP = 34 %; corte $>0,06$) (figura 12B).

20

El nivel de cfADN en suero fue significativamente mayor en mujeres mayores (edad >36 o edad ≥ 36 años) en comparación con mujeres jóvenes (edad <36 o edad ≤ 36 años) ($p = 0,037$; $p = 0,024$, respectivamente) como se muestra en la figura 12C. El nivel de cfADN en suero el día 3 del ciclo menstrual se correlacionó significativa y positivamente con la edad de las mujeres ($r = 0,27$; $p = 0,02$) (figura 12D).

25

Para las mujeres que se sometieron a un procedimiento de FIV/ICSI ($n = 26$), el día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN fue significativamente más alto en las muestras de suero de mujeres que obtuvieron menos de 6 ovocitos el día de los ovocitos (≤ 6 ovocitos) en comparación con aquellas que obtuvieron más de 6 ovocitos (>6 ovocitos) ($p = 0,013$) (figura 12E). El nivel de cfADN el día 3 del ciclo menstrual podría predecir el número de ovocitos recuperados y, por lo tanto, el pronóstico de la FIV/ICSI (figura 12F).

30

Los inventores también realizaron para pacientes con reserva ovárica normal y con LFOR (las pacientes con SOP fueron excluidas de este análisis) una comparación de cfADN con el nivel de AMH el día 3 del ciclo menstrual, el biomarcador clásico usado para evaluar la reserva ovárica. El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN fue significativamente mayor en muestras de suero de mujeres con AMH ≤ 1 ng/ml o ≤ 2 ng/ml en comparación con aquellas con AMH >1 ng/ml o >2 ng/ml, respectivamente ($p = 0,046$; $p = 0,004$, respectivamente) (figura 12G). El nivel de cfADN en suero el día 3 del ciclo menstrual se correlacionó de manera significativa y negativa con el nivel de AMH en suero el día 3 del ciclo menstrual ($r = -0,32$; $p = 0,006$) (figura 12H).

35

Todas las pacientes también se incluyeron en este análisis (n = 92). El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN fue significativamente mayor en las muestras de suero de mujeres con AMH ≤ 2 ng/ml en comparación con aquellas con AMH entre 2 y 5 ng/ml ($p = 0,013$). El día 3 del ciclo menstrual, el nivel de cfADN tendió a ser más alto en las muestras de suero de mujeres con AMH ≥ 5 ng/ml en comparación con aquellas con AMH entre 2 y 5 ng/ml ($p = 0,09$) (figura 12I).

Expresión de microARN el día 3 del ciclo menstrual en muestras de suero de 70 mujeres.

Los inventores demostraron que la expresión de let-7b en suero fue mayor en mujeres mayores (edad ≥ 38 años) en comparación con mujeres menores de 38 años (figura 13A).

La expresión de miR-30d y miR-320a disminuyó significativamente en mujeres con niveles altos de LH (>5 UI/l) en comparación con mujeres con niveles normales de LH (entre 3-5 UI/l) ($p < 0,03$; $p < 0,02$; $p < 0,02$, respectivamente) (figura 13B).

REFERENCIAS:

A lo largo de la presente solicitud, las diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E and Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121:647-653.
- Assou S, Haouzi D, Dechaud H, Gala A, Ferrieres A and Hamamah S. Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments. *Biomed Res Int* 2013; 2013:354582.
- Azhar S. MicroRNA-122: A New Player in the Negative Regulation of LH Receptor Expression by the LH Receptor mRNA Binding Protein (LRBP). *Endocrinology* 2013; 154:4439-4442.
- Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW and Pertl B. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2006; 26:831-836.
- Bischoff FZ, Lewis DE and Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005; 11:59-67.
- Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, Marquez-Do D, Home C, Lewis DE and Simpson JL. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2002; 8:493-500.
- Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, Eijkemans MJ, Mol BW and Broekmans FJ. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update* 2013; 19:26-36.
- Caburet S, Georges A, L'Hote D, Todeschini AL, Benayoun BA and Veitia RA. The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356:55-64.
- Carletti MZ and Christenson LK. MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. *J Anim Sci* 2009; 87:E29-38.
- Carletti MZ, Fiedler SD and Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biol Reprod* 2010; 83:286-295.
- Chaffin CL, Schwinof KM and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid control of granulosa cell proliferation during the periovulatory interval in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 2001; 65:755-762.
- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6:60.
- Chou JS, Jacobson JD, Patton WC, King A and Chan PJ. Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21:397-400.
- Conn PM and Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 1994; 45:391-405.
- Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Lunenfeld E, Douvdevani A, Levitas E and Har-Vardi I. Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2013; 26:36-41.
- Dai A, Sun H, Fang T, Zhang Q, Wu S, Jiang Y, Ding L, Yan G and Hu Y. MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. *FEBS Lett* 2013; 587:2474-2482.
- Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C and Bloomston M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008; 12:2171-2176.
- Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X and Christenson LK. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod* 2008; 79:1030-1037.
- Gilchrist RB, Lane M and Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008; 14:159-177.
- Godoy J, Nishimura M and Webster NJ. Gonadotropin-releasing hormone induces miR-132 and miR-212 to regulate cellular morphology and migration in immortalized LbetaT2 pituitary gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2011; 25:810-820.
- Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M and Okabe M. miR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility. *Science* 2013; 341:71-73.
- Hawkins SM and Matzuk MM. Oocyte-somatic cell communication and microRNA function in the ovary. *Ann*

- Endocrinol (Paris) 2010; 71:144-148.
- Hossain MM, Sohel MM, Schellander K and Tesfaye D. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res* 2012; 349:679-690.
- 5 Kaiser UB, Conn PM and Chin WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptorexpressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 1997; 18:46-70.
- Kim YJ, Ku SY, Kim YY, Liu HC, Chi SW, Kim SH, Choi YM, Kim JG and Moon SY. MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during *in vitro* maturation of mouse follicles. *Hum Reprod* 2013; 28:3050-3061.
- 10 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294:853-858.
- Lambert-Messerlian G, Kloza EM, Williams J, 3rd, Loucky J, O'Brien B, Wilkins-Haug L, Mahoney MJ, De Biasio P, Borrell A, Ehrich M *et al.* Maternal plasma DNA testing for aneuploidy in pregnancies achieved by assisted reproductive technologies. *Genet Med* 2013.
- 15 Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843-854.
- Lo YM and Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem* 2008; 54:461-466.
- Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS and Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999; 45:1747-1751.
- 20 Menon B, Sinden J, Franco-Romain M, Botta RB and Menon KM. Regulation of LH Receptor mRNA Binding Protein by miR-122 in Rat Ovaries. *Endocrinology* 2013; 154:4826-4834.
- Miles JR, McDanel TG, Wiedmann RT, Cushman RA, Echternkamp SE, Vallet JL and Smith TP.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10513-10518.
- 25 Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, Ma L, Chen R, Han DY, Zhu H, Agno JE, Gunaratne PH, DeMayo FJ *et al.* Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol* 2008; 22:2336-2352.
- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM and Rajkovic A. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:8090-8095.
- 30 Pisarska MD, Barlow G and Kuo FT. Minireview: roles of the forkhead transcription factor *FOXL2* in granulosa cell biology and pathology. *Endocrinology* 2011; 152:1199-1208.
- Robker RL and Richards JS. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators *cyclin D2* and *p27Kip1*. *Mol Endocrinol* 1998; 12:924-940.
- 35 Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Zhao X, Xing Q, Jin L, He L, Wu L and Wang L. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis *in vitro* and are associated with polycystic ovary syndrome *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:3068-3079.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC and Treier M. The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 2004; 131:933-942.
- 40 Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, Muller V and Pantel K. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134:933-941.
- Thomas M, Lieberman J and Lal A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:1169-1174.
- 45 Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ and Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006; 52:1062-1069.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ and Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654-659.
- 50 Verghese ET, Hanby AM, Speirs V and Hughes TA. Small is beautiful: microRNAs and breast cancer-where are we now? *J Pathol* 2008; 215:214-221.
- Visser JA, de Jong FH, Laven JS and Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006; 131:1-9.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC and Themmen AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:77-83.
- 55 Wright CF and Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15:139-151.
- Wu C, Ding X, Li H, Zhu C and Xiong C. Genome-wide promoter methylation profile of human testis and epididymis: identified from cell-free seminal DNA. *BMC Genomics* 2013; 14:288.
- 60 Yao N, Lu CL, Zhao JJ, Xia HF, Sun DG, Shi XQ, Wang C, Li D, Cui Y and Ma X. A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14:3239-3245.
- Yao N, Yang BQ, Liu Y, Tan XY, Lu CL, Yuan XH and Ma X. Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells. *Endocrine* 2010; 38:158-166.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método no invasivo *in vitro* para determinar la reserva ovárica en una paciente que lo necesita que comprende las etapas que consisten en: i) extraer, en una muestra de fluido folicular obtenida de dicha paciente, los ácidos nucleicos libres de células y los miARN de la muestra biológica, y ii) determinar el nivel de los ácidos nucleicos libres de células y/o de al menos un miARN seleccionado entre miR-30a, miR-140, let7-b y miR574-3p en la extracción de ácido nucleico.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa ii) comprende determinar el nivel de ácidos nucleicos libres de células en la extracción de ácido nucleico, y en el que dicho método comprende además las etapas que consisten en iii) comparar el nivel de ácidos nucleicos libres de células determinado en la etapa ii) con un valor de referencia, y iv) concluir que la paciente tiene una reserva ovárica alta cuando el nivel determinado en la etapa ii) es menor que el valor de referencia, y concluir que la paciente tiene una reserva ovárica baja cuando el nivel determinado en la etapa ii) es superior al valor de referencia.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa ii) comprende determinar los niveles de miR30a, miR140 y let7-b.

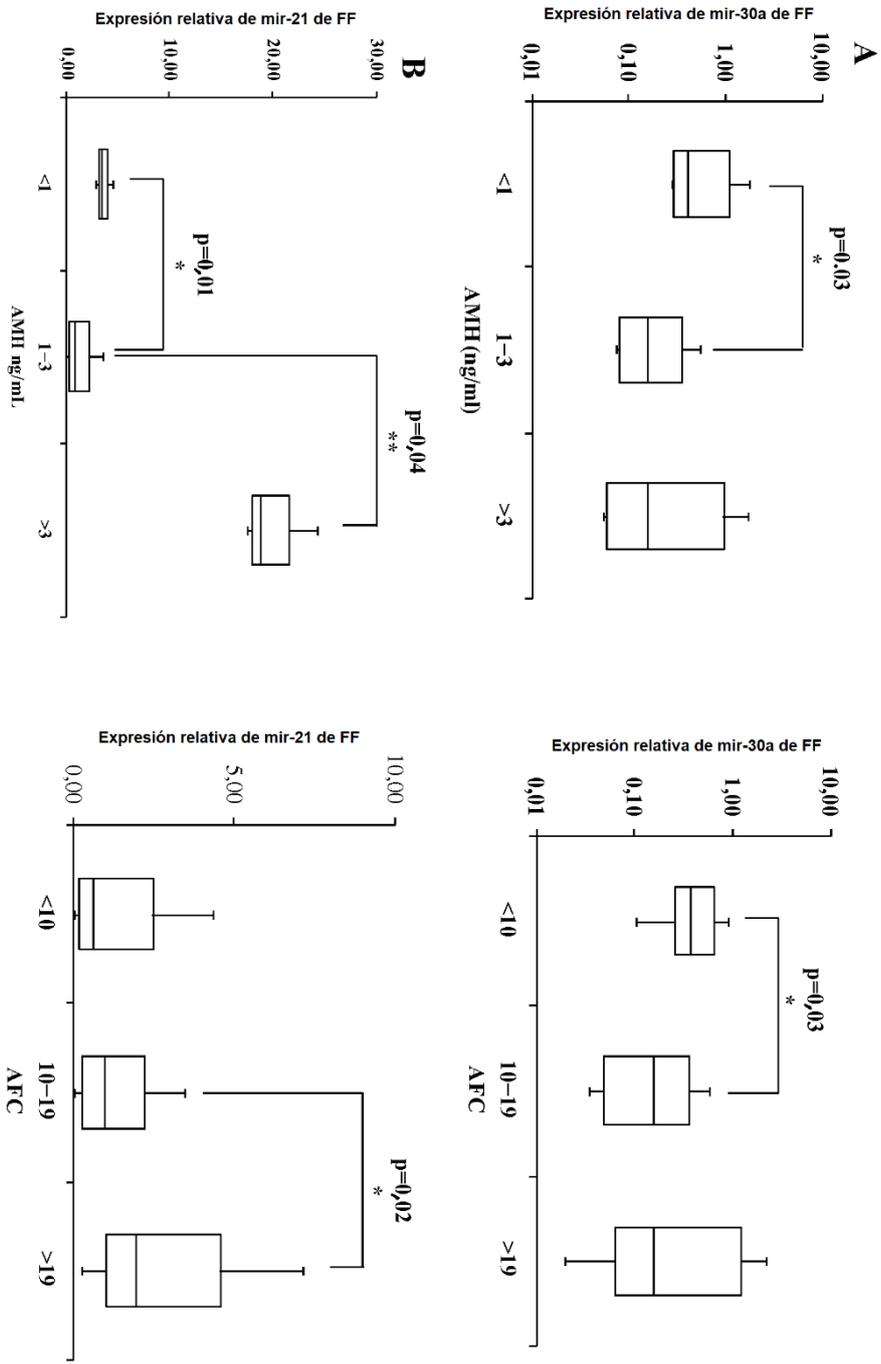


Figura 1A y B

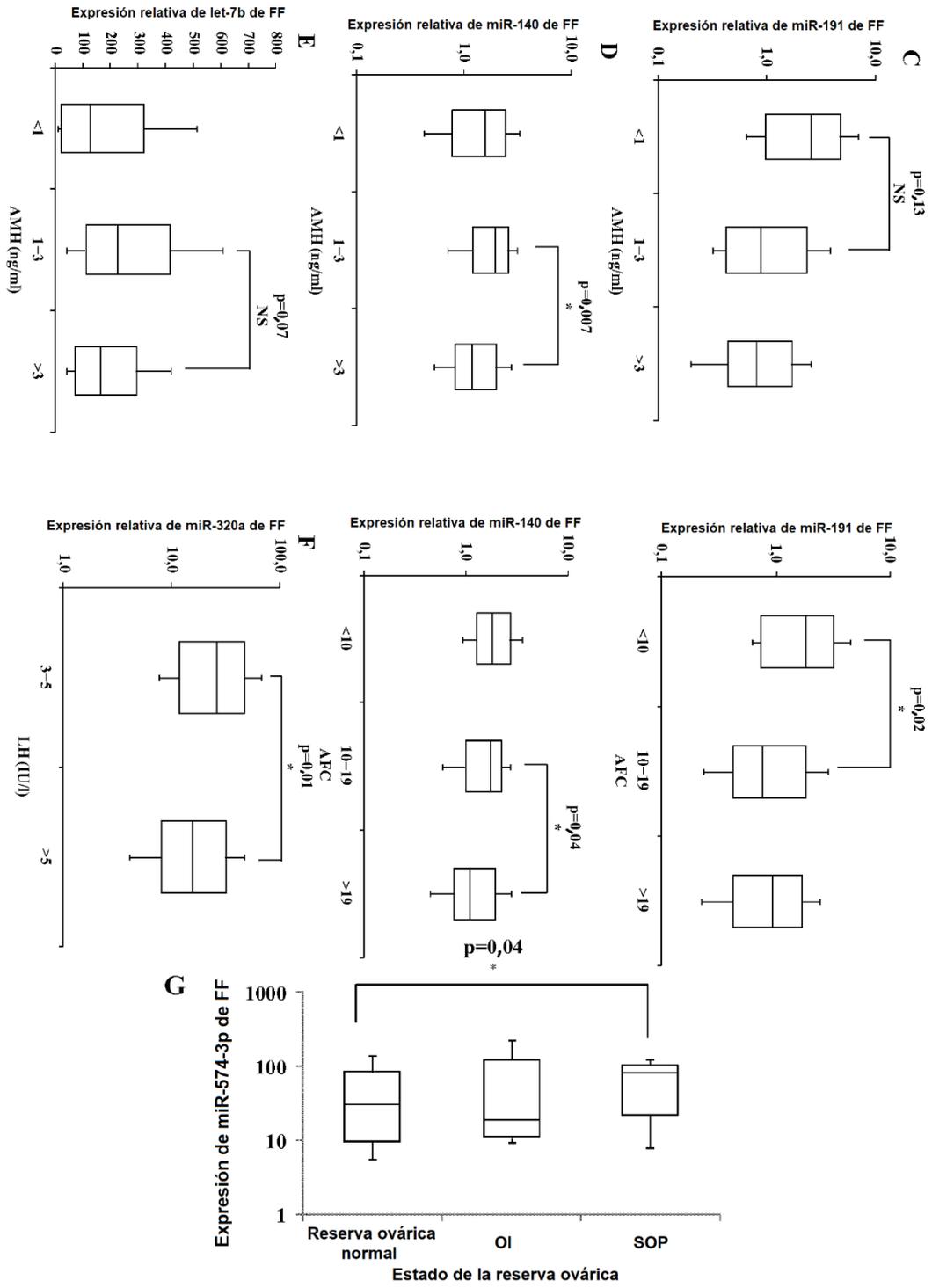


Figura 1 C-G

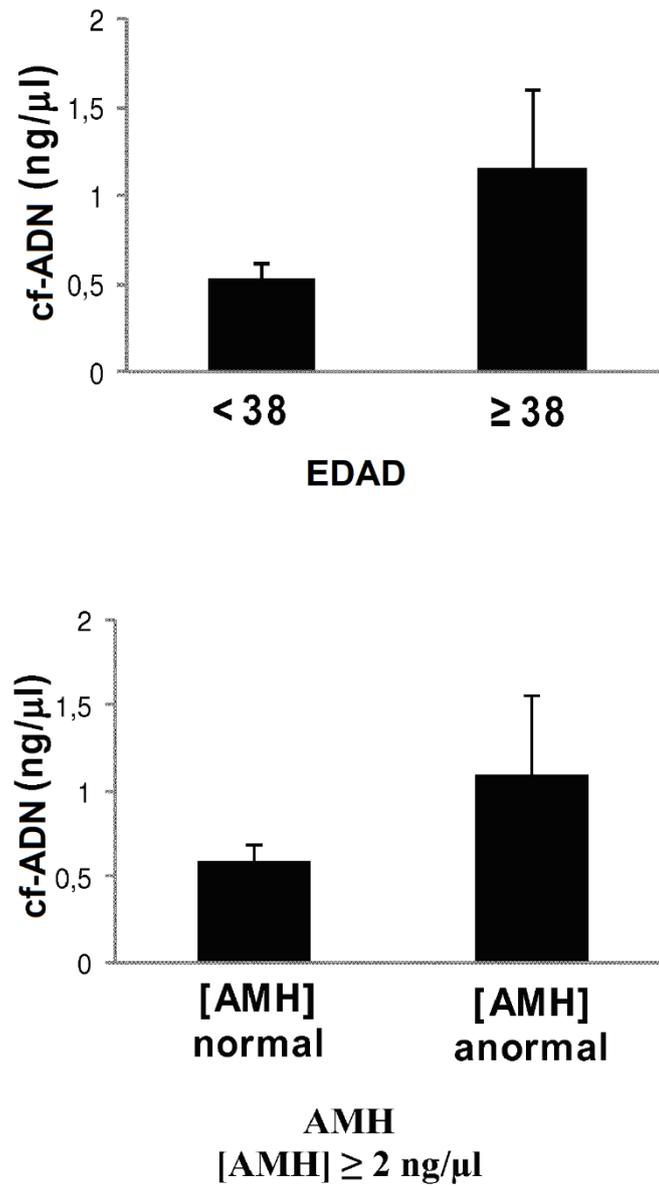


Figura 2

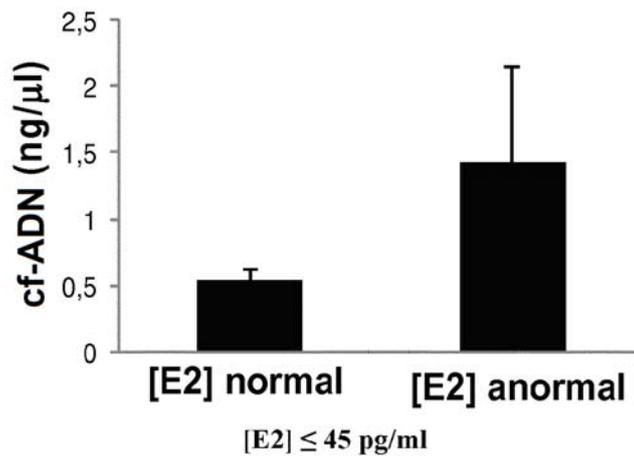
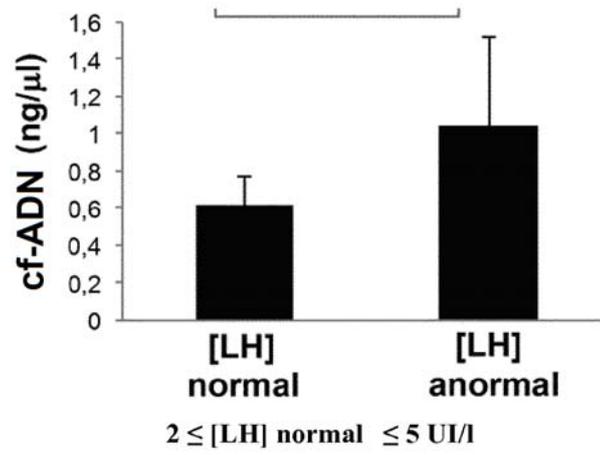
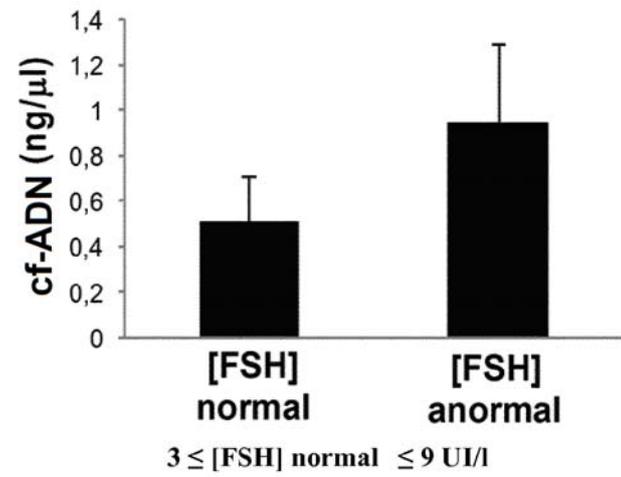


Figura 3

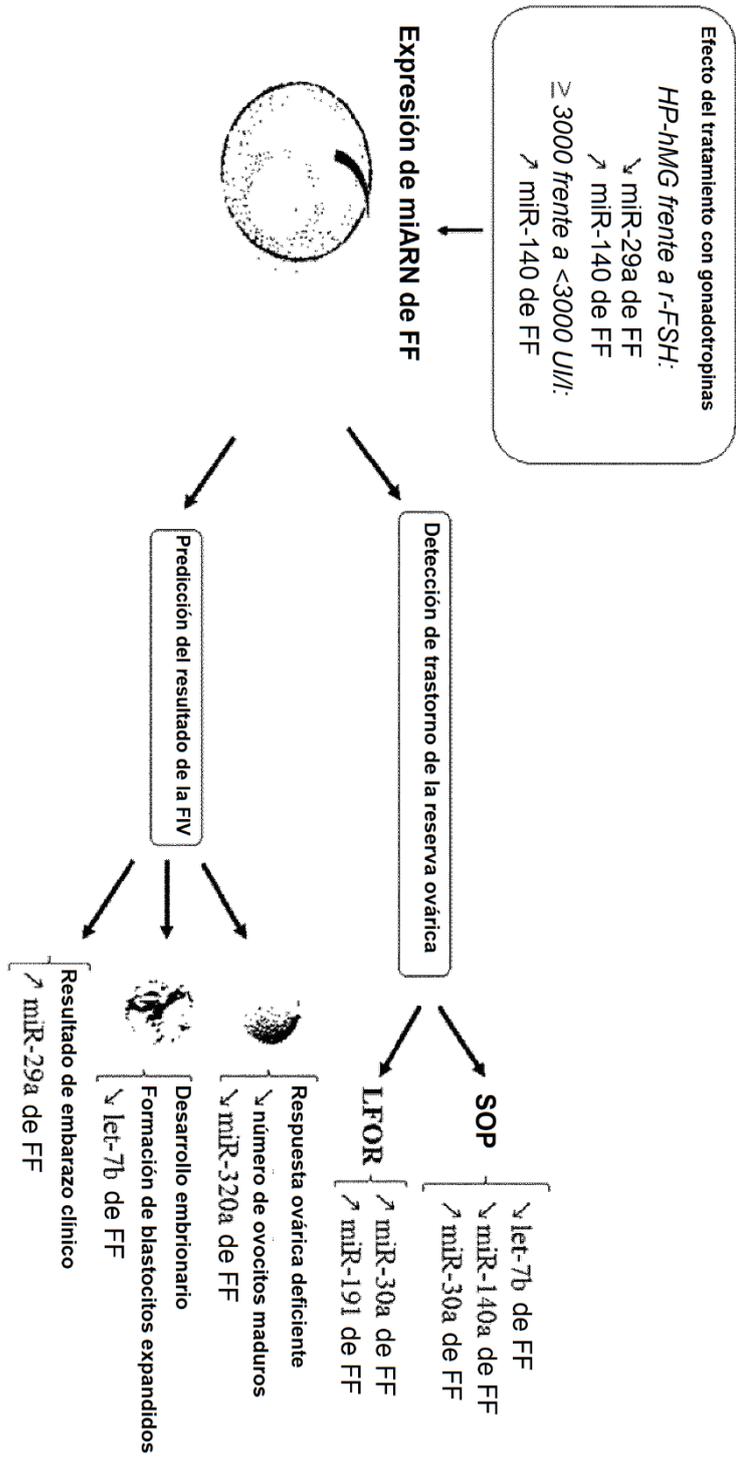


Figura 4

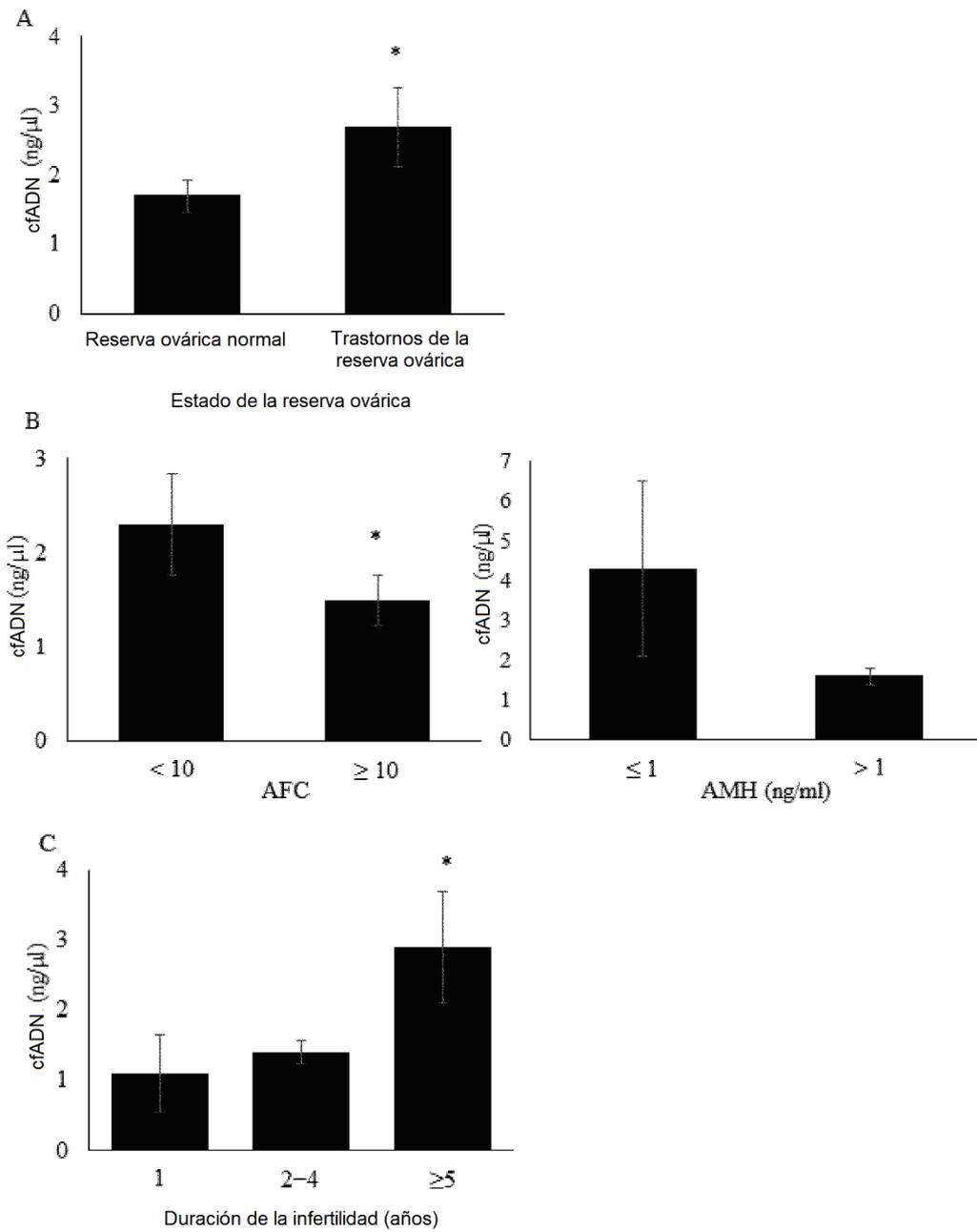


Figura 5

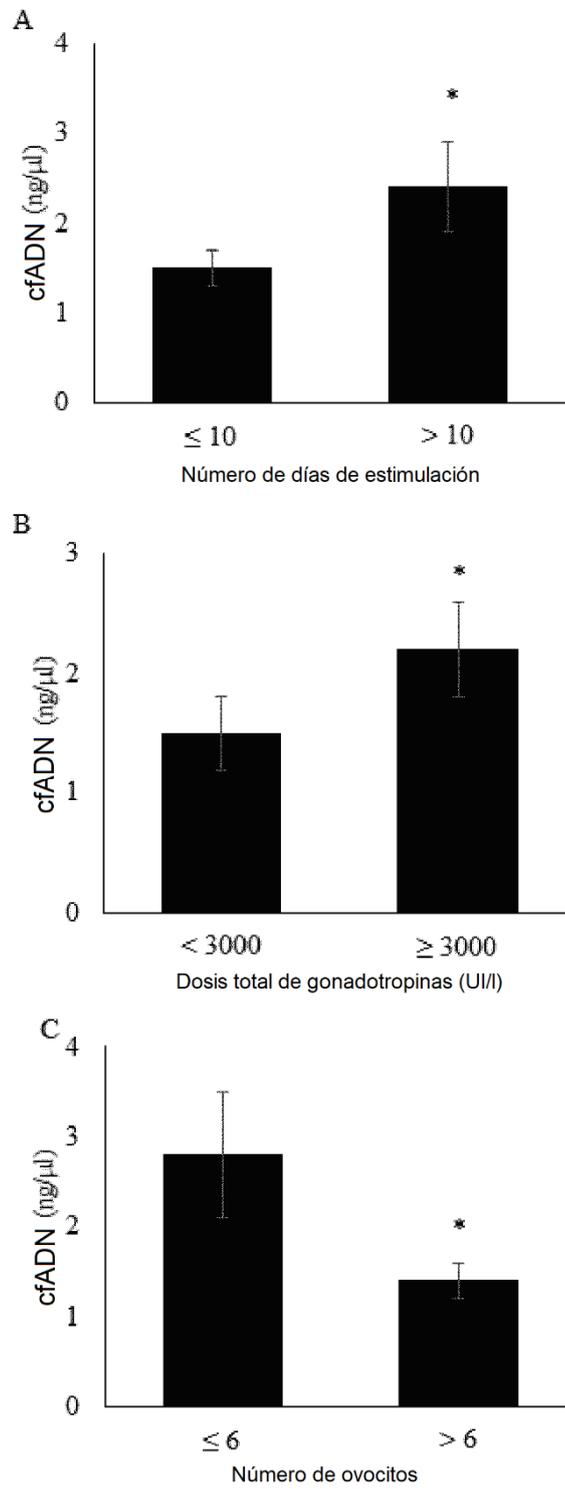


Figura 6

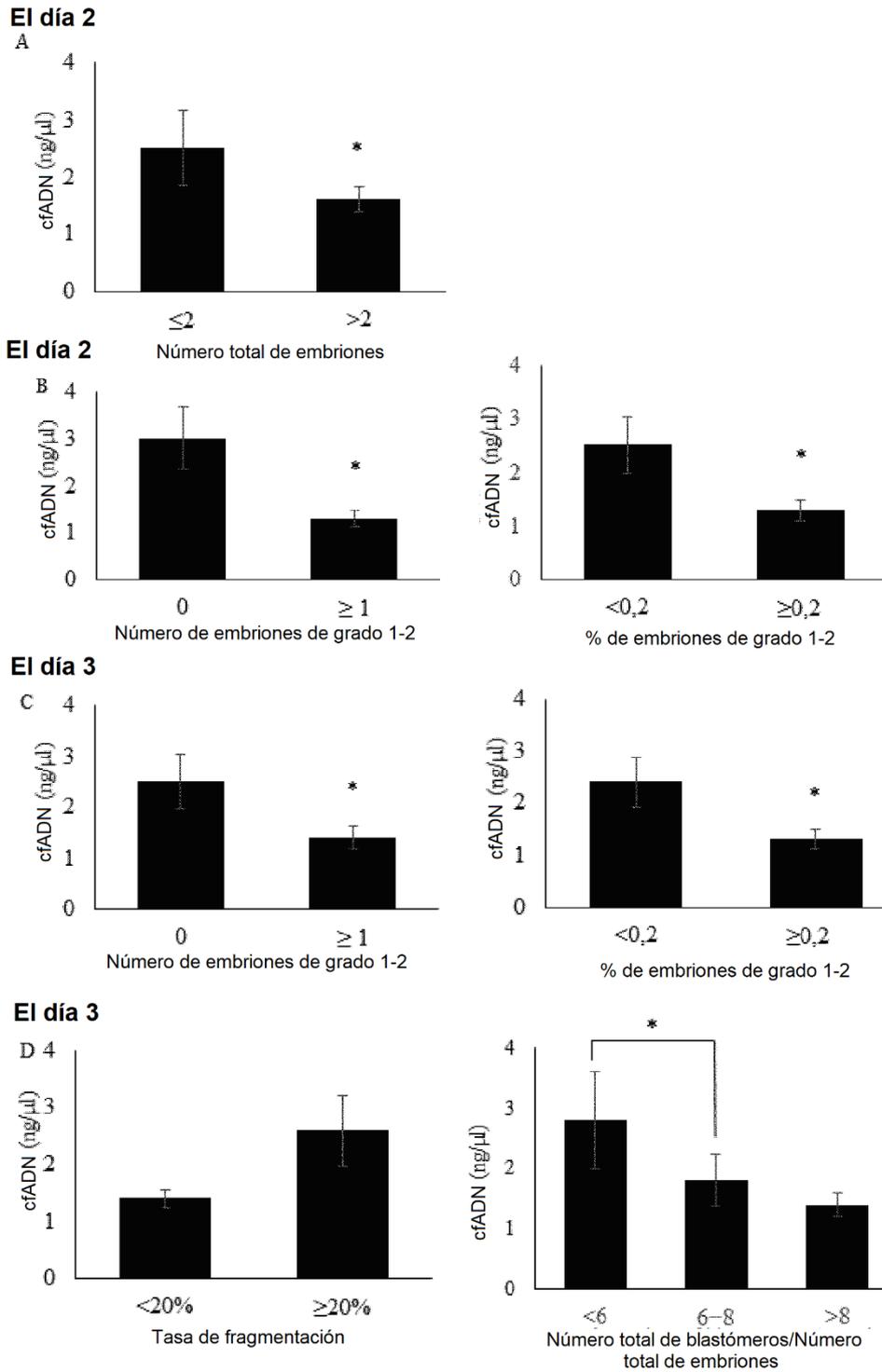


Figura 7

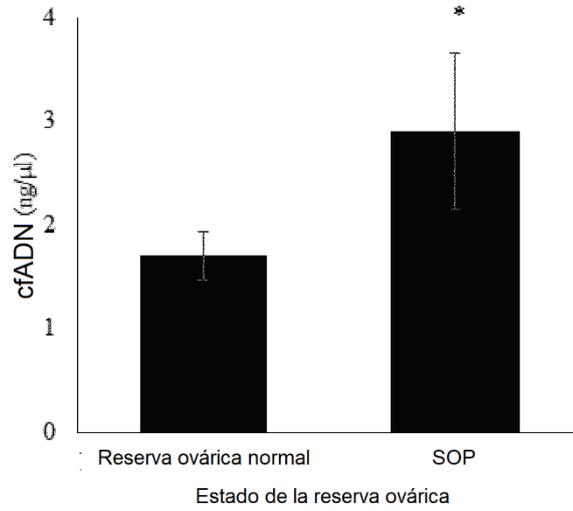


Figura 8

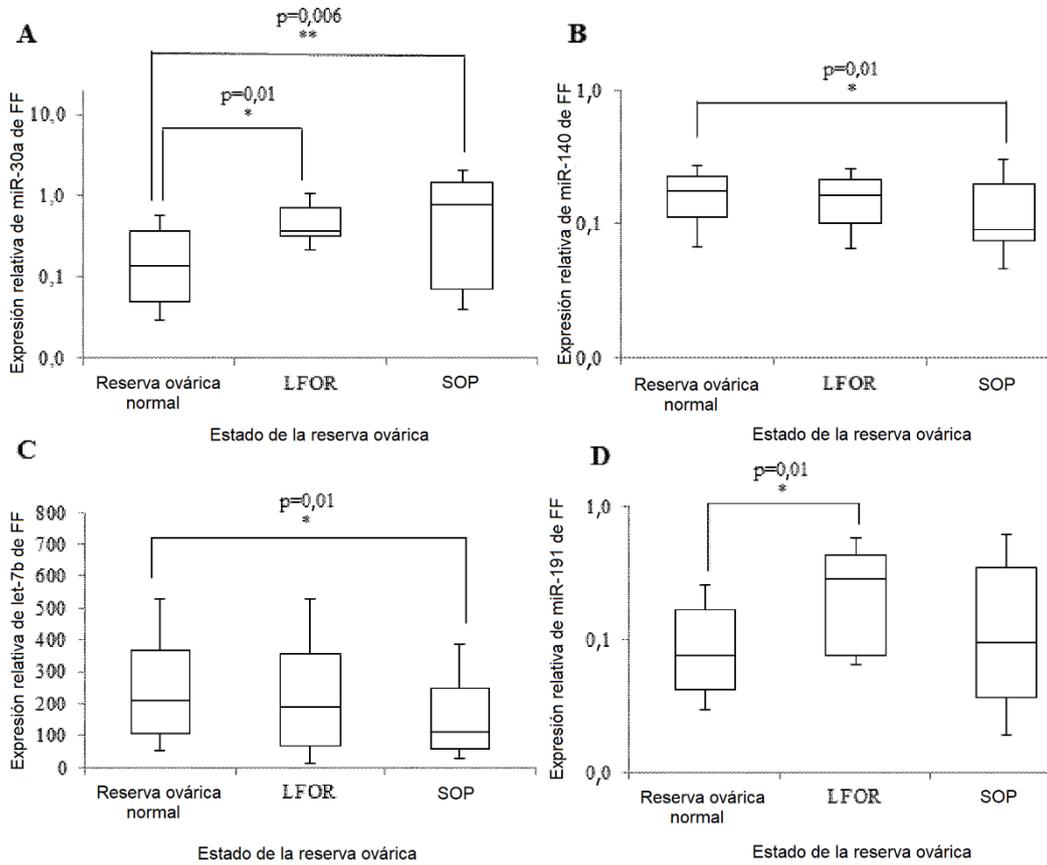


Figura 9

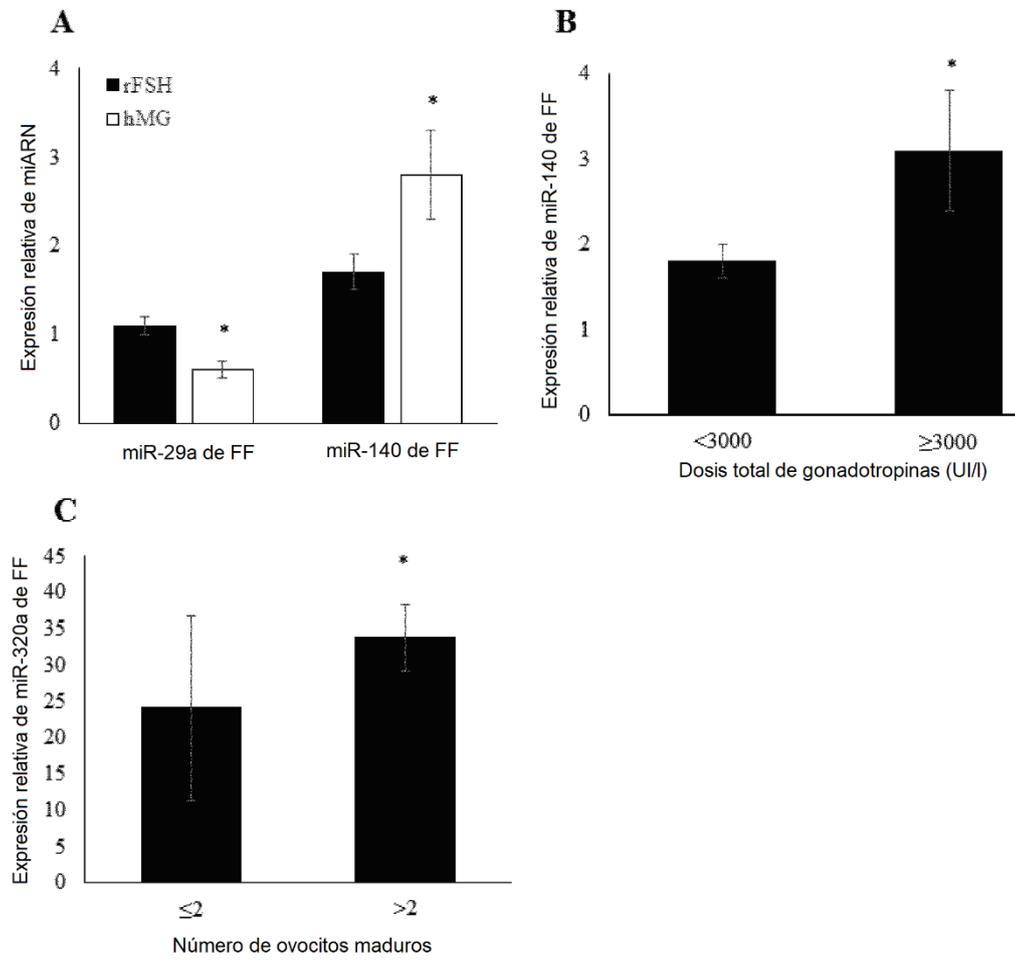


Figura 10

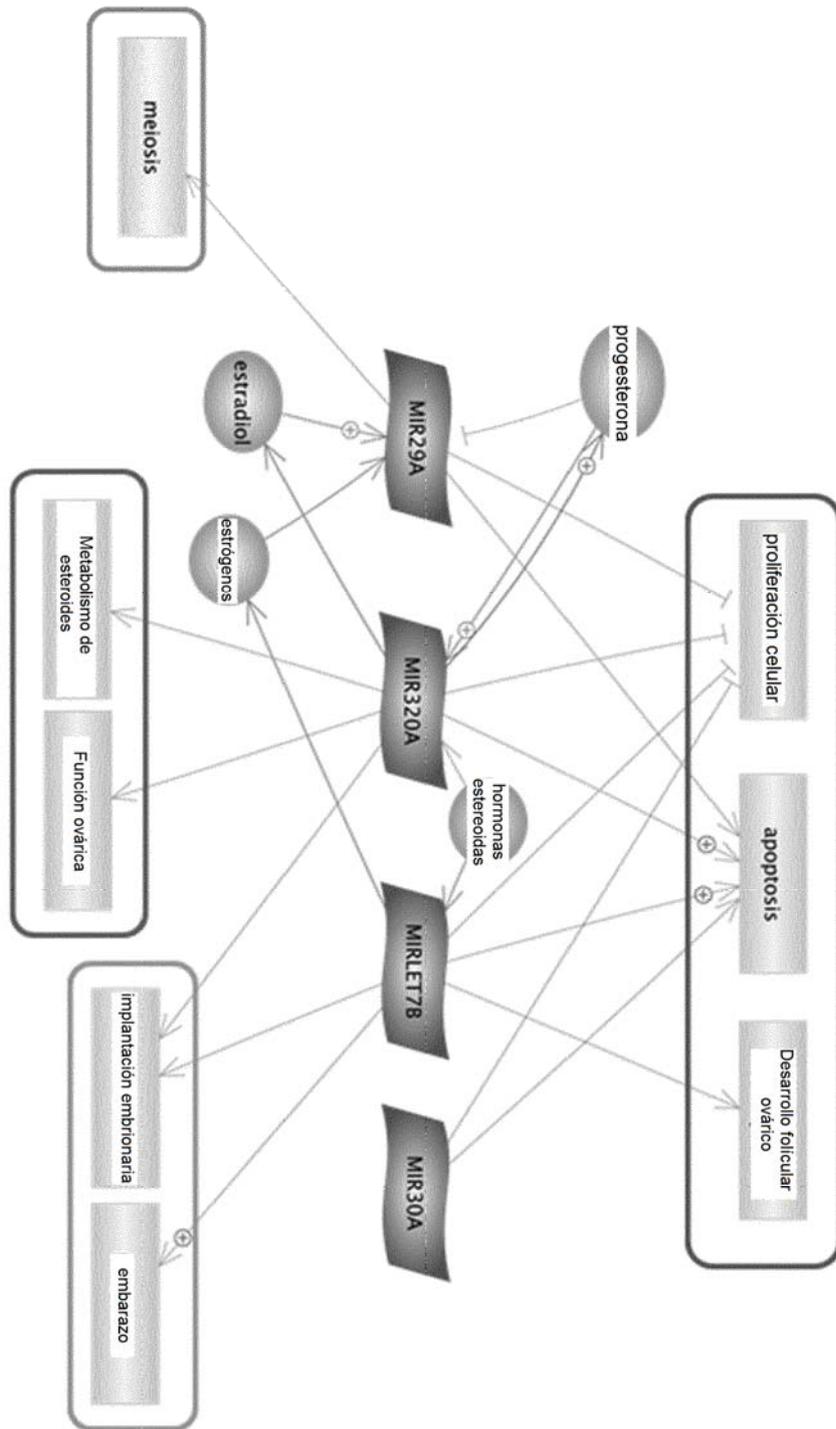


Figura 11

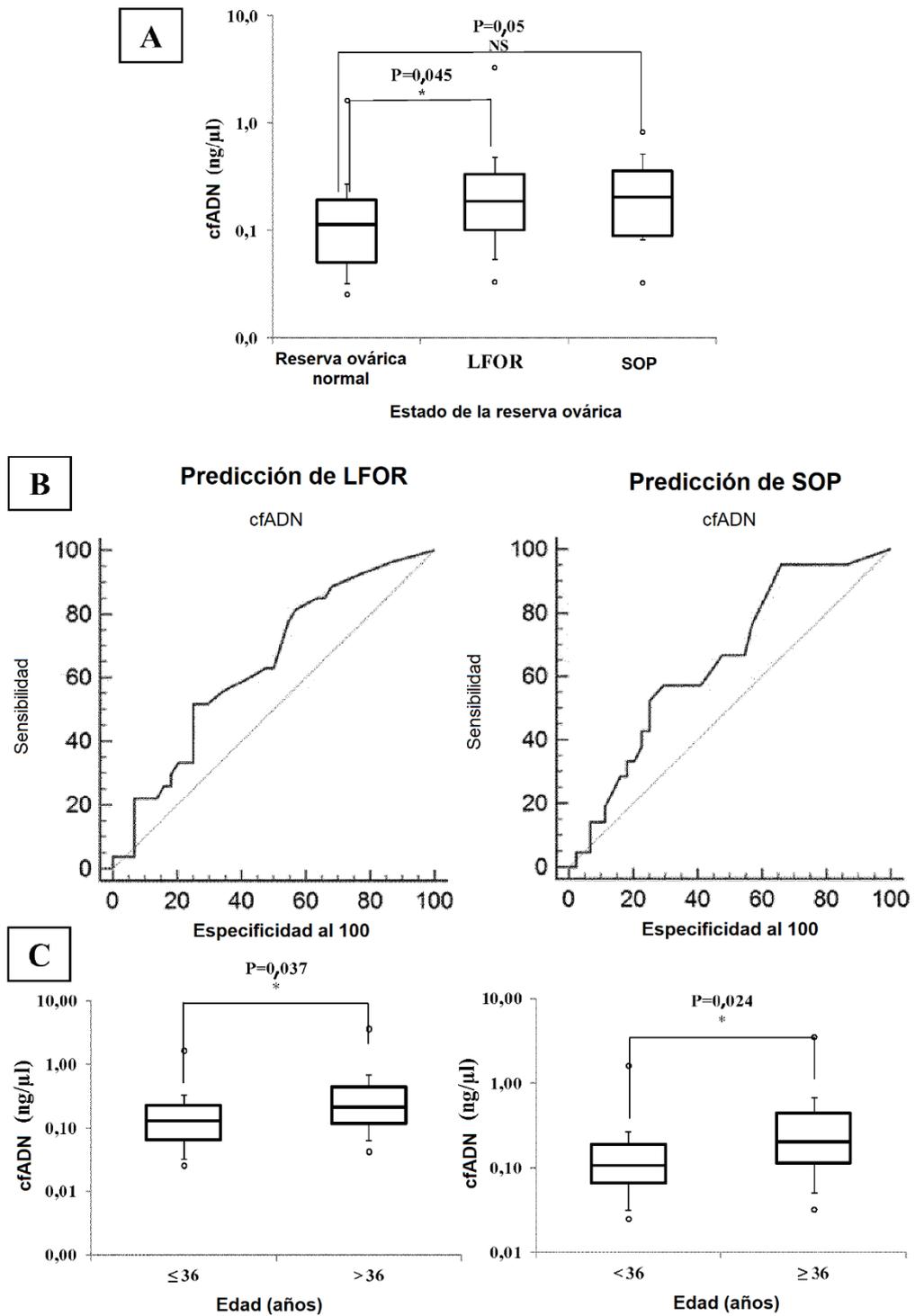


Figura 12A, B y C

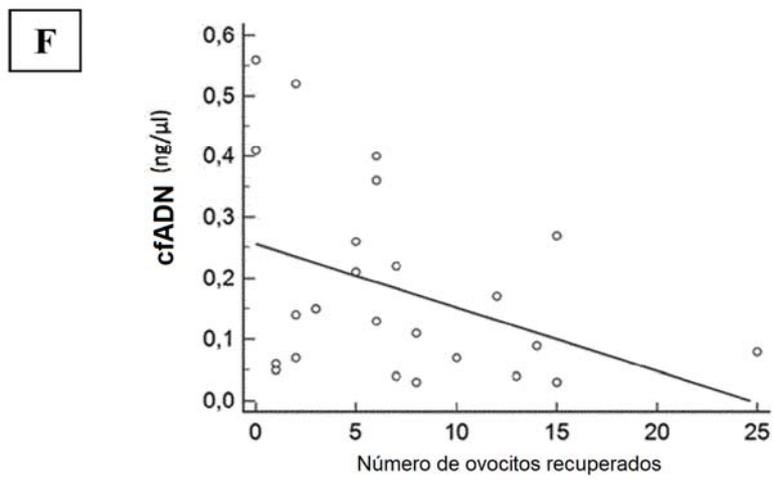
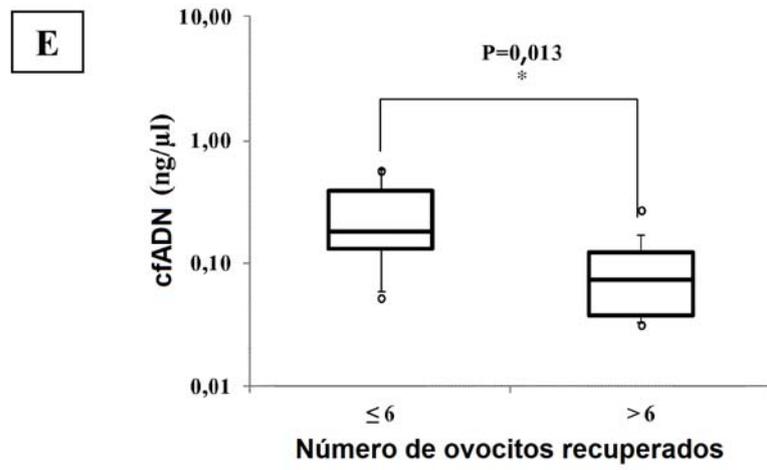
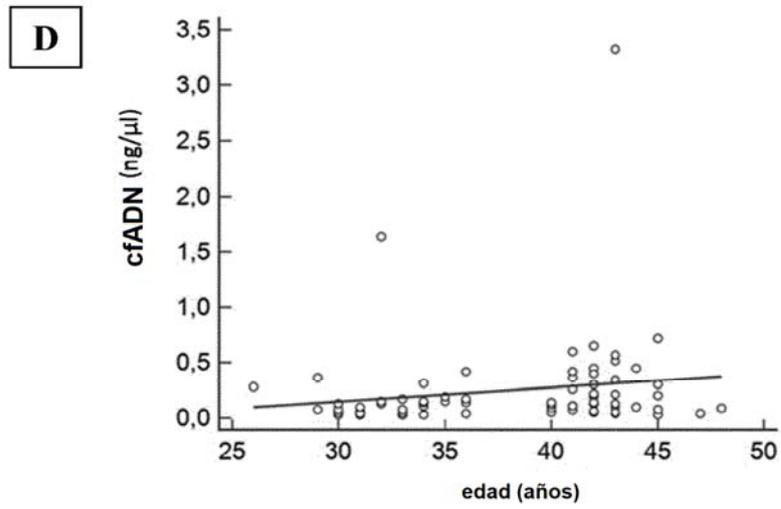


Figura 12 D, E y F

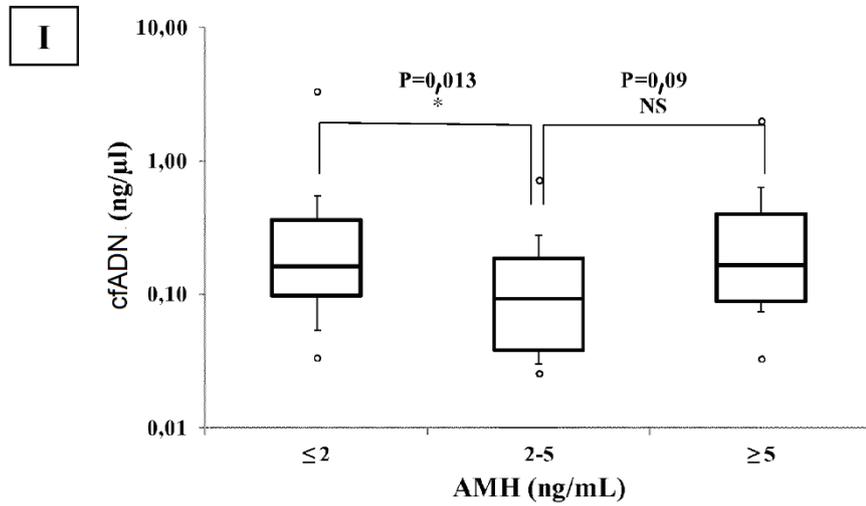
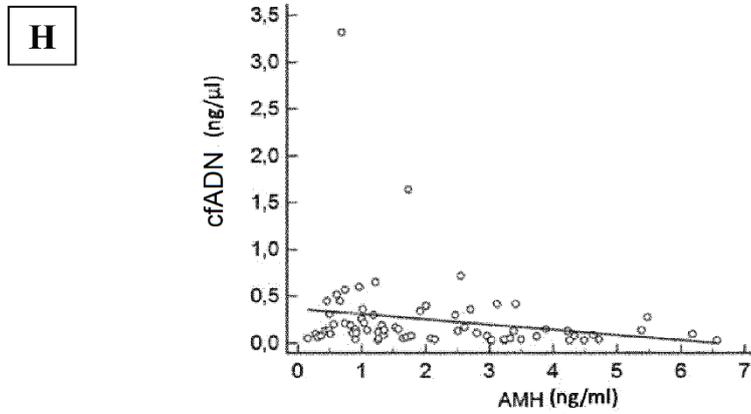
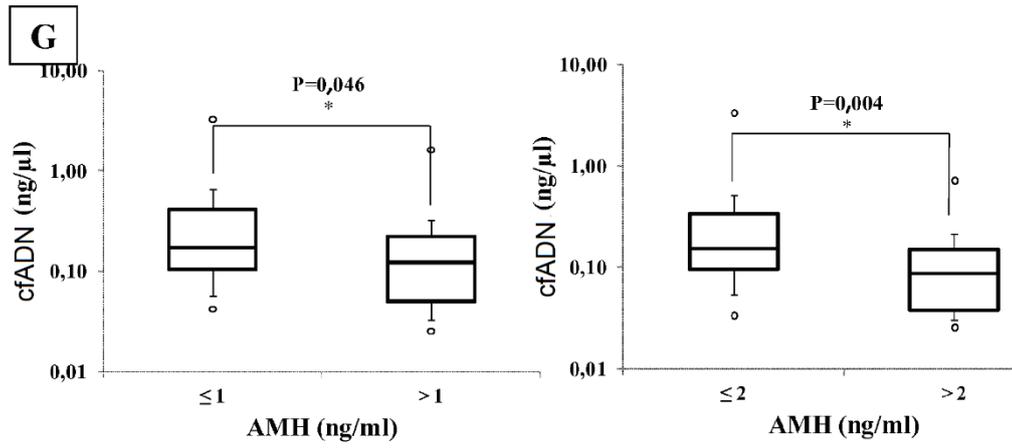


Figura 12 G, H e I

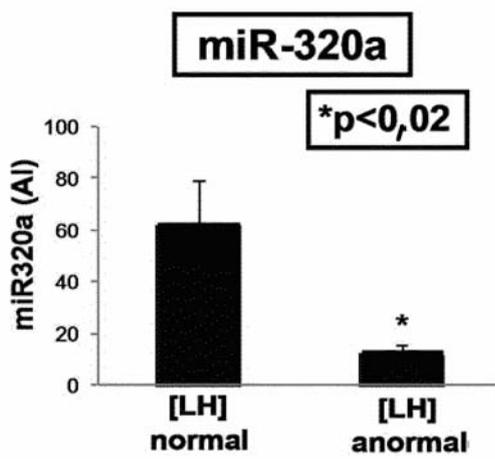
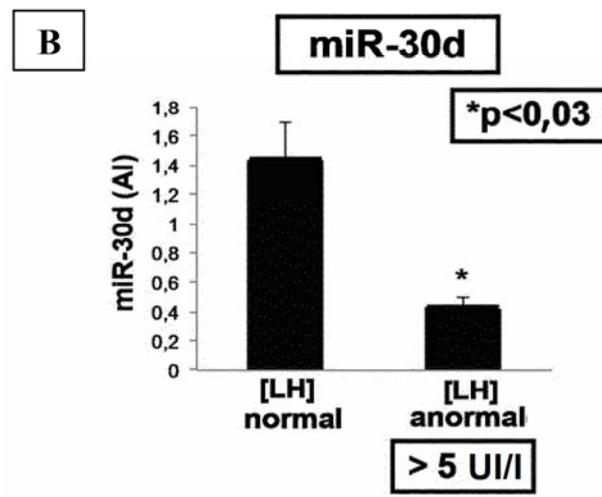
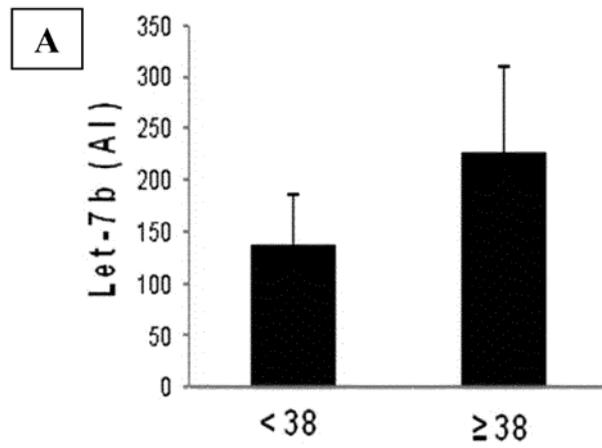


Figura 13 A y B