

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 830**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010 E 10713218 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2419526**

54 Título: **Métodos para seleccionar ovocitos y embriones competentes con elevado potencial de resultado de embarazo**

30 Prioridad:

**17.04.2009 EP 09305331**

**05.05.2009 US 175503 P**

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

**02.06.2016**

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;**

**DE VOS, JOHN y**

**ASSOU, SAID**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 572 830 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 para seleccionar ovocitos y embriones competentes con elevado potencial de resultado de embarazo

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para seleccionar un ovocito competente o un embrión competente.

10 **Estado de la técnica**

10 En las técnicas de reproducción asistida (TRA), las tasas de embarazo y natalidad después de los intentos de fecundación *in vitro* (FIV) siguen siendo bajas. De hecho, 2 de cada 3 ciclos de FIV no consiguen el embarazo (SART 2004) y más de 8 de cada 10 embriones transferidos no logran implantarse (Kovalevsky y Patrizio, 2005). Además, más del 50 % de los niños nacidos por FIV son causa de gestaciones múltiples (Reddy *et al.*, 2007). Se estima que los partos prematuros que resultan de embarazos múltiples causados por TRA representan aproximadamente un coste sanitario anual de 890 millones de dólares en Estados Unidos (Bromer y Seli, 2008).

20 Los parámetros morfológicos subjetivos siguen siendo un criterio principal para seleccionar embriones sanos empleados en programas de FIV e IEIC. Sin embargo, dichos criterios no predicen realmente la competencia de un embrión. Muchos estudios han demostrado que una combinación de varios criterios morfológicos diferentes da lugar a una selección más precisa de embriones (Balaban y Urman, 2006; La Sala *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2000). Los criterios morfológicos para la selección de embriones se evalúan en el día de la transferencia, y se basan principalmente en la escisión embrionaria prematura (25-27 h posinseminación), en la cantidad y el tamaño de blastómeros en el día dos o día tres, en el porcentaje de fragmentación y en la presencia de multinucleación en el estadio de 4 u 8 células (Fenwick *et al.*, 2002).

30 No obstante, un estudio reciente ha demostrado que la selección de ovocitos para la inseminación no mejora los resultados de las TRA en comparación con la transferencia de todos los embriones disponibles, independientemente de su calidad (La Sala *et al.*, 2008). Existe la necesidad de identificar embriones viables con el mayor potencial de implantación para aumentar las tasas de éxito de FIV, reducir la cantidad de embriones para remplazo nuevo y disminuir las tasas de embarazo múltiple.

35 Por todos estos motivos, actualmente se están investigando varios biomarcadores para la selección de embriones (Haouzi *et al.*, 2008; Pearson, 2006). Como los embriones que producen embarazo difieren en sus perfiles metabólicos en comparación con embriones que no, algunos estudios están intentando identificar una firma molecular que pueda detectarse por evaluación no invasiva del medio de cultivo del embrión (Brison *et al.*, 2004; Gardner *et al.*, 2001; Sakkas y Gardner, 2005; Seli *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007).

40 La genómica también está proporcionando el conocimiento fundamental de la función genética y celular durante el desarrollo embrionario. (McKenzie *et al.*, 2004) y (Feuerstein *et al.*, 2007) han descrito, que la expresión de varios genes en las células del cumulus, tales como la ciclooxigenasa 2 (COX2), reflejaba la calidad de los ovocitos y embriones. Gremlin 1 (GREM1), ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), proteína reguladora aguda esteroideogénica (STAR), esteroil-coenzima A desaturasa 1 y 5 (SCD1 y 5), anfirregulina (AREG) y pentraxina 3 (PTX3) también han demostrado relacionarse positivamente con la calidad del embrión (Zhang *et al.*, 2005). Más recientemente, la expresión de la glutatión peroxidasa 3 (GPX3), receptor de quimioquinas 4 (CXCR4), ciclina D2 (CCND2) y catenina delta 1 (CTNND1) en células del cumulus humanas ha demostrado relacionarse inversamente con la calidad del embrión, en base a las tasas de escisión prematura durante el desarrollo embrionario (van Montfoort *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar del hecho de que la escisión prematura ha demostrado ser un biomarcador fiable para predecir el embarazo (Lundin *et al.*, 2001; Van Montfoort *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007), solo se han identificado unos marcadores genéticos de resultado de embarazo en las células del cumulus (Assou S *et al.*, *Mol Hum Reprod.* diciembre de 2008; 14(12):711-9; Fourar *et al. Fertility and sterility*, 1 de septiembre de 2008).

**Objeto de la invención**

55 Se desvela un método para seleccionar un ovocito que, una vez fecundado, produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo, comprende una etapa de medición del nivel de expresión de 45 genes en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito, en la que dichos genes son WNT6, LRCH4, PAX8, CABP4, PDE5A, BCL2L11, PCK1, TCF20, SLAMF6, EPOR, CACNG6, NLRP1, PECAM1, NOS1, ATF3, KRTAP8, GRIK5, SLC24A3, SLC5A12, SLCA10A2, SLCO1A2, SLC25A5, MG29, NLGN2, PRKACA, FOSB, SIAT6, LOXL2, PRF1, ADPRH, APBB3, EGR3, CNR2, IFITM1, PLA2G5, CAMTA1, SOX4, NFIB, NFIC, RBMS1, GOS2, FAT3, SLC40A1, GPC6 e IGF1R,

60 - que comprende además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control refleja si el ovocito es competente.

La presente divulgación también se refiere a un método para seleccionar un embrión con una elevada tasa de implantación que produce embarazo, comprende una etapa de medición del nivel de expresión de 45 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión, en la que dichos genes son WNT6, LRCH4, PAX8, CABP4, PDE5A, BCL2L11, PCK1, TCF20, SLAMF6, EPOR, CACNG6, NLRP1, PECAM1, NOS1, ATF3, KRTAP8, GRIK5, SLC24A3, SLC5A12, SLCA10A2, SLCO1A2, SLC25A5, MG29, NLGN2, PRKACA, FOSB, SIAT6, LOXL2, PRF1, ADPRH, APBB3, EGR3, CNR2, IFITM1, PLA2G5, CAMTA1, SOX4, NFIB, NFIC, RBMS1, G0S2, FAT3, SLC40A1, GPC6 e IGF1R,

- que comprende además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control refleja si el embrión es competente.

La presente invención se refiere a un método para seleccionar un ovocito que, una vez fecundado, produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo o para seleccionar un embrión con una elevada tasa de implantación que produce embarazo, comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito o dicho embrión, del nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre los grupos A, B o C, en los que el grupo A consiste en PCK1, ADPRH, CABP4, SLAMF6, CAMTA1, CSPG2, y PRF1; el grupo B consiste en FOSB, NLGN2, PDE5A, PLA2G5, GPC6, y EGR3; y el grupo C consiste en NFIB, NFIC, IGF1R, G0S2, GRIK5 y RBMS1.

La sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo A permite predecir que un ovocito o embrión competente produce embarazo. La sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo B permite predecir un ovocito o embrión no competente, siendo el embrión incapaz de implantarse. La sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo C permite predecir un ovocito o embrión no competente debido a la detención prematura del embrión.

#### Descripción detallada de la invención

Los inventores han determinado que un conjunto de genes expresados en células del cumulus son biomarcadores para el potencial del embrión y el resultado de embarazo. Se demostró que el perfil de expresión génica de las células del cumulus que rodean los ovocitos se relacionaba con diferentes resultados de embarazo, permitiendo la identificación de una firma de expresión específica de embriones que se desarrollan con respecto al embarazo. Sus resultados indican que el análisis de las células del cumulus que rodean el ovocito es un enfoque no invasivo para la selección de embriones.

#### Conjunto de genes predictivos:

Todos los genes pertenecientes a la invención se conocen *per se*, y se enumeran en las siguientes Tablas A y B. Las Tablas A y B presentan el conjunto de genes cuyo perfil de expresión combinado ha demostrado ser de carácter informativo para seleccionar un ovocito competente o para seleccionar un embrión competente con un elevado potencial de implantación que produce embarazo.

Tabla A: conjunto de genes predictivos.

Símbolo del gen	Nombre del gen	n.º de identificación del gen
WNT6	miembro 6 de la familia tipo wingless con un sitio de integración para el virus MMTV	7475
LRCH4	dominio que contiene repeticiones ricas en leucina y homología calponina (HC)	4034
PAX8	caja pareada 8	7849
CABP4	proteína de unión a calcio 4	57010
PDE5A	fosfodiesterasa 5A específica para GMPc	8654
BCL2L11	BCL2 tipo 11 (facilitador de apoptosis)	10018
PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	5105
TCF20	factor de transcripción 20 (AR1)	6942
SLAMF6	miembro 6 de la familia SLAM	114836
EPOR	receptor de la eritropoyetina	2057
CACNG6	subunidad gamma 6 del canal de calcio dependiente de voltaje	59285
NLRP1	familia NLR que contiene el dominio pirina 1	22861

ES 2 572 830 T3

Símbolo del gen	Nombre del gen	n.º de identificación del gen
PECAM1	molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales	5175
NOS1	óxido nítrico sintasa 1 (neuronal)	4842
ATF3	factor de transcripción activador 3	467
KRTAP8	proteína 8-1 asociada con queratina	337879
GRIK5	receptor ionotrópico de glutamato tipo kainato 5	2901
SLC24A3	miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 24 (intercambiador de sodio/potasio/calcio)	57419
SLC5A12	miembro 12 de la familia de transportadores de solutos 5 (cotransportador de sodio/glucosa)	159963
SLCA10A2	miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 10 (familia del cotransportador de sodio/ácido biliar)	6555
SLCO1A2	miembro 1A2 de la familia de transportadores de solutos para transportador de aniones orgánicos	6579
SLC25A5	miembro 5 de la familia de transportadores de solutos 25 (transportador mitocondrial; translocador de nucleótidos de adenina)	292
MG29 o SYPL2	sinaptofisina tipo 2	284612
NLGN2	neuroigina 2	57555
PRKACA	proteína quinasa dependiente de AMPc catalítica alfa	5566
FOSB	homólogo B del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ	2354
SIAT6	ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 3	6487
LOXL2	lisil oxidasa tipo 2	4017
PRF1	perforina 1 (proteína de formación de poros)	5551
ADPRH	ADP-ribosilarginina hidrolasa	141
APBB3	miembro 3 de la familia B de unión a proteína precursora beta amiloide (A4)	10307
EGR3	gen de respuesta al crecimiento rápido 3	1960
CNR2	receptor cannabinoide 2 (macrófagos)	1269
IFITM1	proteína transmembrana 1 inducida por interferón (9-27)	8519
PLA2G5	fosfolipasa A2 del grupo V	5322
CAMTA1	activador de transcripción 1 de unión a calmodulina	23261
SOX4	SRY (región Y determinante del sexo) caja 4	6659
NFIB	factor nuclear I/B	4781
NFIC	factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT)	4782
RBMS1	proteína 1 de interacción monocatenaria con motivo de unión a ARN	5937
G0S2	conmutador G0/G1 2	50486
FAT3	homólogo 3 del supresor tumoral FAT ( <i>Drosophila</i> )	120114
SLC40A1	miembro 1 de la familia de transportadores de solutos 40 (transportador regulado por hierro)	30061
GPC6	glipicano 6	10082
IGF1R	receptor 1 del factor de crecimiento semejante a la insulina	3480

Un objetivo de la divulgación se refiere a un método para seleccionar un ovocito competente, que comprende una etapa de medición del nivel de expresión de 45 genes en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito, en la que

dichos genes son WNT6, LRCH4, PAX8, CABP4, PDE5A, BCL2L11, PCK1, TCF20, SLAMF6, EPOR, CACNG6, NLRP1, PECAM1, NOS1, ATF3, KRTAP8, GRIK5, SLC24A3, SLC5A12, SLCA10A2, SLC01A2, SLC25A5, MG29, NLGN2, PRKACA, FOSB, SIAT6, LOXL2, PRF1, ADPRH, APBB3, EGR3, CNR2, IFITM1, PLA2G5, CAMTA1, SOX4, NFIB, NFIC, RBMS1, G0S2, FAT3, SLC40A1, GPC6 e IGF1R.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "ovocito competente" se refiere a un gameto u óvulo femenino que, una vez fecundado, produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo.

10 Según la invención, el ovocito puede ser resultado de un ciclo natural, un ciclo natural modificado o un ciclo estimulado para FIVc o IEIC. El término "ciclo natural" se refiere al ciclo natural por el cual la hembra o mujer produce un ovocito. El término "ciclo natural modificado" se refiere al proceso por el cual la hembra o mujer produce un ovocito o dos con una estimulación ovárica leve con antagonistas de la HLG asociados con HEF o GMh recombinante. El término "ciclo estimulado" se refiere al proceso por el cual una hembra o una mujer produce uno o más ovocitos bajo estimulación con agonistas o antagonistas de la HLG asociados con HEF o GMh recombinante.

15 El término "célula del cumulus" se refiere a una célula comprendida en una masa de células que rodea un ovocito. Se cree que estas células se implican en proporcionar a un ovocito algo de su nutrición, energía y u otros requisitos que son necesarios para producir un embrión viable tras la fecundación.

20 Los métodos de la invención comprenden una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control refleja si el ovocito es competente. El control puede consistir en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un ovocito competente o una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un ovocito sin fecundar.

25 Los métodos de la invención se aplican preferentemente a mujeres aunque pueden aplicarse a otros mamíferos (p. ej., primates, perros, gatos, cerdos, vacas...).

30 Los métodos de la invención resultan particularmente adecuados para evaluar la eficacia de un tratamiento de fecundación *in vitro*. Se desvela un método para evaluar la eficacia de un protocolo de hiperestimulación ovárica controlada (HOC) en un sujeto femenino que comprende:

- i) proporcionar a partir de dicho sujeto femenino al menos un ovocito con sus células del cumulus;
- ii) determinar por medio de un método de la invención si dicho ovocito es un ovocito competente.

35 A continuación, después de dicho método, el embriólogo puede seleccionar los ovocitos competentes y fecundarlos *in vitro* a través de un protocolo clásico de fecundación *in vitro* (FIVc) o de un protocolo de inyección espermática intracitoplasmática (IEIC).

40 Se desvela un método para controlar la eficacia de un protocolo de hiperestimulación ovárica controlada (HOC) que comprende:

- i) aislar de dicha mujer al menos un ovocito con sus células del cumulus en ciclos naturales, modificados o estimulados;
- ii) determinar por medio de un método de la invención si dicho ovocito es un ovocito competente;
- iii) y controlar la eficacia del tratamiento de HOC en base a si produce un ovocito competente.

50 El tratamiento de HOC puede basarse al menos en un principio activo seleccionado entre el grupo que consiste en agonistas o antagonistas de la HLG asociados con HEF o GMh recombinante.

55 La presente divulgación se refiere asimismo a un método para seleccionar un embrión competente, que comprende una etapa de medición del nivel de expresión de 45 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión, en la que dichos genes son WNT6, LRCH4, PAX8, CABP4, PDE5A, BCL2L11, PCK1, TCF20, SLAMF6, EPOR, CACNG6, NLRP1, PECAM1, NOS1, ATF3, KRTAP8, GRIK5, SLC24A3, SLC5A12, SLCA10A2, SLC01A2, SLC25A5, MG29, NLGN2, PRKACA, FOSB, SIAT6, LOXL2, PRF1, ADPRH, APBB3, EGR3, CNR2, IFITM1, PLA2G5, CAMTA1, SOX4, NFIB, NFIC, RBMS1, G0S2, FAT3, SLC40A1, GPC6 e IGF1R.

60 El término "embrión" se refiere a un ovocito o cigoto fecundado. Dicha fecundación puede surgir de un protocolo clásico de fecundación *in vitro* (FIVc) o de un protocolo de inyección espermática intracitoplasmática (IEIC).

65 El término "fecundación *in vitro* clásica" o "FIVc" se refiere a un proceso por el cual los ovocitos se fecundan por espermatozoides fuera del cuerpo, *in vitro*. La FIV es un tratamiento principal para la infertilidad cuando ha fallado la concepción *in vivo*. El término "inyección espermática intracitoplasmática" o "IEIC" se refiere a un procedimiento de fecundación *in vitro* en el que se inyecta directamente un único espermatozoide en un ovocito. Este procedimiento se utiliza muy frecuentemente para superar factores de infertilidad masculina, aunque también puede utilizarse cuando los espermatozoides no pueden penetrar fácilmente los ovocitos, y ocasionalmente puede emplearse como

un método de fecundación *in vitro*, especialmente el asociado con la donación de esperma.

El término "embrión competente" se refiere a un embrión con una elevada tasa de implantación que produce embarazo. El término "elevada tasa de implantación": se entiende como el potencial del embrión que una vez transferido al útero, se implanta en el entorno uterino y produce un feto viable, que a su vez se desarrolla en una progenie viable ausente de un procedimiento o acontecimiento que finalice dicho embarazo.

Los métodos de la divulgación en el presente documento pueden comprender además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control refleja si el embrión es competente. El control puede consistir en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un embrión que da lugar a un feto viable o una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un embrión que no produce un feto viable.

Cabe señalar que los métodos de la invención producen una independencia de consideraciones morfológicas del embrión. Dos embriones pueden poseer los mismos aspectos morfológicos pero mediante un método de la invención pueden presentar una tasa de implantación diferente que produce embarazo.

Los métodos de la invención se aplican preferentemente a mujeres aunque pueden aplicarse a otros mamíferos (p. ej., primates, perros, gatos, cerdos, vacas...).

La presente divulgación se refiere igualmente a un método para determinar si un embrión es un embrión competente, comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de 45 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión, en la que dichos genes son WNT6, LRCH4, PAX8, CABP4, PDE5A, BCL2L11, PCK1, TCF20, SLAMF6, EPOR, CACNG6, NLRP1, PECAM1, NOS1, ATF3, KRTAP8, GRIK5, SLC24A3, SLC5A12, SLCA10A2, SLCO1A2, SLC25A5, MG29, NLGN2, PRKACA, FOSB, SIAT6, LOXL2, PRF1, ADPRH, APBB3, EGR3, CNR2, IFITM1, PLA2G5, CAMTA1, SOX4, NFIB, NFIC, RBMS1, G0S2, FAT3, SLC40A1, GPC6 e IGF1R.

La presente divulgación también se refiere a un método para determinar si un embrión es un embrión competente, que comprende:

- i) proporcionar un ovocito con sus células del cumulus
- ii) fecundar *in vitro* dicho ovocito
- iii) determinar si el embrión que se produce en la etapa ii) es competente determinando mediante un método de la invención si dicho ovocito de la etapa i), es un ovocito competente.

un método para seleccionar un ovocito que, una vez fecundado, produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo o para seleccionar un embrión con una elevada tasa de implantación que produce embarazo, comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito o dicho embrión, del nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre los grupos A, B o C, en los que el grupo A consiste en PCK1, ADPRH, CABP4, SLAMF6, CAMTA1, CSPG2, y PRF1; el grupo B consiste en FOSB, NLGN2, PDE5A, PLA2G5, GPC6, y EGR3; y el grupo C consiste en NFIB, NFIC, IGF1R, G0S2, GRIK5 y RBMS1.

La sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo A permite predecir que un ovocito o embrión competente produce embarazo. La sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo B permite producir un ovocito o embrión no competente, siendo el embrión incapaz de implantarse. La sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo C permite producir un ovocito o embrión no competente debido a la detención prematura del embrión.

Se pueden seleccionar dicho uno o más genes, por ejemplo, entre solo el grupo A, solo el grupo B o solo el grupo C.

Normalmente, pueden seleccionarse entre el grupo A 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 genes.

Normalmente, pueden seleccionarse entre el grupo B 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes.

Normalmente, pueden seleccionarse entre el grupo C 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes.

Alternativamente, dichos genes pueden seleccionarse, por ejemplo, entre los grupos A y B, entre los grupos A y C, entre los grupos B y C, o entre los grupos A, B y C.

Normalmente, pueden seleccionarse entre el grupo A 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 genes, entre el grupo B pueden seleccionarse 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 y entre el grupo C pueden seleccionarse 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes.

Normalmente, pueden seleccionarse entre el grupo A 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 genes, entre el grupo B pueden seleccionarse 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes y entre el grupo C pueden seleccionarse 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes.

Normalmente, pueden seleccionarse entre el grupo A 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 genes, entre el grupo B pueden seleccionarse 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes y entre el grupo C pueden seleccionarse 1, 2, 3, 4, 5, o 6 genes.

Los métodos de la invención resultan particularmente adecuados para potenciar el resultado de embarazo de una mujer. Se desvela un método para potenciar el resultado de embarazo de una mujer que comprende:

- i) seleccionar un embrión competente realizando un método de la invención
- iii) implantar el embrión seleccionado en la etapa i) en el útero de dicha mujer.

El método descrito previamente ayudará por tanto al embriólogo a evitar la transferencia al útero de embriones con un bajo potencial de resultado de embarazo.

5 El método que se ha descrito previamente también es particularmente apto para evitar embarazos múltiples seleccionando el embrión competente capaz de dar lugar a una implantación y a un embarazo.

En todos los casos previos, los métodos describieron la relación entre el perfil de expresión génica de las células del cumulus, los embriones y los resultados de embarazo.

10 **Métodos para determinar el nivel de expresión de los genes de la invención:**

La determinación del nivel de expresión de los genes descritos previamente en las Tablas A y B puede realizarse mediante una variedad de técnicas. En general, el nivel de expresión, tal como se determina, es un nivel de expresión relativo.

15 Más preferentemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar así la presencia, o medir en un principio la cantidad de polipéptidos o ácidos nucleicos de interés en la muestra. El contacto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, placa de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna, etcétera. En realizaciones específicas, el contacto se realiza sobre un sustrato recubierto con el reactivo, tal como una matriz de ácido nucleico o una matriz de ligando específico. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido, tal como cualquier soporte adecuado que comprende vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede presentar varias formas y tamaños, tales como una lámina, una membrana, una microesfera, una columna, un gel, etc. El contacto puede realizarse en cualquier condición adecuada para un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, que se forma entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra.

En una realización preferente, el nivel de expresión puede determinarse precisando la cantidad de ARNm.

30 Los métodos para determinar la cantidad de ARNm se conocen adecuadamente en la materia. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (p. ej., célula o tejido preparado a partir del paciente) se extrae en primer lugar según los métodos convencionales, por ejemplo empleando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas unidas a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta pues por hibridación (p. ej., análisis de membrana de Northern) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR). Preferentemente, resulta preferente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. Resulta particularmente ventajosa RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real.

35 Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (RCL), amplificación mediada por transcripción (AMT), amplificación por desplazamiento de cadena (ADC) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (ABSAN).

40 Los ácidos nucleicos con al menos 10 nucleótidos y que exhiben complementariedad u homología de secuencia en el ARNm de interés del presente documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que dichos ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, pero son generalmente al menos idénticos aproximadamente al 80 % a la región homóloga de tamaño comparable, más preferentemente idénticos al 85 % y aún más preferentemente idénticos al 90-95 %. En determinadas realizaciones, resultará ventajoso emplear ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados en la materia incluyendo, ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (p. ej., avidina/biotina).

50 Las sondas comprenden normalmente ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 a 1.000 nucleótidos de longitud, por ejemplo entre 10 y 800, más preferentemente entre 15 y 700, generalmente entre 20 y 500. Los cebadores en general son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 a 25 nucleótidos de longitud, diseñados para aparearse perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, a amplificar. Las sondas y cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que se hibridan, es decir, se hibridan preferentemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondientes a la temperatura de fusión  $T_f$  más elevada, p. ej., formamida al 50 %, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0,15 M, Na-citrato 0,015 M).

60 Los cebadores o sondas de ácido nucleico empleados en el método previo de amplificación y detección pueden ensamblarse como un kit. Dicho kit incluye cebadores y sondas moleculares consenso. Un kit preferente incluye asimismo los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones y enzimas de PCR; secuencias de control positivo, cebadores de control de reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

65 En una realización particular, los métodos de la invención comprenden las etapas para proporcionar los ARN totales extraídos de las células del cumulus y someter los ARN a amplificación e hibridación con sondas específicas, más particularmente por medio de una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

En otra realización preferente, el nivel de expresión se determina por análisis de chip de ADN. Dicho chip de ADN o micromatriz de ácido nucleico consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que se unen químicamente a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla de tamaño microesférico. Un microchip puede constituirse de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos, tales como ADNcs u oligonucleótidos que pueden poseer aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para determinar el nivel de expresión, se marca una muestra de un sujeto de ensayo, opcionalmente sometida en primer lugar a transcripción inversa, y se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que lleva a la formación de complejos entre ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de sonda unidas a la superficie de la micromatriz. Los complejos hibridados marcados se detectan entonces y pueden cuantificarse o semicuantificarse. El marcaje puede conseguirse por varios métodos, p. ej., utilizando marcaje radioactivo o fluorescente. Se disponen numerosas variantes de la tecnología de hibridación de micromatriz para el experto en la materia (véase, p. ej., la revisión de Hoheisel, *Nature Reviews, Genetics*, 2006, 7:200-210).

En este contexto, se desvela adicionalmente un chip de ADN que comprende un soporte sólido que porta los ácidos nucleicos que son específicos para los genes enumerados en la tabla A o B.

Otros métodos para determinar el nivel de expresión de dichos genes incluyen la determinación de la cantidad de proteínas codificadas por dichos genes.

Dichos métodos comprenden poner en contacto la muestra con un ligando capaz de interactuar de forma selectiva con una proteína marcador presente en la muestra. El ligando es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.

La presencia de la proteína puede detectarse empleando técnicas electroforéticas y de inmunodiagnóstico convencionales, incluyendo inmunoensayos, tales como ensayos de competición, reacción directa, o tipo sándwich. Estos ensayos incluyen, entre otros, membranas de Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones generalmente incluyen marcadores reveladores, tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, enzimáticos o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que han reaccionado con ello.

Los ensayos mencionados previamente implican en general la separación de la proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida al que se unen los complejos antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden utilizarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillo de microtitulación); polivinilcloruro (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., microesferas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotado; membranas de nailon; microesferas activadas, microesferas magnéticamente sensibles, y similares.

Más particularmente, puede utilizarse un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un anticuerpo contra la proteína a ensayar. A continuación, se añade una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene la proteína marcador a los pocillos recubiertos. Transcurrido un tiempo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la(s) placa(s) puede(n) lavarse para eliminar los restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier muestra de proteína marcador capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta utilizando métodos muy conocidos en la materia.

Alternativamente puede resultar preferente un método de inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ proporciona específicamente un método de detección de dianas en una muestra o espécimen tisular *in situ*. La integridad celular total de la muestra se mantiene en IHQ, permitiendo de este modo la detección tanto de la presencia como de la ubicación de las dianas de interés. Normalmente, una muestra se fija con formalina, se incorpora en parafina y se corta en secciones para la tinción y la posterior inspección por microscopía óptica. Los métodos actuales de IHQ utilizan marcaje directo o marcaje basado en anticuerpos secundarios o marcaje basado en hapteno. Ejemplos de sistemas IHQ conocidos incluyen, por ejemplo, EnVision(TM) (DakoCytomation), Powervision(R) (Immunovision, Springdale, AZ), el kit NBA(TM) (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA), HistoFine(R) (Nichirei Corp, Tokio, Japón).

En una realización particular, puede prepararse una sección tisular (p. ej., una muestra que comprende células del cumulus) en un portaobjetos u otro soporte tras la incubación con anticuerpos dirigidos contra las proteínas codificadas por los genes de interés. A continuación, pueden realizarse inspecciones microscópicas en la muestra preparada en un soporte sólido adecuado. Para la producción de fotomicrografías, pueden prepararse secciones que comprenden muestras en un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano, para realizar por tinción selectiva la presencia de las proteínas de interés.



Por lo tanto las muestras por IHQ pueden incluir, por ejemplo: (a) preparaciones que comprenden células del cumulus (b) fijar e incorporar dichas células y (c) detectar las proteínas de interés en dichas muestras celulares. En algunas realizaciones, un procedimiento de tinción por IHQ puede comprender etapas tales como: corte y recorte de tejido, fijación, deshidratación, infiltración en parafina, corte en secciones finas, preparación sobre portaobjetos de vidrio, cocción, desparafinación, rehidratación, extracción de antígeno, etapas de bloqueo, aplicación de anticuerpos primarios, lavado, aplicación de anticuerpos secundarios (opcionalmente acoplados a un marcador detectable apropiado), lavado, contratinción, y examen microscópico.

La invención también se refiere al uso de un kit para realizar los métodos de la invención que comprenden medios para medir específicamente el nivel de expresión de los genes de los grupos A, B y C en una célula del cumulus que rodea un ovocito o un embrión, en el que el grupo A consiste en PCK1, ADPRH, CABP4, SLAMF6, CAMTA1, CSPG2 y PRF1, el grupo B consiste en FOSB, NLGN2, PDE5A, PLA2G5, GPC6, y EGR3 y el grupo C consiste en NFIB, NFIC, IGF1R, G0S2, GIRK5 y RBMS1.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. No obstante, estos ejemplos y figuras no han de interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

**EJEMPLOS: ENSAYO NO INVASIVO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DEL EMBRIÓN POR PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DEL CUMULUS HUMANAS**

**EJEMPLO 1**

**Material y métodos:**

**Pacientes y tratamiento de FIV:** En este estudio retrospectivo, se estudiaron pacientes normorrespondedores (n=30) con edades de 30,9 años  $\pm$  2,5 y se dirigieron a nuestro centro para la IEIC (inyección espermática intracitoplasmática) para el factor de infertilidad masculina. Los pacientes se estimularon con una combinación de agonista o antagonista de la HLG con HEF recombinante (GonalF, Puregon; respectivamente de Merck-Serono y Organon) o con GMh (Menopur, Ferring). La respuesta ovárica se evaluó por el nivel de estradiol en suero y mediante ecografía para controlar el desarrollo del folículo. La extracción de los ovocitos se realizó 36 horas después de la administración de GCh (5.000 UI), con guía ecográfica.

**Evaluación de la calidad del embrión:** En el día 2 y 3 posmicroinyección, se evaluaron los parámetros de calidad de los embriones cultivados individualmente utilizando la cantidad de blastómeros y el grado de fragmentación como criterios (grado 1-2: blastómeros de igual tamaño y fragmentación al 0-20 %, grado 3-4: blastómeros de tamaños desiguales y más del 20 % de fragmentación. Un embrión de máxima calidad se definió en el día 3 como blastómeros de igual tamaño de 6-8 células y sin fragmentación. Se transfirieron uno o dos embriones en el día 3 después de la extracción de los ovocitos. Se evaluó el embarazo clínico dos y seis semanas después de la transferencia de embriones en base a la Beta-GCh en suero y a la ecografía, respectivamente (presencia de saco gestacional con latidos).

**Células del cumulus:** Se congelaron todas las muestras de las células del cumulus (CC) en el día de la recogida de los óvulos. Después, se seleccionó al azar una de cada 3 muestras de CC por paciente para el análisis de micromatriz. Se obtuvo un total de 50 muestras de CC de 50 ovocitos individuales y se analizaron por separado: 34 CC de embriones de grado 1-2 (n=20 pacientes), 11 CC de embriones de grado 3-4 (n=10 pacientes) y 5 CC de ovocitos sin fecundar (n=5 pacientes) (Tabla 1).

**Tabla 1:** Las características de las muestras de las células del cumulus en el presente estudio

	30 pacientes			5 pacientes
	45 CC			5 CC
	G1/2 (34 CC)		G3/4 (11 CC)	células del cumulus de ovocitos sin fecundar (5 CC)
	P+	P-	ST	
n.º de chips	18	16	11	5
n.º de pacientes	11	9	10	5
n.º de CC	18	16	11	5

**CC:** células del cumulus, **P+:** células del cumulus de embriones con resultado positivo de embarazo, **P-:** células del cumulus de embriones sin resultado de embarazo, **G1/2:** células del cumulus de embriones de grado 1-2, **G3/4:** células del cumulus de embriones de grado 3-4, **ST:** sin transferir.

El análisis de los datos se realizó en condiciones de doble ciego en las que el resultado de embarazo se desvela solo después de hibridarse las micromatrices. En cuanto a los resultados de embarazo, las 45 CC de los ovocitos fecundados incluyeron 16 CC de embriones de grado 1-2 que no produjeron embarazo (n=9 pacientes), 18 CC se asociaron con un resultado positivo de embarazo (n=11 pacientes) y 11 CC de embriones de grado 3-4 que no se transfirieron. Las células del cumulus se retiraron inmediatamente después de la recuperación de los ovocitos (< 40 h posadministración de GCh). Las células del cumulus se eliminaron por medios mecánicos, se lavaron en medio de cultivo y se congelaron inmediatamente a -80 °C en tampón RLT para extracción de ARN (kit RNeasy, Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) antes de la extracción del ARN.

10 **Células granulosas:** Se seleccionó un grupo independiente de pacientes normorrespondedores (n=8) (edades de 34,8 años  $\pm$  3.2) dirigidos al programa de IEIC del factor de infertilidad masculino para la recogida de células granulosas (8 muestras). Inmediatamente después de la recuperación de los ovocitos, se combinaron los fluidos foliculares de folículos maduros (> 17 mm) del mismo paciente, tras la eliminación del complejo cumulus ovocito y se diluyeron en un 1/3 de volumen de solución de SSEH (BioWhittaker) en lotes de 50 ml, que representan una muestra. La purificación de las células granulosas se adaptó a partir del protocolo de (Kolena *et al.*, 1983). Tras una centrifugación de 20 minutos a 500 g en cubetas oscilantes, se recogieron las células granulosas en un colchón de Ficoll (12 ml de medio de separación de linfocitos, BioWhittaker). Se lavaron sucesivamente en SSEH y STF, se incubaron 5 min en tampón de lisis de sangre (10 mM de KHCO<sub>3</sub>, 150 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 mM de EDTA) para eliminar los glóbulos rojos, se contaron, se sedimentaron en STF antes de la lisis en tampón RLT (Qiagen) y se almacenaron a -80 °C. La cantidad de punción folicular y el número de células granulosas purificadas osciló de 6 a 12 y de 2 10<sup>6</sup> a 9 10<sup>6</sup>, respectivamente.

25 **Preparación de ARN complementario (ARNc) e hibridación de micromatrices:** Se extrajeron las CC y el ARN de las células granulosas utilizando el kit micro RNeasy (Qiagen). La cantidad total de ARN se midió con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc., DE, EE. UU.) y se evaluó la integridad del ARN con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.). El ARNc se preparó con dos rondas de amplificación según el protocolo del fabricante de "doble amplificación" (kit de síntesis de ADNc en dos ciclos, Invitrogen) a partir de ARN total (que oscila de 70 ng a 100 ng). El ARNc obtenido tras la primera amplificación osciló de 0,1 µg/µl a 1,9 µg/µl y tras la segunda amplificación osciló de 1,6 µg/µl a 4,5 µg/µl.

30 El ARNc fragmentado marcado (12 µg) se hibridó con sondas de oligonucleótidos en una matriz Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 que contiene 54.675 conjuntos de sondas de oligonucleótidos ("conjunto de sondas") que corresponden a  $\approx$  30.000 genes humanos únicos o genes predichos. Cada muestra de cumulus y granulosa se puso individualmente en un chip de micromatriz.

35 **Procesamiento de datos:** Se procesaron imágenes de GeneChip escaneadas mediante el software Affymetrix GCOS 1.4 para obtener un valor de la intensidad y un algoritmo de detección (presente, marginal o ausente) para cada conjunto de sondas utilizando las configuraciones de análisis estándar y escalado global como primer método de normalización, con valor medio de la intensidad de diana ajustado (TGT) de cada matriz establecida arbitrariamente a 100. Las intensidades de la sonda se obtuvieron utilizando el algoritmo MAS5.0. Este algoritmo también determina si un gen se expresa con un nivel de exactitud definido o no ("algoritmo de detección"). Este "algoritmo" puede estar "presente" (cuando las sondas de apareamiento perfecto están significativamente más hibridadas que las sondas malapareadas, valor  $p < 0,04$ ), "marginal" (para valores  $p > 0,04$  y  $< 0,06$ ) o "ausente" (valor  $p > 0,06$ ). Los datos de micromatrices se obtuvieron en nuestro laboratorio según las recomendaciones de información mínima acerca de un experimento de micromatrices IMAEM (Brazma *et al.*, 2001).

50 **Análisis de datos y visualización:** Se utilizó análisis significativo de micromatrices (ASM) (Tusher *et al.*, 2001) (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>) para identificar genes cuya expresión variaba significativamente entre los grupos de muestra. ASM proporciona valores de media o mediana del cambio múltiple (CM) y un porcentaje de confianza de la tasa de falso descubrimiento (TFD) en base a la permutación de datos (cambio múltiple promedio > 2 y TFD < 5 %). El análisis de las matrices que permite la comparación del perfil de expresión génica entre muestras de células del cumulus y muestras de células granulosas se basa en primer lugar en la detección de ARN significativa (algoritmo de detección "presente" o "ausente") y, a continuación, se somete a un ASM (análisis significativo de micromatrices) para identificar genes cuya expresión varió significativamente entre grupos de la muestra. Para realizar la comparación del perfil de expresión génica entre muestras de células del cumulus según la calidad embrionaria y/o el resultado de embarazo, se realizó una selección no supervisada de conjuntos de sondas utilizando un coeficiente de variación (CV)  $\geq 40$  % y un filtro del "algoritmo de detección" ausente/presente antes del ASM. Para comparar el perfil de expresión de las células del cumulus del desarrollo embrionario alterado (grado 3-4) y óptimo (grado 1-2), o de embriones que producen, o no, embarazo, se realizó una clasificación no supervisada con análisis por componentes principales (ACP) y agrupamiento jerarquizado (de Hoon *et al.*, 2004; Eisen *et al.*, 1998). El ACP implicó secuencias de comandos originales basados en el software de estadística R a través de la interfaz web RAGE (<http://rage.montp.inserm.fr>) (Reme *et al.*, 2008). El análisis de agrupamiento jerarquizado basado en los niveles de expresión de sondas variables se realizó con los paquetes de software CLUSTER y TREEVIEW. Para descubrir las redes biológicas funcionales y las vías canónicas superiores, se importaron las firmas de expresión génica en el software para el análisis de rutas por Ingenuity (ARI) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EE. UU.).

**Análisis de RT-PCR cuantitativa:** Para el análisis de RT-PCRc, se seleccionaron 10 muestras de CC utilizadas en los experimentos de micromatrices según su resultado de embarazo (5 muestras de CC asociadas a un resultado negativo y 5 a un resultado positivo correspondientes a 10 pacientes). Se empleó ARNc marcado (1 µg) del paciente para generar ADNc de primera cadena. Estos ADNc (5 µl de 1/10 de dilución) se utilizaron para reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real según las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems). Los 20 µl de mezcla de reacción consistieron en ADNc (5 µl), 1 µM de cebadores y 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La amplificación se midió durante 40 ciclos con una temperatura de hibridación a 60 °C. La cantidad de producto de PCR producida en cada etapa de ciclo de la reacción de PCR se controla por la sonda TaqMan. Se establece un umbral en la fase exponencial de la curva de amplificación, de la cual se lee el número de ciclo ("UC" para "umbral de ciclo"). El valor UC se utiliza en el cálculo de los niveles relativos del transcrito de ARNm. Se midió la eficacia (E) de la PCR. Esta eficacia se obtiene mediante una curva convencional correspondiente a los cebadores utilizados. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCRc) se realizó empleando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) y se normalizó a PGK1 para cada muestra utilizando la siguiente fórmula:  $E_{\text{cebador ensayado}}^{\Delta UC} / E_{\text{PGK1}}^{\Delta UC}$  ( $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ ),  $\Delta UC = \text{control UC-UC desconocido, control} = \text{una muestra de CC del grupo sin embarazo}$ ). Cada muestra se analizó por duplicado, y se incluyeron múltiples blancos de agua con el análisis.

## **Resultados**

**Perfil de expresión génica de CC según el resultado de embrión:** Para identificar un perfil de expresión génica en CC que se relacionara con el resultado de embrión, se estableció una firma de expresión génica para cada categoría de resultado: CC de ovocitos sin fecundar, CC de ovocitos que produjeron el desarrollo del embrión aunque fragmentación extensiva (grado 3-4), y CC de ovocitos que produjeron el desarrollo del embrión con ausencia de fragmentación o fragmentación limitada (grado 1-2). Se recogieron muestras de células granulosas como tejido de referencia (control). De hecho, las células granulosas son células estrechamente relacionadas con CC a diferencia de otros tejidos adultos. El uso de este tejido de referencia redujo la cantidad de genes expresados de forma diferencial en relación con las diferencias de linaje crudo, lo que facilita la identificación de sutiles variaciones en la interacción CC/ovocito. Un análisis de ASM mostró que 2.605 genes aumentaron en el grupo sin fecundar, 2.739 en el grupo de grado 3/4 y 2.482 en el grupo de grado 1-2 con TFD < 5 %. En cambio, 4.270, 4.349 y 4.483 genes, disminuyeron, respectivamente. Estos listados de genes se cruzaron después para determinar su solapamiento. Aunque había 449 genes aumentados y 890 genes reducidos en común en los tres grupos, cada categoría mostró un perfil específico de expresión génica. De modo interesante, se modularon específicamente 860 genes aumentados, incluyendo, por ejemplo, galanina y unión intercelular comunicante A5 (GJA5), y 1.416 genes reducidos, incluyendo HLA-G y EGR1 en las células del cumulus asociadas a una buena calidad embrionaria morfológica. Cabe destacar que aunque el grupo de grado 1-2 mostró un potente perfil de expresión génica, este grupo era heterogéneo con respecto al resultado de embarazo e incluía 18 muestras de CC asociadas con embriones que produjeron embarazo (incluyendo 4 embarazos de gemelos) pero también 16 muestras de CC asociadas con embriones que no produjeron embarazo.

**Perfil de expresión génica de CC según el resultado de embarazo:** Por lo tanto, las muestras de CC se compararon según el resultado de embarazo. Un análisis de ASM definió un listado de "resultado de embarazo" de 630 genes que variaron significativamente (TFD < 5 %) entre los dos grupos de pacientes (embarazo contra ausencia de embarazo). El ACP y el agrupamiento jerarquizado confirmaron que este listado de 630 genes segregaba de hecho una mayoría de las muestras de CC asociadas con el embarazo a partir de las asociadas con ausencia de embarazo. Cabría destacar que los genes del listado de "resultado de embarazo" aumentaron predominantemente en muestras asociadas con un buen resultado. La firma de expresión de "resultado de embarazo" se marcó particularmente en un subgrupo de 10 muestras de CC a partir de embriones asociadas al grupo de "embarazo".

**Anotación funcional del listado de genes del resultado de embarazo:** Para investigar los procesos biológicos relacionados con embriones que logran el embarazo, se emplearon las bases de datos Ingenuity y Pubmed para anotar los 630 genes del listado de genes del "resultado de embarazo". Entre los genes cuya sobreexpresión se asocia con el embarazo, las vías más sobrerrepresentadas de forma significativa eran señalización de "estrés oxidativo", "activación de TR/RXR", "transición G2/M del ciclo celular", "metabolismo xenobiótico" y "NFkappaB". Entre estas vías, los genes más representativos son interleucinas, quimioquinas, proteínas adaptadoras y quinasas: IL1Beta: (x4.5 en muestras de embarazo contra ausencia de embarazo, P = 0,001), IL16 (x4.8, P = 0,001), IL8 (x2.6, P = 0,007), IL1RN (x2.1, P = 0,0051), IL17RC (x3.6, P = 0,001), TIRAP (x8.0, P = 0,001), CXCL12 (x3.1, P = 0,001), CCR5 (x2.6, P = 0,0051), y PCK1 (x3.4, P = 0,001). Sorprendentemente, numerosos genes implicados en la regulación de la apoptosis se modularon de manera significativa en las muestras de CC a partir de ovocitos que producen embarazo. Estos genes eran BCL2L11 (x6.9, P <0,001), CRADD (x2, P = 0,0036), NEMO (x4.6, P <0,001), BCL10 (x3.1, P = <0,001), SERPINB8 (x9.1, P <0,001) y TNFSF13 (x2.5, P = 0,0038).

Por otra parte, los genes asociados con ausencia de embarazo se relacionaron con las siguientes vías: daño en ADN G2/M y regulación del ciclo celular, señalización de "Sonic hedgehog", IGF-1", "sistema del complemento" y "Wnt/Beta-catenina". Los genes representativos relacionados con ausencia de embarazo incluyeron NFIB (x0.3, P <0,001), MAD2L1 (x0.4, P <0,001) e IGF1R (x0.4, P <0,001).

**Genes candidatos expresados en CC para el potencial del embrión:** El análisis de ASM de CC según el resultado de embarazo identificó que los 45 genes de la Tabla A son biomarcadores del potencial del embrión que diferenciarían los ovocitos que produjeron embriones resultantes en un embarazo contra los que no produjeron embarazo en base a la expresión génica del análisis de CC. Se utilizó RT-PCR para confirmar de forma independiente los datos de las micromatrices. Se analizó la expresión diferencial de 36 genes aumentados y 9 genes reducidos entre CC de embriones de grado 1-2 que no lograron embarazo y CC de embriones de grado 1-2 que lograron embarazo.

## 10 **Conclusión:**

En la mayoría de las especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, las células del cumulus que rodean los ovocitos aún están presentes en el momento de la fecundación en el oviducto y permanecen hasta la implantación embrionaria. La matriz extracelular que se remodela dentro y alrededor del cumulus desempeña probablemente un papel clave en estas dos etapas. A este respecto, se identificaron 45 genes expresados en las células del cumulus que son biomarcadores para el potencial del embrión y resultado de embarazo. En nuestro estudio, se demostró que el perfil de expresión génica de CC que rodean el ovocito se relacionaba con diferentes resultados, lo que permite la identificación de una firma de expresión específica de embriones que se desarrolla con respecto al embarazo. En conclusión, se halló una expresión génica diferencial entre células del cúmulo humanas de ovocitos que dan lugar a diferentes resultados de embarazo de pacientes referidos para IEIC o FIV. Nuestros resultados indican que el análisis de las células del cumulus que rodean el ovocito es un enfoque no invasivo para la selección de embriones. Generalmente, pueden recogerse CC inmediatamente después de adquirir el ovocito, las CC pueden analizarse con un ensayo genómico (ensayo G) para evaluar el potencial del embrión, y de este modo el embrión puede seleccionarse para un nuevo reemplazo basándose en los resultados del ensayo G.

## 25 **EJEMPLO 2**

Con el fin de ensayar la fiabilidad del listado de los 45 genes, se realizó un estudio prospectivo incluyendo pacientes jóvenes respondedores normales (< 36 años) dirigidos a nuestro centro para la IEIC para la infertilidad masculina. Se produjo la selección de embriones según el perfil de expresión génica en CCs (grupo 1) o según aspectos morfológicos (grupo 2 utilizado como control). Para cada grupo, se sustituyeron dos embriones. Para las primeras 60 pacientes (30 pacientes/grupo), en el día de la recogida de óvulos, en el grupo 1, cada muestra de CC se recogió de forma individual y se procesó para el análisis de la expresión génica. Se analizaron muestras de CC (n=267). Se realizó análisis de RT-PCR cuantitativa para medir la abundancia relativa de los transcritos de genes de interés en CCs, y se obtuvieron los datos de expresión de todos los biomarcadores de todas las muestras. Todas las pacientes en ambos grupos obtuvieron una transferencia de embriones nuevos en el día 3. La comparación entre los 2 grupos revela diferencias significativas para las tasas de implantación y embarazo en desarrollo/recogida (40,0 % contra 26,7 % y 70,0 % contra 46,7; p <0,05, respectivamente). Se apreciaron 5 embarazos de gemelos en el grupo 1 contra 0 en el grupo 2 utilizado como control. Además, se observó que no había relación entre los aspectos morfológicos y el perfil de expresión génica en CC. En base al análisis de 267 muestras de CC, se observó que un 27 % de las CC expresa genes que pronostican los embriones capaces de lograr embarazo, un 42 % de las CC que no, un 31 % de las CC muestran la expresión génica para la detención prematura del desarrollo embrionario. Los biomarcadores candidatos seleccionados se enumeran en la siguiente Tabla B. La Tabla B expone que el conjunto de genes en las células del cumulus era capaz de predecir diferentes condiciones clínicas: (A) embarazo, (B) ausencia de embarazo y (C) detención prematura del embrión.

**Tabla B: conjunto de genes predictivos**

Símbolo del gen	Nombre del gen	n.º de identificación del gen
<b>A: genes cuyas sobreexpresiones permiten predecir embarazo</b>		
PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	5105
ADPRH	ADP-ribosilarginina hidrolasa	141
CABP4	proteína de unión a calcio 4	57010
SLAMF6	miembro 6 de la familia SLAM	114836
CAMTA1	activador de transcripción 1 de unión a calmodulina	23261
CSPG2	proteoglicano condroitín sulfato 2	1462
PRF1	perforina 1 (proteína de formación de poros)	5551

Símbolo del gen	Nombre del gen	n.º de identificación del gen
<b>B: genes cuyas sobreexpresiones permiten predecir embriones incapaces de implantarse</b>		
FOSB	homólogo B del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ	2354
NLGN2	neuroligina 2	57555
PDE5A	fosfodiesterasa 5A específica para GMPc	8654
PLA2G5	fosfolipasa A2 del grupo V	5322
GPC6	glipicano 6	10082
EGR3	gen de respuesta al crecimiento rápido 3	1960
<b>C: genes cuyas sobreexpresiones permiten predecir una detención prematura del embrión</b>		
NFIB	factor nuclear I/B	4781
NFIC	factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT)	4782
IGF1R	receptor 1 del factor de crecimiento semejante a la insulina	3480
G0S2	conmutador G0/G1 2	50486
GRIK5	receptor ionotrópico de glutamato tipo kainato 5	2901
RBMS1	proteína 1 de interacción monocatenaria con motivo de unión a ARN	5937

**Referencias**

5 A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.  
 Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrou, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2006) *The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile*. Hum Reprod, 21, 1705-19.

10 Balaban, B., Urman, B. (2006) *Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation*. Reprod Biomed Online, 12, 608-15.  
 Brison, D.R., Houghton, F.D., Falconer, D., Roberts, S.A., Hawkhead, J., Humpherson, P.G., Lieberman, B.A., Leese, H.J. (2004) *Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover*. Hum Reprod, 19, 2319-24.

15 Bromer, J.G., Seli, E. (2008) *Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics*. Curr Opin Obstet Gynecol, 20, 234-41.  
 Courtois, G., Smahi, A. (2006) *NF-kappaB-related genetic diseases*. Cell Death Differ, 13, 843-51.  
 de Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J., Miyano, S. (2004) *Open source clustering software*. Bioinformatics, 20, 1453-4.

20 Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. (1998) *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 14863-8.  
 Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A.P., Herbert, M. (2002) *Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro*. Hum Reprod, 17, 407-12.

25 Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., Royere, D. (2007) *Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence*. Hum Reprod, 22, 3069-77.  
 Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W.B. (2001) *Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential*. Fertil Steril, 76, 1175-80.

Gasca, S., Pellestor, F., Assou, S., Loup, V., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2007) *Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach*. Reprod Biomed Online, 14, 175-83.

30 Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M.C., Leader, A., Sirard, M.A. (2008) *Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes*. Hum Reprod, 23, 1118-27.  
 Haouzi, D., De Vos, J., Loup, V., Assou, S., Gasca, S., Reyftmann, L., Klein, B., Hamamah, S. (2008) *[Oocyte and embryo quality: Do the apoptotic markers have a place in the preimplantation genetic diagnostic?]*. Gynecol Obstet Fertil, 36, 730-742.

35 He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E.J., Knowles, D.M., Cerutti, A. (2004) *Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL*. J Immunol, 172, 3268-79.  
 Kolena, J., Kiss, A., Channing, C.P. (1983) *Purification of porcine granulosa cells by continuous Percoll gradient*. Experientia, 39, 908-9.

- Kovalevsky, G., Patrizio, P. (2005) *High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States*. Fertil Steril, 84, 325-30.
- La Sala, G.B., Nicoli, A., Villani, M.T., Di Girolamo, R., Capodanno, F., Blickstein, I. (2008) *The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction*. Fertil Steril.
- 5 Lee, K.S., Joo, B.S., Na, Y.J., Yoon, M.S., Choi, O.H., Kim, W.W. (2001) *Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET*. J Assist Reprod Genet, 18, 490-8.
- Lundin, K., Bergh, C., Hardarson, T. (2001) *Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF*. Hum Reprod, 16, 2652-7.
- 10 McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M. (2004) *Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF*. Hum Reprod, 19, 2869-74.
- Pearson, H. (2006) *Safer embryo tests could boost IVF pregnancy rates*. Nature, 444, 12-3.
- Pearlman, S., Bouquin, T., van den Hazel, B., Jensen, T.H., Schambye, H.T., Knudsen, S., Okkels, J.S. (2006)
- 15 *Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes*. Mol Hum Reprod, 12, 135-44.
- Reddy, U.M., Wapner, R.J., Rebar, R.W., Tasca, R.J. (2007) *Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop*. Obstet Gynecol, 109, 967-77.
- 20 Reme, T., Hose, D., De Vos, J., Vassal, A., Poulain, P.O., Pantesco, V., Goldschmidt, H., Klein, B. (2008) *A new method for class prediction based on signed-rank algorithms applied to Affymetrix microarray experiments*. BMC Bioinformatics, 9, 16.
- Sakkas, D., Gardner, D.K. (2005) *Noninvasive methods to assess embryo quality*. Curr Opin Obstet Gynecol, 17, 283-8.
- 25 Sasson, R., Dantes, A., Tajima, K., Amsterdam, A. (2003) *Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action*. FASEB J, 17, 1256-66.
- Sasson, R., Rimon, E., Dantes, A., Cohen, T., Shinder, V., Land-Bracha, A., Amsterdam, A. (2004) *Gonadotrophin induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases*. Mol Hum Reprod, 10, 299-311.
- 30 Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. (2000) *The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation*. Hum Reprod, 15, 2394-403.
- Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, S.C., Rosendahl, S.M., Burns, D.H. (2007) *Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization*. Fertil Steril, 88, 1350-7.
- 35 Steele-Perkins, G., Plachez, C., Butz, K.G., Yang, G., Bachurski, C.J., Kinsman, S.L., Litwack, E.D., Richards, L.J., Gronostajski, R.M. (2005) *The transcription factor gene Nfib is essential for both lung maturation and brain development*. Mol Cell Biol, 25, 685-98.
- Stein, J.V., Lopez-Fraga, M., Elustondo, F.A., Carvalho-Pinto, C.E., Rodriguez, D., Gomez-Caro, R., De Jong, J., Martinez, A.C., Medema, J.P., Hahne, M. (2002) *APRIL modulates B and T cell immunity*. J Clin Invest, 109, 1587-98.
- 40 Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., Eppig, J.J. (2008) *Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells*. Development, 135, 111-21.
- 45 Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J. (2007) *Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells*. Development, 134, 2593-603.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001) *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci USA, 98, 5116-21.
- 50 Van Montfoort, A.P., Dumoulin, J.C., Kester, A.D., Evers, J.L. (2004) *Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers*. Hum Reprod, 19, 2103-8.
- van Montfoort, A.P., Geraedts, J.P., Dumoulin, J.C., Stassen, A.P., Evers, J.L., Ayoubi, T.A. (2008) *Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis*. Mol Hum Reprod, 14, 157-68.
- 55 Yang, W.J., Hwu, Y.M., Lee, R.K., Li, S.H., Lin, S.Y., Fleming, S. (2007) *Early cleavage does not predict treatment outcome following the use of GnRH antagonists in women older than 35*. Fertil Steril, 88, 1573-8.
- Zhang, X., Jafari, N., Barnes, R.B., Confino, E., Milad, M., Kazer, R.R. (2005) *Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality*. Fertil Steril, 83 Suppl. 1, 1169-79.
- 60 Zhu, X.M., Zhu, Y.M., Xu, C.M., Qian, Y.L., Jin, F., Huang, H.F. (2007) *Autologous mature follicular fluid: its role in in vitro maturation of human cumulus-removed oocytes*. Fertil Steril.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para seleccionar un ovocito que, una vez fecundado, produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo:

5 que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito, del nivel de expresión de los genes de los grupos A, B y C, en los que:

10 - el grupo A consiste en fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1), ADP-ribosilarginina hidrolasa (ADPRH), proteína de unión a calcio 4 (CABP4), miembro 6 de la familia SLAM (SLAMF6), activador de transcripción 1 de unión a calmodulina (CAMTA1), proteoglicano condroitín sulfato 2 (CSPG2), y perforina 1 (PRF1),  
 - el grupo B consiste en el homólogo B del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ (FOSB), neuroligina 2 (NLGN2), fosfodiesterasa 5A específica para GMPc (PDE5A), fosfolipasa A2 del grupo V (PLA2G5), glicoproteína 6 (GPC6), y gen de respuesta al crecimiento rápido 3 (EGR 3), y  
 15 - el grupo C consiste en el factor nuclear I/B (NFIB), factor nuclear I/C (NFIC), receptor 1 del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF1R), conmutador G0/G1 2 (G0S2), receptor ionotrópico de glutamato tipo kainato 5 (GRIK5) y proteína 1 de interacción monocatenaria con motivo de unión a ARN, (RBMS1),

20 - que comprende además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que:

25 - la sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo A permite predecir que un ovocito, una vez fecundado, produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo,  
 - la sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo B permite predecir que un ovocito, una vez fecundado, no produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo, siendo el embrión incapaz de implantarse,  
 - la sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo C permite predecir que un ovocito, una  
 30 vez fecundado, no produce un embrión viable con una elevada tasa de implantación que produce embarazo debido a la detención prematura del embrión.

2. Un método para seleccionar un embrión con una elevada tasa de implantación que produce embarazo:

35 - que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho embrión, del nivel de expresión de los genes de los grupos A, B y C, en los que:

40 - el grupo A consiste en PCK1, ADPRH, CABP4, SLAMF6, CAMTA1, CSPG2, y PRF1,  
 - el grupo B consiste en FOSB, NLGN2, PDE5A, PLA2G5, GPC6, y EGR3 y  
 - el grupo C consiste en NFIB, NFIC, IGF1R, G0S2, GRIK5 y RBMS1,

45 - que comprende además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que:

50 - la sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo A permite predecir que el embrión con una elevada tasa de implantación produce embarazo,  
 - la sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo B permite predecir que el embrión no posee una elevada tasa de implantación que produce embarazo, siendo el embrión incapaz de implantarse,  
 - la sobreexpresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo C permite predecir que el embrión no posee una elevada tasa de implantación que produce embarazo debido a la detención prematura del embrión.

55 3. Uso de un kit que comprende medios para medir específicamente el nivel de expresión de los genes de los grupos A, B y C en una célula del cumulus que rodea un ovocito o un embrión para realizar el método según la reivindicación 1 o 2, en la que:

60 - el grupo consiste en PCK1, ADPRH, CABP4, SLAMF6, CAMTA1, CSPG2 y PRF1,  
 - el grupo B consiste en FOSB, NLGN2, PDE5A, PLA2G5, GPC6, y EGR3 y  
 - el grupo C consiste en NFIB, NFIC, IGF1R, G0S2, GRIK5 y RBMS1.