

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 282**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2012 PCT/US2012/061994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13063322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012 E 12844262 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2771490**

54 Título: **Métodos y composiciones para evaluar a pacientes con fallo reproductivo utilizando microARN derivado de célula inmune**

30 Prioridad:

**28.10.2011 US 201113284739**

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

**03.05.2018**

73 Titular/es:

**WINGER, EDWARD E. (50.0%)  
611 Washington Street Ste. 2106  
San Francisco, California 94111, US y  
REED, JANE L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WINGER, EDWARD E. y  
REED, JANE L.**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 666 282 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 y composiciones para evaluar a pacientes con fallo reproductivo utilizando microARN derivado de célula inmune

## CAMPO DE LA PRESENTE INVENCION

- 5 **[0001]** La presente descripción está generalmente relacionada con inmunología y más concretamente con métodos y composiciones para caracterizar individuos o grupos de individuos utilizando patrones de expresión de una o más secuencias de microARN.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** Los médicos hacen frente tanto a decisiones de diagnóstico como terapéuticas. La aplicación de estas decisiones requiere la categorización de pacientes en grupos de diagnóstico y terapéuticos. El médico tiene disponibles muchos medios para tomar estas decisiones. No obstante, no hay ningún conjunto de métodos que garantice el éxito a nivel global. Existe una necesidad continua de nuevos métodos para la segregación de pacientes en categorías terapéuticas y de diagnóstico.

- 15 **[0003]** Se ha descubierto que un tipo de moléculas cortas y reguladoras de ARN conocidas como microARN provocan efectos significativos en la posterior traducción de ARNm a productos génicos. Los polímeros monocatenarios cortos de ácidos ribonucleicos hallados en células eucariotas actúan de forma postranscripcional, uniéndose a secuencias sustancialmente complementarias de transcritos de ARN mensajero. Se producen efectos regulatorios normalmente mediante la represión de la traducción, la degradación del ARNm y el silenciamiento génico (Morozova N., Zinovyev A., Nonne N., Pritchard L.-L., Gorban A. N., y Harel-Bellan A. (septiembre de 2012). "Kinetic signatures of microRNA modes of action". RNA 18 (9): 1635-1655). La complementariedad con el ARNm diana en metazoos es incompleta, pero normalmente abarca una secuencia que comprende las bases 2-7, la "secuencia semilla". El requisito de baja astringencia resultante permite que los miARN se unan a más de un único ARNm. Se pueden encontrar secuencias de pre-miARN en diversos sitios preferidos a lo largo del genoma. Su localización guía, en parte, su transcripción selectiva. Muchas de ellas se encuentran en regiones intergénicas o en antisentidos a un gen regulado vecino ("Kinetic signatures of microRNA modes of action". RNA 18 (9): 1635-1655. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (octubre de 2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II". EMBO J. 23 (20): 4051-60.)

- 25 **[0004]** Los microARN también pueden transcribirse junto con el ARNm diana, permitiendo así que se regule el acoplamiento tanto del microARN como del gen diana que codifica proteínas (Mraz, M.; Dolezalova, D.; Plevova, K.; Stano Kozubik, K.; Mayerova, V.; Cerna, K.; Musilova, K.; Tichy, B. *et al.* (2012). "MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia". Blood 119 (9): 2110-2113). Una fracción grande de los mismos se encuentra en secuencias intrónicas, en transcritos que codifican proteínas y que no codifican proteínas, así como en exones de transcritos que no codifican proteínas (Rodríguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst JL, Bradley A. (octubre de 2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units". Genome Res. 14 (10A): 1902-10). La regulación coordinada también puede ejercerse mediante el uso de secuencias promotoras habituales (Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (octubre de 2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II". EMBO J. 23 (20): 4051-60). (Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005). "Clustering and conservation patterns of human microRNAs". Nucleic Acids Res. 33 (8): 2697-706).

- 30 **[0005]** La expresión de microARN puede representar la regulación genética en el organismo en su conjunto o la regulación genética en un órgano en concreto. Los ensayos a base de plasma o suero han supuesto una interesante área de investigación; por ejemplo, la liberación de microARN al plasma en diversas formas diferentes resistentes a la ARNasa, que permite su interrogación mediante la extracción de sangre periférica (Mitchell *et al.*, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, PNAS (2008) 105 (30): 10513-10518. Vishnu Swarup, M.R. Rajeswari, Circulating (cell-free) nucleic acids - A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases, FEBS Letters 581 (2007) 795-799). La expresión de microARN placentario puede emplearse como ejemplo para ilustrar un área de estudio activo en la regulación genética en un órgano en concreto (Chim SSC, Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma, Clinical Chemistry, (2008) 54(3): 482-490). Los investigadores esperan caracterizar y cuantificar miARNs "asociados a la placenta" con enfermedades relacionadas con el embarazo (Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, *et al.* (2008) Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. PLoS ONE 3(9): e3148. doi:10.1371/journal.pone.0003148. Miura K, Identification of Pregnancy-Associated MicroRNAs in Maternal Plasma, Clinical Chemistry (2010) 56(11): 1767-1771).

- 40 **[0006]** Mientras que el suero y el plasma comprenden miARNs de órganos y tejidos concretos como resultado de su liberación, los miARNs presentes en células que circulan por la sangre constituyen una reserva completamente separada y cuantificable. Este material celular constituye un compartimento del sistema

inmunitario. La interrogación de células sanguíneas para saber sus componentes de miARN proporciona información sobre su función inmune. La separación de los componentes de las células sanguíneas, como linfocitos, monocitos, neutrófilos u otras poblaciones distintas, permite conocer información adicional sobre el comportamiento de estos componentes separados y su biología relacionada. La segregación posterior de los componentes de células sanguíneas, en concreto pero no limitándose a linfocitos, por superficie y por otros marcadores distintivos permite la posterior caracterización.

**[0007]** La utilidad de la interrogación de células sanguíneas para la expresión de microARN está claramente demostrada en la identificación de alternaciones con patrones en las cantidades de microARN asociadas a diversos tipos de inflamación y o bien a los grados de respuesta o a la falta de respuesta al tratamiento. Tang *et al.* interrogó a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para saber si poseían miARN-146a. Descubrieron una subexpresión de este microARN en PBMC de pacientes con lupus eritematoso (LES) (Tang Y *et al.*, MicroRNA-146a Contributes to Abnormal Activation of the Type I Interferon Pathway in Human Lupus by Targeting the Key Signaling Proteins, Arthritis and Rheumatism, (2009) 60(4): 1065-1075). Mir-146a ha demostrado ser un importante regulador de la función inmune innata, y un regulador negativo del interferón de tipo I (IFN I) (Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:12481-6). Por consiguiente, la interrogación de células sanguíneas, en particular de PBMC, proporciona información independiente de la interrogación correspondiente de suero o plasma.

**[0008]** El uso de marcadores sanguíneos, ya sea en plasma/suero o en componentes celulares, está muy arraigado en la práctica clínica. Los médicos clínicos deben dar respuesta a los asuntos de atención médica tanto de base preventiva como patológica mediante una respuesta apropiada y gradual. El médico debe llegar a una cuestión clínica y determinar los medios de diagnóstico y tratamiento más apropiados. Si se considera que es necesario un tratamiento en concreto, hay que predecir la eficacia de la terapia seleccionada y emitir opiniones fundadas en cuanto a la posterior evaluación y al pronóstico final. Hay que admitir que los tratamientos pueden ser costosos e implicar inconvenientes, molestias y riesgos. Además, la falta de tratamiento puede implicar costes, inconvenientes y riesgos. Por lo tanto, una intervención terapéutica debe ser precedida por un adecuado nivel de evaluación. Las intervenciones, que se consideran de por sí un componente de respuesta, pueden permitir además una evaluación de diagnóstico y un pronóstico.

**[0009]** La cuantificación de microARN seleccionados en las células del sistema inmunológico, preferentemente en la sangre periférica, presenta ciertas ventajas con respecto a modalidades de diagnóstico habituales. Mediante la selección de marcadores de microARN caracterizados, se permite la evaluación de mecanismos de patología que no se pueden determinar de forma sencilla y práctica mediante otros medios clínicamente disponibles. Dichas técnicas son actualmente objeto de investigación.

**[0010]** Se observa ahora que los microARN regulan significativamente la traducción de ARNm a su producto proteico final. Una mayor expresión de un microARN unido a un ARNm concreto disminuye su traducción al polinucleótido codificado por el ARNm. En especies de metazoos, la secuencia de aproximadamente 22 bases de un microARN normalmente no es del todo complementaria a la región diana en un ARNm. Además, la complementariedad total se limita a una secuencia corta situada en las bases 2 a 7 de la cadena de microARN. Esta baja fidelidad permite unirse a una pluralidad de ARNms. Así, la expresión de un único microARN puede tener un amplio efecto regulador en un grupo de ARNms. Las ventajas pueden recaer en la acumulación evolutiva de secuencias de ARNm que comprenden dichas secuencias diana. Un ejemplo de esta estrategia afecta a miR-144. NRF2 es un regulador central de la respuesta antioxidante. NRF2 es un factor de transcripción que se une a un elemento de respuesta antioxidante (ARE) expresado en los ARNms de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), enzimas de detoxificación de fase II NAD(P)H: enzimas de síntesis quinona oxidoreductasa (NQO1) y glutatión (GSH), por ejemplo. NRF2 regula la expresión de estos genes que comprenden ARE. miR-144 regula el NRF2 cuando un aumento de la expresión de miR-144 deriva en una disminución de la expresión de NRF2 y de la expresión de genes antioxidantes (Carolyn Sangokoya, Marilyn J. Telen, y Jen-Tsan Chi, microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease, Blood 18 de noviembre de 2010, vol. 116 n.º 20 4338-4348).

**[0011]** Es importante la identificación de pacientes en los que se considere oportuna una inmunoterapia. Además de los trastornos de reproducción, una amplia variedad de enfermedades distintas han mostrado, están en investigación o es posible que se investiguen en el futuro, que se pueden beneficiar de la inmunoterapia. De forma similar, la presente invención se puede aplicar para evaluar la selección de la terapia, dosis y eficacia de la inmunoterapia en estas condiciones. Ejemplos de estas afecciones son enfermedades en las que se cree que un componente inflamatorio participa en la patogénesis. La inmunoterapia, preferentemente IgIV, se ofrece habitualmente para diversas enfermedades. Por ejemplo, entre ellas se incluyen: trasplante alogénico de médula ósea, leucemia linfocítica crónica, inmunodeficiencia común variable (CVID, por sus siglas en inglés), un grupo de aproximadamente 150 inmunodeficiencias primarias (IDP), que tienen un conjunto de características comunes (incluyendo la hipogammaglobulinemia), pero cuyas causas subyacentes son distintas, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), VIH pediátrico, inmunodeficiencias primarias, síndrome de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), trasplante de riñón a un receptor con una gran cantidad de

anticuerpos o con un donante ABO incompatible, enfermedad de Alzheimer, autismo, síndrome de fuga capilar, síndrome de fatiga crónica, colitis por *Clostridium difficile*, dermatomiositis y polimiositis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Guillain-Barré, distrofia muscular, miositis por cuerpos de inclusión, infertilidad, síndrome de Lambert-Eaton, lupus eritematoso, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple, miastenia gravis, trombotocopenia aloinmune neonatal, parvovirus B19, pénfigo, púrpura postransfusional, rechazo de trasplante renal, aborto espontáneo, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, opsoclonus-mioclonus, sepsis grave y choque séptico en adultos en estado crítico[14], necrólisis epidérmica tóxica. En el caso de leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple así como en varias deficiencias raras de síntesis de inmunoglobulina (p. ej., agammaglobulinemia e hipogammaglobulinemia ligadas al cromosoma X), se administra IgIV para mantener unos niveles adecuados de inmunoglobulina con el fin de prevenir infecciones. Se considera que la presente invención es útil en el manejo de estas enfermedades de forma similar a la descrita para trastornos de reproducción.

**[0012]** El ensayo terapéutico de una intervención puede revelar características de la interacción compleja entre enfermedad, huésped e intervención que no son perceptibles mediante pruebas de diagnóstico habituales. Se ha descubierto de forma empírica que la gammaglobulina de donante compartido administrada por vía intravenosa (IgIV) es efectiva en el tratamiento de un amplio abanico de enfermedades inmunológicas. Asimismo, se han propuesto una serie de mecanismos relativamente amplios para su acción, entre los que se incluyen la neutralización de autoanticuerpos mediada por anticuerpos antiidiotipos, el bloqueo del sistema fagocítico mononuclear y la interacción con células dendríticas mediada por el receptor FC sialilado, que se encuentran entre los pocos mecanismos que se proponen explicar los muchos efectos terapéuticos de la administración de IgIV. Es probable que ningún mecanismo explique su eficacia de forma empírica en las muchas condiciones consideradas como receptivas. Es posible que la respuesta no se pueda prever desde que se realiza el cuadro clínico o desde el proceso de caracterización de la enfermedad en el laboratorio. Las características individuales y distintivas del paciente pueden cobrar importancia a la hora de formar la respuesta de un paciente concreto ante una intervención. La identificación de dichas respuestas concretas para la terapia puede mejorar la selección de pacientes y la adaptación de la terapia.

**[0013]** La infertilidad y los problemas para quedarse embarazada suponen un problema exasperante al que se enfrentan las parejas que quieren formar una familia. El aborto espontáneo sucede en un 15 % de los embarazos. El aborto espontáneo recurrente, que se define como la pérdida de al menos tres embarazos consecutivos en las primeras 24 semanas de embarazo, se da en el 3-4 % de mujeres. Además, los abortos espontáneos muy tempranos pueden pasar desapercibidos en parejas que se cree que son infértiles pero en las que no se haya realizado ninguna prueba de diagnóstico que haya confirmado la existencia de un estado de embarazo transitorio. Por otro lado, muchas mujeres sufren complicaciones durante el embarazo, como preeclampsia, retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), parto prematuro, ruptura prematura de membranas (RPM) y muerte fetal. Enfermedades infantiles como asma, autismo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), diabetes, esquizofrenia y síndrome de Tourette se han asociado con trastornos relacionados con el embarazo y con complicaciones tardías en trastornos relacionados con el embarazo, según indican estudios recientes.

**[0014]** Actualmente existe un número significativo de estudios que asocian una gran cantidad de estas afecciones con una deficiencia inmunológica. La intervención inmunológica ha demostrado ser capaz de aumentar el éxito reproductivo en mujeres que presentan enfermedades inmunológicas como bajos niveles de células T reguladoras, altos niveles de células aniquilantes naturales y proporciones elevadas de TNF-alfa/células Il-10 T colaboradoras, según determinan los ensayos *in vitro*. Además, se ha demostrado que llevar a cabo una intervención inmunoterapéutica resulta útil en subgrupos concretos de personas afectadas. Por ejemplo, la inmunoglobulina intravenosa (IgIV) ha resultado útil para reducir cantidades de células aniquilantes naturales en un subconjunto de mujeres en las que las mediciones *in vitro* de función inmune son elevadas. Esta intervención inmunoterapéutica ha demostrado ser capaz de aumentar el éxito reproductivo en estas mujeres (JAMA (1995) 273:1933-36 Hum Reprod (1998) 13(9):2620-3, Am J Reprod Immunol (2002) 38(5):312-18, Ann NY Acad Sci (2005) 1051:743-78). Por otro lado, se ha demostrado que la heparina reduce la tasa de aborto espontáneo en mujeres que presentan una elevada cantidad de anticuerpos antifosfolípidos (Salmon JE, Girardi G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: an inflammatory disorder. Reprod Immunol. 2008 Jay;77(1):51-6. Epub 5 abril 2007 Revisión). Muchas de las afecciones reproductivas que anteriormente se consideraban "sin explicación" pueden tener causas inmunológicas.

**[0015]** De entre las células inmunológicas, incluidos linfocitos y monocitos (e incluidos sus macrófagos y células dendríticas derivadas), varias subpoblaciones linfocitarias, denominadas de forma alternativa subconjuntos, median y regulan la citotoxicidad inmunológica. Estas células pueden incluir células NK, células NKT, células T CD8, células T CD4, células T gamma-delta, células T reguladoras y células Th17. Se ha sugerido que la actividad de estos subconjuntos puede ser particularmente significativa a la hora de definir poblaciones de mujeres que padecen o están en riesgo de padecer trastornos de reproducción y que pueden beneficiarse de la inmunoterapia. Además, los ensayos que calculan las cantidades y actividad de dichas células han resultado ser útiles para monitorizar esta inmunoterapia. En el entorno clínico, las células inmunológicas mencionadas anteriormente se toman del compartimento de sangre periférica y se analizan.

- 5 **[0016]** Por ejemplo, un área de interés clínico han sido los linfocitos T colaboradores (CD3+/CD4+). Estas células pueden clasificarse en subpoblaciones, de acuerdo con sus perfiles de citocinas revelados mediante estimulación *in vitro*, como células T colaboradoras 1 (Th1) o células T colaboradoras 2 (Th2). Las células T colaboradoras secretan de forma selectiva grupos concretos de citocinas. Por ejemplo, las células Th2 producen las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, las cuales, a su vez, están implicadas en el desarrollo de inmunidad humoral contra patógenos extracelulares, aunque inhiben diversas funciones de las células fagocíticas. Las células Th1, de forma alternativa, producen interferón gamma (IFN-gamma), IL-2 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Estas citocinas están involucradas en la inmunidad mediada por células y en la inflamación dependiente de fagocitos (Mosmann & Coffman, 1989; Romagnani, 2000).
- 10 **[0017]** Una intervención oportuna con anticoagulantes previene muchas de estas pérdidas. Otra área de interés clínico ha sido la pérdida del embarazo mediado por el complemento (Cohen D, Buurma A, Goemaere NN, Girardi G, le Cessie S, Scherjon S, Bloemenkamp KW, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM. Classical complement activation as a footprint for murine and human antiphospholipid antibody-induced fetal loss. (J Pathol. (2011): 502-511. Yu G, Sun Y, Foerster K, Manuel J, Molina H, Levy GA, Gorczynski RM, Clark DA. LPS-induced murine abortions require C5 but not C3, and are prevented by upregulating expression of the CD200 tolerance signaling molecule. Am J Reprod Immunol. 2008 Aug;60(2):135-40).
- 15 **[0018]** Raghupathy observó niveles de suero significativamente más altos en citocinas Th2, IL-6 e IL-10, en embarazos normales en comparación con las pérdidas de embarazo recurrentes e inexplicables. Además, había presentes niveles de suero significativamente más altos en la citocina Th1, IFN-gamma, en mujeres con pérdidas de embarazo recurrentes, en comparación con un embarazo normal (Raghupathy *et al.*, 1999). En conjunto, estas observaciones sugieren un sesgo Th2 en mujeres con embarazos normales, mientras que existe un sesgo Th1 en muchas mujeres que presentan un historial de pérdidas de embarazo recurrentes, infertilidad sin explicación y complicaciones en el embarazo, por ejemplo, según se ha definido anteriormente.
- 20 **[0019]** Alan Beer consideró que un reajuste en la proporción Th1/Th2 en mujeres con un sesgo Th1 en favor de un sesgo Th2 podría ayudarlas a conseguir un mayor éxito reproductivo. Propuso que el tratamiento de dichas mujeres con agentes antiTNF-alfa podría derivar en una variación en la proporción Th1/Th2 en favor de un sesgo Th2.
- 25 **[0020]** Con el fin de identificar candidatas para la terapia antiTNF-alfa, Beer propuso que se podría llevar a cabo una evaluación *in vitro* de las proporciones de CD4 que expresan células T diferenciadas para la producción de citocinas ya sean del grupo Th1 o Th2. Si una paciente con trastornos de reproducción, relacionados particularmente con infertilidad inexplicable o abortos espontáneos recurrentes sin explicación, mostrase un aumento de la proporción Th1/Th2 en comparación con las pacientes de control normales, la paciente se consideraría entonces candidata para la terapia antiTNF-alfa. Beer propuso que los pacientes en tratamiento se sometieran a evaluaciones constantes sobre la proporción Th1/Th2 para evaluar la eficacia de la terapia. Una terapia efectiva, según Beer, debería dar como resultado una variación en la proporción Th1/Th2 hacia un sesgo Th2. Winger, Reed *et al.* han demostrado que las mujeres con un aumento de la proporción Th1/Th2 durante el período previo a la concepción muestran, en efecto, un mayor éxito reproductivo al someterse a la terapia antiTNF-alfa con respecto a mujeres similares que no se han sometido a dicha terapia. Además, se ha descubierto que el período de tratamiento era efectivo incluso cuando el período de tratamiento había concluido con anterioridad a la implantación (Referencia 1: Edward E. Winger, Jane L. Reed, Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Intravenous Immunoglobulin Improves Live Birth Rates in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, 60(1), 8 - 16, publicado en línea: 28 junio 2008. Referencia 2: Edward E. Winger, Jane L. Reed, Sherif Ashoush, Sapna Ahuja, Tarek El-Toukhy, Mohamed Taranissi, Treatment with Adalimumab (Humira and Intravenous Immunoglobulin Improves Pregnancy Rates in Women Undergoing IVF, American Journal of Reproductive Immunology 61 (2009) 113-120)).
- 30 **[0021]** El método propuesto por Beer ha recibido importantes críticas. Una de estas críticas la expresa Chauat, quien indica que la implantación del embrión en la pared uterina es un evento inflamatorio (Gérard Chauat, Natalie Ledée-Bataille, Sylvie Dubanchet, Sandrine Zourbas, Olivier Sandra, Jacques Marta, Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost?, Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm, Int Arch Allergy Immunol 2004;134:93-119). El predominio de citocinas Th1 en el momento y lugar de la implantación es fundamental para el proceso, identificando de este modo una deficiencia en la hipótesis Th1/Th2. Además, la terapia antiTNF-alfa, como se sugiere en la solicitud de patente de Kwak Kim *et al.* (USPTO # 20040105858), podría resultar en una reducción de la eficacia reproductiva. Por otra parte, la determinación de la proporción Th1/Th2 en el lugar de implantación es posible que no se haya realizado de forma efectiva a partir del análisis de linfocitos aislados de la sangre periférica. Moffett *et al.* realizó otras críticas dirigidas a los intentos de examinar células de sangre periférica, al cuestionar que los glóbulos blancos de sangre periférica se puedan analizar como no representativas de eventos celulares en la placenta (Ashley Moffett, Lesley Regan, Peter Braude, Natural killer cells, miscarriage, and infertility, BMJ 2004;329:1283-5.) Estos autores concluyen que 1) "Las células NK uterinas son diferentes de las que circulan en la sangre periférica", 2) "Las pruebas para medir la cantidad de células NK en la sangre periférica no proporcionan información útil sobre las células NK uterinas", y
- 35 **[0020]** Con el fin de identificar candidatas para la terapia antiTNF-alfa, Beer propuso que se podría llevar a cabo una evaluación *in vitro* de las proporciones de CD4 que expresan células T diferenciadas para la producción de citocinas ya sean del grupo Th1 o Th2. Si una paciente con trastornos de reproducción, relacionados particularmente con infertilidad inexplicable o abortos espontáneos recurrentes sin explicación, mostrase un aumento de la proporción Th1/Th2 en comparación con las pacientes de control normales, la paciente se consideraría entonces candidata para la terapia antiTNF-alfa. Beer propuso que los pacientes en tratamiento se sometieran a evaluaciones constantes sobre la proporción Th1/Th2 para evaluar la eficacia de la terapia. Una terapia efectiva, según Beer, debería dar como resultado una variación en la proporción Th1/Th2 hacia un sesgo Th2. Winger, Reed *et al.* han demostrado que las mujeres con un aumento de la proporción Th1/Th2 durante el período previo a la concepción muestran, en efecto, un mayor éxito reproductivo al someterse a la terapia antiTNF-alfa con respecto a mujeres similares que no se han sometido a dicha terapia. Además, se ha descubierto que el período de tratamiento era efectivo incluso cuando el período de tratamiento había concluido con anterioridad a la implantación (Referencia 1: Edward E. Winger, Jane L. Reed, Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Intravenous Immunoglobulin Improves Live Birth Rates in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, 60(1), 8 - 16, publicado en línea: 28 junio 2008. Referencia 2: Edward E. Winger, Jane L. Reed, Sherif Ashoush, Sapna Ahuja, Tarek El-Toukhy, Mohamed Taranissi, Treatment with Adalimumab (Humira and Intravenous Immunoglobulin Improves Pregnancy Rates in Women Undergoing IVF, American Journal of Reproductive Immunology 61 (2009) 113-120)).
- 40 **[0021]** El método propuesto por Beer ha recibido importantes críticas. Una de estas críticas la expresa Chauat, quien indica que la implantación del embrión en la pared uterina es un evento inflamatorio (Gérard Chauat, Natalie Ledée-Bataille, Sylvie Dubanchet, Sandrine Zourbas, Olivier Sandra, Jacques Marta, Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost?, Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm, Int Arch Allergy Immunol 2004;134:93-119). El predominio de citocinas Th1 en el momento y lugar de la implantación es fundamental para el proceso, identificando de este modo una deficiencia en la hipótesis Th1/Th2. Además, la terapia antiTNF-alfa, como se sugiere en la solicitud de patente de Kwak Kim *et al.* (USPTO # 20040105858), podría resultar en una reducción de la eficacia reproductiva. Por otra parte, la determinación de la proporción Th1/Th2 en el lugar de implantación es posible que no se haya realizado de forma efectiva a partir del análisis de linfocitos aislados de la sangre periférica. Moffett *et al.* realizó otras críticas dirigidas a los intentos de examinar células de sangre periférica, al cuestionar que los glóbulos blancos de sangre periférica se puedan analizar como no representativas de eventos celulares en la placenta (Ashley Moffett, Lesley Regan, Peter Braude, Natural killer cells, miscarriage, and infertility, BMJ 2004;329:1283-5.) Estos autores concluyen que 1) "Las células NK uterinas son diferentes de las que circulan en la sangre periférica", 2) "Las pruebas para medir la cantidad de células NK en la sangre periférica no proporcionan información útil sobre las células NK uterinas", y
- 45 **[0020]** Con el fin de identificar candidatas para la terapia antiTNF-alfa, Beer propuso que se podría llevar a cabo una evaluación *in vitro* de las proporciones de CD4 que expresan células T diferenciadas para la producción de citocinas ya sean del grupo Th1 o Th2. Si una paciente con trastornos de reproducción, relacionados particularmente con infertilidad inexplicable o abortos espontáneos recurrentes sin explicación, mostrase un aumento de la proporción Th1/Th2 en comparación con las pacientes de control normales, la paciente se consideraría entonces candidata para la terapia antiTNF-alfa. Beer propuso que los pacientes en tratamiento se sometieran a evaluaciones constantes sobre la proporción Th1/Th2 para evaluar la eficacia de la terapia. Una terapia efectiva, según Beer, debería dar como resultado una variación en la proporción Th1/Th2 hacia un sesgo Th2. Winger, Reed *et al.* han demostrado que las mujeres con un aumento de la proporción Th1/Th2 durante el período previo a la concepción muestran, en efecto, un mayor éxito reproductivo al someterse a la terapia antiTNF-alfa con respecto a mujeres similares que no se han sometido a dicha terapia. Además, se ha descubierto que el período de tratamiento era efectivo incluso cuando el período de tratamiento había concluido con anterioridad a la implantación (Referencia 1: Edward E. Winger, Jane L. Reed, Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Intravenous Immunoglobulin Improves Live Birth Rates in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, 60(1), 8 - 16, publicado en línea: 28 junio 2008. Referencia 2: Edward E. Winger, Jane L. Reed, Sherif Ashoush, Sapna Ahuja, Tarek El-Toukhy, Mohamed Taranissi, Treatment with Adalimumab (Humira and Intravenous Immunoglobulin Improves Pregnancy Rates in Women Undergoing IVF, American Journal of Reproductive Immunology 61 (2009) 113-120)).
- 50 **[0021]** El método propuesto por Beer ha recibido importantes críticas. Una de estas críticas la expresa Chauat, quien indica que la implantación del embrión en la pared uterina es un evento inflamatorio (Gérard Chauat, Natalie Ledée-Bataille, Sylvie Dubanchet, Sandrine Zourbas, Olivier Sandra, Jacques Marta, Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost?, Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm, Int Arch Allergy Immunol 2004;134:93-119). El predominio de citocinas Th1 en el momento y lugar de la implantación es fundamental para el proceso, identificando de este modo una deficiencia en la hipótesis Th1/Th2. Además, la terapia antiTNF-alfa, como se sugiere en la solicitud de patente de Kwak Kim *et al.* (USPTO # 20040105858), podría resultar en una reducción de la eficacia reproductiva. Por otra parte, la determinación de la proporción Th1/Th2 en el lugar de implantación es posible que no se haya realizado de forma efectiva a partir del análisis de linfocitos aislados de la sangre periférica. Moffett *et al.* realizó otras críticas dirigidas a los intentos de examinar células de sangre periférica, al cuestionar que los glóbulos blancos de sangre periférica se puedan analizar como no representativas de eventos celulares en la placenta (Ashley Moffett, Lesley Regan, Peter Braude, Natural killer cells, miscarriage, and infertility, BMJ 2004;329:1283-5.) Estos autores concluyen que 1) "Las células NK uterinas son diferentes de las que circulan en la sangre periférica", 2) "Las pruebas para medir la cantidad de células NK en la sangre periférica no proporcionan información útil sobre las células NK uterinas", y
- 55 **[0021]** El método propuesto por Beer ha recibido importantes críticas. Una de estas críticas la expresa Chauat, quien indica que la implantación del embrión en la pared uterina es un evento inflamatorio (Gérard Chauat, Natalie Ledée-Bataille, Sylvie Dubanchet, Sandrine Zourbas, Olivier Sandra, Jacques Marta, Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost?, Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm, Int Arch Allergy Immunol 2004;134:93-119). El predominio de citocinas Th1 en el momento y lugar de la implantación es fundamental para el proceso, identificando de este modo una deficiencia en la hipótesis Th1/Th2. Además, la terapia antiTNF-alfa, como se sugiere en la solicitud de patente de Kwak Kim *et al.* (USPTO # 20040105858), podría resultar en una reducción de la eficacia reproductiva. Por otra parte, la determinación de la proporción Th1/Th2 en el lugar de implantación es posible que no se haya realizado de forma efectiva a partir del análisis de linfocitos aislados de la sangre periférica. Moffett *et al.* realizó otras críticas dirigidas a los intentos de examinar células de sangre periférica, al cuestionar que los glóbulos blancos de sangre periférica se puedan analizar como no representativas de eventos celulares en la placenta (Ashley Moffett, Lesley Regan, Peter Braude, Natural killer cells, miscarriage, and infertility, BMJ 2004;329:1283-5.) Estos autores concluyen que 1) "Las células NK uterinas son diferentes de las que circulan en la sangre periférica", 2) "Las pruebas para medir la cantidad de células NK en la sangre periférica no proporcionan información útil sobre las células NK uterinas", y
- 60 **[0021]** El método propuesto por Beer ha recibido importantes críticas. Una de estas críticas la expresa Chauat, quien indica que la implantación del embrión en la pared uterina es un evento inflamatorio (Gérard Chauat, Natalie Ledée-Bataille, Sylvie Dubanchet, Sandrine Zourbas, Olivier Sandra, Jacques Marta, Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost?, Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm, Int Arch Allergy Immunol 2004;134:93-119). El predominio de citocinas Th1 en el momento y lugar de la implantación es fundamental para el proceso, identificando de este modo una deficiencia en la hipótesis Th1/Th2. Además, la terapia antiTNF-alfa, como se sugiere en la solicitud de patente de Kwak Kim *et al.* (USPTO # 20040105858), podría resultar en una reducción de la eficacia reproductiva. Por otra parte, la determinación de la proporción Th1/Th2 en el lugar de implantación es posible que no se haya realizado de forma efectiva a partir del análisis de linfocitos aislados de la sangre periférica. Moffett *et al.* realizó otras críticas dirigidas a los intentos de examinar células de sangre periférica, al cuestionar que los glóbulos blancos de sangre periférica se puedan analizar como no representativas de eventos celulares en la placenta (Ashley Moffett, Lesley Regan, Peter Braude, Natural killer cells, miscarriage, and infertility, BMJ 2004;329:1283-5.) Estos autores concluyen que 1) "Las células NK uterinas son diferentes de las que circulan en la sangre periférica", 2) "Las pruebas para medir la cantidad de células NK en la sangre periférica no proporcionan información útil sobre las células NK uterinas", y

3) “Desafortunadamente, el entusiasmo mostrado con respecto a nuevos tratamientos centrados en las células aniquilantes naturales en mujeres con trastornos de reproducción no está respaldado por la ciencia”.

5 **[0022]** La terapia anticoagulante para abortos espontáneos recurrentes relacionados con anticuerpos antifosfolípidos también ha recibido críticas. Las pruebas de anticuerpos antifosfolípidos han sido tachadas de poco fiables y escasamente estandarizadas (Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC, Pierangeli SS. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti- $\beta(2)$ glycoprotein testing: A report from the APL task force at the 13(th) international congress on antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 27 de septiembre de 2011. doi:10.1002/art.33349. Revisión). Asimismo, se ha sugerido que los abortos espontáneos asociados al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos están provocados en realidad por un aumento de la actividad del complemento en lugar de por un aumento de la actividad trombótica (Salmon JE, Girardi G. Theodore E. Woodward Award: antiphospholipid syndrome revisited: a disorder initiated by inflammation. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007;118:99-114). (Lynch AM, Salmon JE. Dysregulated complement activation as a common pathway of injury in preeclampsia and other pregnancy complications. *Placenta.* 2010Jul;31(7):561-7. Epub 27 de abril de 2010. Revisión). Los marcadores microARN pueden identificar mejor los marcadores inflamatorios subyacentes que responden bien al tratamiento anticoagulante.

20 **[0023]** Asimismo, los mecanismos de tolerancia materno-fetal semialógrafos han recurrido a la interacción de otro grupo de células T CD4 conocidas como células T reguladoras. Jaspert *et al.* (*Molecular Human Reproduction* Vol.12, n.º5, pp. 301-308, 2006) cuantificaron el FoxP3 de ARNm, un regulador maestro de la diferenciación de células T reguladoras, en tejidos endometriales semisecretores en mujeres con infertilidad inexplicable y en niveles de mujeres no afectadas. Hallaron niveles reducidos de ARNm FoxP3 en mujeres no afectadas al compararlas con el grupo de control. Winger y Reed han encontrado niveles reducidos de CD4+CD25+Foxp3+células T reguladoras en los linfocitos de sangre periférica de mujeres que han experimentado abortos recurrentes (Edward E. Winger, Jane L. Reed, Low Circulating CD4+ CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cell Levels Predict Miscarriage Risk in Newly Pregnant Women with a History of Failure, *Am J Reprod Immunol.* 2011 Oct; 66(4): 320-8).

30 **[0024]** Actualmente, se cree que las células Th17 desempeñan una función en la inmunología del embarazo (Shigeru Saito, Akitoshi Nakashima, Tomoko Shima, Mika Ito, Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy, *American Journal of Reproductive Immunology* 63 (2010) 601-610). Junto con las células T reguladoras, con las que parecen actuar de manera conjunta, afectan al equilibrio de la misma forma que se ha propuesto que las células Th1 y Th2 afectan al éxito del embarazo.

35 **[0025]** Recientemente, se han descrito una variedad de problemas que afectan a los bebés nacidos donde la madre ha mostrado anomalías inmunológicas durante o aproximadamente durante el período del embarazo. Por ejemplo, se han relacionado anomalías inmunológicas durante el transcurso del embarazo con una causa de autismo. Se considera que el autismo es un espectro de trastornos cuya etiología todavía se desconoce. No obstante, se ha relacionado con factores de carácter inmunológico durante las primeras etapas del embarazo. Se han identificado perfiles de citocina Th1/Th2 desequilibrados, niveles alterados de linfocitos y respuestas reducidas a mitógenos de células T en niños afectados por la enfermedad. Los autores sugieren que las anomalías inmunológicas durante las primeras etapas del embarazo pueden estar implicadas (Paul Ashwood, Sharifia Wills, y Judy Van de Water, The immune response in autism: a new frontier for autism research, *Journal of Leukocyte Biology.* 2006; 80: 1-15).

45 **[0026]** La controversia en cuanto a la hipótesis Th1/Th2 también está relacionada con el momento del análisis y de la terapia. Chaouat, como se ha indicado anteriormente, afirma que la hipótesis es errónea y que el sesgo de Th puede no mantenerse constante durante el período de implantación. Winger, Reed *et al.* muestran que las pacientes con un aumento en su proporción de células Th1/Th2 evaluadas durante el período previo a la concepción disfrutaron de unos resultados de embarazo significativamente superiores al ser tratadas con terapia antiTNF-alfa (Winger EE, Reed JL, Ashoush S, El-Toukhy T, Ahuja S, Taranissi M. Degree of TNF- $\alpha$ /IL-10 cytokine elevation correlates with IVF success rates in women undergoing treatment with Adalimumab (Humira) and IVIG. *Am J Reprod Immunol.* Junio de 2011; 65(6): 610-8). Winger y Reed también han demostrado que las células T reguladoras evaluadas durante el período de implantación también predicen el resultado del embarazo (Winger EE, Reed JL. Low Circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T Regulatory Cell Levels Predict Miscarriage Risk in Newly Pregnant Women with a History of Failure. *Am J Reprod Immunol.* Octubre de 2011; 66(4): 320-8). Al parecer, el momento y la naturaleza de los parámetros de laboratorio utilizados son bastante significativos.

55 **[0027]** Asimismo, Winger y Reed han identificado un subconjunto de pacientes en las cuales el comportamiento de la proporción no fue el que se esperaba. En ocasiones, las proporciones de Th1/Th2 aumentan como consecuencia de la terapia, mientras que la eficacia de la terapia permanece intacta (Winger EE, Reed JL, Ashoush S, El-Toukhy T, Ahuja S, Taranissi M. Degree of TNF- $\alpha$ /IL-10 cytokine elevation correlates with IVF success rates in women undergoing treatment with Adalimumab (Humira) and IVIG. *Am J Reprod Immunol.* Junio de 2011;65(6):610-8).

- 5 **[0028]** Además, la técnica de determinación de la proporción Th1/Th2 requiere el aislamiento de células mononucleares viables de sangre periférica (PBMC), estimulándolas *in vitro* tras haber bloqueado la secreción de citocina, una etapa que es un tanto tóxica para las células. El éxito en la inducción de la expresión de citocina intracelular puede, por lo tanto, estar comprometida y los resultados de las pruebas pueden ser teóricamente menos precisos. Además, mientras que la cuantificación de células Th1 parece ser relativamente robusto, la cuantificación de Th2 se ve obstaculizado por su baja prevalencia entre células T CD4 positivas. El acceso de las células según se realiza actualmente puede ser algo subjetivo, lo que deriva en resultados imprecisos. Por consiguiente, los resultados del ensayo pueden variar debido a variaciones menores en el acceso. Por ésta y otras razones, es necesaria una técnica mejorada para evaluar las cantidades de Th1 y Th2.
- 10 **[0029]** Además, el poder de predicción de los distintos ensayos que actualmente se emplean para evaluar los factores de riesgo en el embarazo no es lo suficientemente sensible como para detectar a todas las personas afectadas. Existe una profunda necesidad por unos parámetros adicionales de pruebas de células inmunes. Por ejemplo, actualmente se realizan dos pruebas de células aniquilantes naturales. La primera de ellas es un ensayo fenotípico que cuantifica las células NK. Los linfocitos que expresan CD56 pero no expresan CD3 se denominan células NK y se pueden enumerar mediante citometría de flujo. Una segunda prueba analiza la función de la célula NK por la que se incuban células mononucleares con células etiquetadas conocidas por sufrir daños a causa de las células NK, o se coincuban "células diana" y posteriormente se detectan y cuantifican mediante citometría de flujo. Ambas pruebas pueden utilizarse para evaluar el riesgo de la paciente de sufrir trastornos de reproducción con cierto grado de éxito. No obstante, algunas pacientes con resultados normales de células aniquilantes naturales siguen sufriendo problemas de embarazo de carácter inmunológico.
- 15 **[0030]** Según se indica, las células T reguladoras (Treg) son un nuevo e importante tipo de célula que puede ser de ayuda en el diagnóstico y evaluación en muchos de estos casos. Un número reducido de estas células en sangre periférica se ha asociado con la pérdida del embarazo, sobre todo en el período inmediatamente posterior a la concepción. Jaspert *et al.* cuantificaron FoxP3 ARNm, un regulador maestro de la diferenciación de células T reguladoras, en tejidos endometriales semisecretores de mujeres con infertilidad sin explicación y de los niveles de mujeres no afectadas (Molecular Human Reproduction Vol.12, n.º5, pp.301-308, 2006). Observaron niveles reducidos de FoxP3 ARNm en mujeres afectadas en comparación con el grupo de control. Winger y Reed han hallado niveles reducidos de células T reguladores en los linfocitos de sangre periférica definidos por su expresión simultánea de CD4, CD25 y FoxP3 en mujeres embarazadas que sufren pérdida precoz del embarazo (Winger EE, Reed JL. Low Circulating CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) T Regulatory Cell Levels Predict Miscarriage Risk in Newly Pregnant Women with a History of Failure. Am J Reprod Immunol. Octubre de 2011; 66(4): 320-8).
- 20 **[0031]** Actualmente se emplean diversos marcadores para la cuantificación de células T reguladoras; sin embargo, no hay disponible ningún ensayo comparable que permita la fácil evaluación funcional de la actividad T reguladora. Es sumamente necesario un ensayo de este tipo.
- 25 **[0032]** Además de la falta de sensibilidad mostrada por los ensayos de inmunología reproductiva actuales, estos pueden ser vulnerables a las condiciones de transporte de la recogida de muestras. El ensayo de citotoxicidad de NK es particularmente vulnerable. En el ensayo, se comprueba la actividad de células efectoras. Se puede esperar que cualquier tipo de estrés al que se sometan las células efectoras reduzca la actividad citotóxica calculada. Al no poder resistir estos efectos, las células diana se someten a una variación significativa en cuanto a su vulnerabilidad al efecto citotóxico. Así, el sistema de ensayo está sujeto a una considerable variabilidad. También es sumamente necesario un sistema de ensayo que no esté sujeto a la variabilidad de un ensayo funcional.
- 30 **[0033]** Además, los ensayos funcionales actuales están limitados por su incapacidad para detectar intermediarios celulares funcionales. Las células T reguladoras ejercen su actividad reguladora a través de varios intermediarios. Los ensayos actuales que enumeran las cantidades de células T reguladoras no identifican ni cuantifican ningún intermediario. Un sistema de ensayo que permita el reconocimiento y la cuantificación de intermediarios conocidos supondría una mejora significativa.
- 35 **[0034]** Más recientemente, las células T que expresan CD4 se han dividido en subgrupos adicionales en base a su perfil secretor de citocina. Además de las células de tipo Th1 y Th2, se han definido células T reguladoras, células Th3 y células Th17. Se han descrito también células Th9 y células T colaboradoras foliculares (T<sub>FH</sub>). Jaspert *et al.* han evaluado la cantidad relativa de ARNm de FoxP3 en el endometrio de fase lútea y han mostrado distintos patrones que distinguen a las pacientes con un historial de pérdida recurrente del embarazo de las pacientes normales. Una cuantificación similar de ARNm para reguladores de la transcripción y una comparación de los mismos con el grupo de control puede proporcionar información que apoye la categorización de pacientes como candidatas para someterse a terapias de base inmunológica y a la posterior monitorización del tratamiento intervencionista.
- 40 **[0035]** Aparte de las deficiencias mencionadas anteriormente en cuanto a las pruebas inmunológicas de función y fenotipo, se sabe que la especificidad y la sensibilidad se ven limitadas. Un sistema de ensayo que permita la evaluación de varios parámetros diferentes que proporcionen en conjunto un perfil o distinción del estado de
- 45
- 50
- 55

PBMC de una paciente podría superar las deficiencias observadas en pruebas individuales. Las presentes técnicas de prueba evalúan características individuales del sistema inmunológico de la paciente. Un enfoque combinado donde se evalúan conjuntamente una cantidad de parámetros distintos podría mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad, así como la discriminación de diferentes formas de disfunción inmunitaria que afectan de manera individual y similar a un único parámetro inmunológico. Un enfoque más amplio que la evaluación del estado inmunológico de PBMC podría proporcionar mejor información en relación al diagnóstico y al estado de los problemas de embarazo. Lo ideal sería que dicho enfoque discriminara entre distintos mecanismos, lo cual resultaría en una anomalía compartida en un parámetro inmunológico o de otro tipo.

**[0036]** La medicina personalizada, tal como se entiende, utiliza pruebas, en concreto pruebas a nivel de ADN y ARN, para determinar la intervención terapéutica más apropiada para una persona en lugar de aplicar una única intervención terapéutica a todos los pacientes que presentan un problema en particular. Lo ideal sería que una estrategia de diagnóstico dividiera a los pacientes en categorías donde se identificara a los pacientes que previsiblemente responderían a una intervención terapéutica. Idealmente, la estrategia de evaluación identificaría a los pacientes en los que sería improbable que una estrategia terapéutica fuera beneficiosa, ahorrándose así la aplicación de un tratamiento costoso o de una terapia con riesgos potenciales para los pacientes que previsiblemente no disfrutarían de una respuesta terapéutica positiva. Debido a las deficiencias anteriormente citadas, resultaría útil identificar marcadores de sustitución más estables y sólidos para las pruebas inmunológicas que actualmente se llevan a cabo en la práctica clínica, así como para identificar marcadores de sustitución de los marcadores de inflamación y coagulación.

**[0037]** Por otra parte, se necesitan nuevas pruebas que puedan identificar a los pacientes que no se beneficiarían del tratamiento a pesar de un diagnóstico positivo de la enfermedad mediante el empleo de pruebas tradicionales.

**[0038]** Además, se necesitan nuevas pruebas que puedan predecir qué pacientes experimentarán efectos secundarios negativos derivados de la inmunoterapia.

**[0039]** Los microARN son secuencias de ARN cortas y endógenas que no codifican proteínas con aproximadamente 22 bases nucleotídicas que predominantemente regulan de forma negativa la expresión genética. Se han identificado cientos de secuencias de este tipo en humanos (Lee *et al.*, PLoS Comput Biol 3:e67 (2007); O'Driscoll, Anticancer Res 26:4271 (2006); Kusenda *et al.*, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150:205 (2006)). El transcrito primario o "pre-microARN" comprende uno o más precursores de microARN, cada uno de ellos comprendido en una estructura en horquilla. Estas secuencias se encuentran más habitualmente en los intrones de sus genes huésped (Lee *et al.*, PLoS Comput Biol 3:e67 (2007)). También pueden encontrarse en exones y en límites exón-intrón (Kusenda *et al.*, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150:205 (2006)). Se sabe que estas secuencias se unen a al menos el 30 % de todos los genes humanos, reajustando su expresión. La secuencia corta final se genera a través de una serie de segmentaciones que implican a dos enzimas, Drosha y Dicer, de secuencias de ARN primario relativamente largas. La forma segregada final se incorpora a un complejo conocido como complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que comprende proteínas catalíticas como las argonautas, en concreto Ago-2. Jeker y Bluestone (Journal of Clinical Immunology (2010), 30:347-357) formularon la hipótesis de que los microARN actúan para estabilizar el fenotipo celular, perfeccionar la expresión genética o ayudar en el establecimiento de umbrales entre otras funciones reguladoras. Parece ser que los microARN son importantes reguladores del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celular (Lee *et al.*, PLoS Comput Biol 3:e67 (2007)). Los microARN se han estudiado en profundidad en la patogénesis del cáncer debido a su conocido impacto en la diferenciación, el crecimiento y la apoptosis celular, cada uno de los cuales, individualmente, suponen eventos celulares importantes en el desarrollo de cáncer (Esau y Monia, Adv Drug Deliv. Rev. 59: 101-114 (2007); Hammond, Nat Genet 39:582 (2007)). Los perfiles de microARN en células cancerosas han supuesto un campo de estudio intenso. Los datos obtenidos proporcionan información sobre el estado funcional de células particulares.

**[0040]** Los investigadores han descubierto que la expresión global de microARN parece ser más útil que la expresión de ARNm en la clasificación de los tipos de cáncer (Eis *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 102: 3627 (2005)). Más recientemente, varios estudios han demostrado la importancia del microARN en la homeostasis y el funcionamiento en el sistema inmunológico de linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y el corazón (That *et al.*, Science 316:604 (2007); Rodriguez *et al.*, Science 316:608 (2007); O'Connell *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 104:1604 (2007); Care *et al.*, Nat Med 13:613 (2007); Taganov *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 104:1604 (2007)).

**[0041]** El microARN 155 (mir-155) es un ejemplo de los efectos de microARN en el funcionamiento del sistema inmune así como de la diferenciación de las células inmunológicas. Los microARN dados a conocer en el presente documento son todos de origen humano, mir-155 actúa como estabilizador de la expresión de FoxP3 en células T reguladoras (Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein Immunity, Vol. 30, n.º 1, pp. 80-91 L. Lu, T. Thai, D. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky). Las células T reguladoras cobran una gran importancia en

la prevención de la autoinmunidad y en la creación de tolerancia hacia el tejido extraño. Asimismo, That *et al.* han observado que mir-155 desempeña un papel en la regulación tanto de la diferenciación de las células T colaboradoras como de la reacción del centro germinal que regula la respuesta a anticuerpos dependientes de células T (That *et al.*, Science 316:604 (2007); Rodríguez *et al.*, Science 316:608 (2007)). Un posterior análisis del transcriptoma de células T CD4+ carentes de microARN-155 muestra un gran espectro de genes regulados por mir-155, incluyendo citocinas, quimiocinas y factores de transcripción (That *et al.*, Science 316:604 (2007); Rodríguez *et al.*, Science 316:608 (2007)).

**[0042]** El mir-155 es un ejemplo de pleiotropía de microARN. Hasta la fecha, hay evidencia de que mir-155 está implicado en numerosos procesos biológicos, entre los que se incluyen la hematopoyesis, la inflamación y la inmunidad. También participa en la regulación del receptor de angiotensina II. La desregulación de mir-155 se ha asociado con ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares e infecciones víricas. Mir-155 también puede estar implicado en el desarrollo de células T reguladoras así como en la mediación de los efectos de FoxP3 (Susan Kohlhaas, Oliver A. Garden, Cheryl Scudamore, Martin Turner, Klaus Okkenhaug, Elena Vigorito, Cutting Edge: The Foxp3 Target mir-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells, The Journal of Immunology (2009) 182:2578-2582). Sorprendentemente, estos investigadores observaron que mientras que el desarrollo de Treg no podía prescindir de bic/mir-155, el pre-microARN, sí era prescindible para la proliferación de Treg y su supervivencia en la periferia. A pesar de los bajos niveles de Tregs, su función supresora *in vitro* permaneció intacta. Estos comportamientos inesperados son característicos de microARN, que pueden actuar en diferentes puntos temporales en el desarrollo de células y en su posterior activación funcional. Aunque pueden actuar de forma individual, también pueden actuar conjuntamente con una pluralidad de microARN en un único ARNm diana. Para añadir más complejidades al comportamiento del microARN, algunos microARN individuales también pueden actuar en varios ARNms diana distintos. En conjunto, estas complejidades suponen una predicción de su comportamiento en distintas circunstancias frágiles. Hasta el momento, el papel de microARN individuales y múltiples en enfermedades concretas sólo ha sido definido mediante métodos empíricos.

**[0043]** Otros microARN están asociados de manera significativa a respuestas inmunológicas. Por ejemplo, TNF-alfa e IL-1-beta están regulados por otro microARN más, mir-146a (K.D. Taganov, M.P. Boldin, K.J. Chang y D. Baltimore, NF-B-dependent induction of the microRNA mir-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006), pp. 12481-12486; M.M. Perry, S.A. Moschos, A.E. Williams, N.J. Shepherd, H.M. Larner-Svensson y M.A. Lindsay, Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells, J Immunol 180 (2008), pp. 5689-5698). La cuantificación de estos microARN proporciona información sobre la situación regulatoria. Además, estudios en pacientes que padecen artritis reumatoide muestran interesantes perfiles de microARN en sus PBMC (Kaleb M Pauley, Minoru Satoh, Annie L Chan, Michael R Bubb, Westley H Reeves y Edward KL Chan, Upregulated mir-146a expression in PBMC from rheumatoid arthritis patients, Arthritis Research & Therapy 2008, 10:R101 (doi:10.1186/ar2493) Este artículo está disponible en línea en: <http://arthritis-research.com/content/10/4/R101>). Se observaron aumentos significativos en la expresión relativa de mir-146a, mir-155, mir-132, mir-16, mir-let-7a con respecto al grupo de control normal, así como diferencias significativas entre los estados clínicos activo e inactivo.

**[0044]** Hunter *et al.* (Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, *et al.* (2008) Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. PLoS ONE 3(11): e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694) observan microARN circulando en sangre periférica en varios compartimentos, microvesículas del plasma, plaquetas y PBMC. Sugieren distintas funciones para los microARN que residen en los diferentes compartimentos, siendo los microARN que residen en los PBMC están más estrechamente relacionadas con la especificación y la expresión estable de la subcategoría de células T que expresan CD4. Es más probable que la interrogación de microARN que residen en la población de PBMC proporcione información acerca de las células T que expresan CD4. Asimismo, los monocitos y células del linaje de los monocitos y de células dendríticas, una de las dos poblaciones mononucleares de sangre periférica, regulan el estado de funcionamiento y la actividad de las células T, y en concreto de las células T que expresan CD4. El hecho de que los monocitos participan en la iniciación de la coagulación que expresa factor tisular en su superficie es de gran importancia. Parece que mir-19b y mir-20a modulan la expresión de factor tisular en pacientes con lupus (Raúl Teruel, Carlos Pérez-Sánchez, Javier Corral, María Teresa Herranz, Virginia Pérez-Andreu, Encarnación Saiz, Nuria García-Barberá, Irene Martínez-Martínez, Vanessa Roldán, Vicente Vicente, López-Pedraza, Constantino Martínez, Identification of microRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome, Journal of Thrombosis and Haemostasis, en prensa). Por consiguiente, la interrogación de microARN en PBMC en su conjunto proporciona información importante acerca del equilibrio inmunológico y la estabilidad de células mononucleares circulantes.

**[0045]** La interrogación selectiva de subconjuntos de células mononucleares aportar información adicional. Por ejemplo, la eliminación de monocitos de PBMC aislados permite la interrogación de microARN selectiva de linfocitos. En cambio, los monocitos pueden ser interrogados directamente en relación a microARN. Además, se puede interrogar de manera individual a las propias poblaciones de linfocitos tras su aislamiento selectivo

mediante estas técnicas, por ejemplo, separación por citometría de flujo tras la interacción con combinaciones de anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia, capaces de realizar una caracterización discreta de las subclases individuales. Por ejemplo, las células T reguladoras pueden estar en contacto mediante condiciones vinculantes selectivas con anti-CD3, CD4, CD25 y CD127 marcados con fluorescencia, y pueden seleccionarse mediante su expresión de CD3, CD4, CD25 y la ausencia o baja expresión de CD127.

**[0046]** El microARN proporciona información distinta a la que proporciona la cuantificación de subconjuntos de linfocitos, cuya función o marcadores pueden ser sustitutos de estos subconjuntos, como el ARNm de FoxP3, que puede considerarse como un sustituto para la cuantificación de células T reguladoras. Los microARN se pueden hallar en una multitud de tipos de célula distintos y representar diferentes funciones en distintos tipos de células, o pueden representar estados de actividad u otras características no reveladas a partir de la cuantificación de tipos de célula o estados funcionales (como citotoxicidad). Las alteraciones en la expresión de microARN varían de una enfermedad a otra. Las alteraciones de microARN observadas en la artritis reumatoide son distintas de las observadas en el lupus (Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated mir-146a expression in PBMC from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R101, *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. Noviembre 2010; 6(11): 714-722. MicroRNA (microRNA) Expression in Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD) y Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, Xu ZM, Yin YB. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2007;16(12):939-46., Raúl Teruel, Carlos Pérez-Sánchez, Javier Corral, María Teresa Herranz, Virginia Pérez-Andreu, Encarnación Saiz, Nuria García-Barberá, Irene Martínez-Martínez, Vanessa Roldán, Vicente Vicente, Shary López-Pedraza, Constantino Martínez, Identification of microRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, en prensa).

**[0047]** Se han relacionado aspectos de trastornos inmunitarios con alteraciones en la expresión de microARN. Los microARN tienen efectos importantes en la regulación de las funciones inmunológicas y en la prevención de autoinmunidad (Kaleb M. Pauley, Seunghye Cha, y Edward K.L. Chan, MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases, *J Autoimmun.* (2009) 32(3-4): 189-194). El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos es un ejemplo de una afección inmunitaria asociada a una reducción de la fertilidad, abortos recurrentes sin explicación y complicaciones en el embarazo, así como a un mayor riesgo de sufrir enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y trombóticas. Mediante una reducción en la expresión de ciertos microARN (mir-19b y 20a) se pueden identificar pacientes con mayor riesgo de sufrir complicaciones en el embarazo que se pueden tratar mediante tratamiento con anticoagulantes (p. ej., aspirina y/o heparinas (Raúl Teruel, Carlos Pérez-Sánchez, Javier Corral, María Teresa Herranz, Virginia Pérez-Andreu, Encarnación Saiz, Nuria García-Barberá, Irene Martínez-Martínez, Vanessa Roldán, Vicente Vicente, Shary López-Pedraza, Constantino Martínez, Identification of microRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, en prensa).

**[0048]** Para la identificación de medidas sustitutivas del estado disfuncional de pacientes que sufren trastornos de reproducción, se recuerda que el embarazo constituye una paradoja desde el punto de vista inmunológico, donde las respuestas autoinmunes habituales a los tejidos, como a injertos tejido/órgano, se rechazan, mientras que en un embarazo sano la tolerancia a aloantígenos prevalece, previniendo el rechazo del embrión semioantígeno. Se han descrito una multitud de mecanismos aparentemente redundantes que al parecer mantienen la alotolerancia. La existencia de estos mecanismos distinguen las alorespuestas al feto y la autoinmunidad. Por consiguiente, es de esperar que los patrones de microARN identificados entre las pacientes que padecen trastornos de reproducción no sean previsiblemente similares a los identificados en la autoinmunidad. Por otro lado, no parece haber una sustitución directa de microARN para los análisis de coagulación inmune que se llevan a cabo hoy en día, debido a su presencia y función amplias y variadas en distintos tipos de células.

**[0049]** Mishra (solicitud de patente americana 20100216142 A1, Mishra; Nilamadhab, microRNA Biomarkers in Lupus) identifica varios microARN desregulados en el lupus. Comprendidos entre las anomalías inmunológicas observadas en el lupus están los anticuerpos dirigidos contra varios fosfolípidos y el aumento de los niveles de marcadores inflamatorios, como el factor tisular. Un estudio reciente realizado por Ceribelli identifica anticuerpos dirigidos contra Ago-2, un componente del complejo RISC necesario para la génesis de microARN (Angela Ceribelli, Angela Tincani, Franco Franceschini, Roberto Cattaneo, Brad A. Pauley, Jason Y. F. Chan, Edward K. L. Chan, Anti-argonaute2 (Ago2/Su) and -Ro antibodies identified by immunoprecipitation in primary anti-phospholipid syndrome (PAPS). Publicado en línea el 9 de agosto de 2010 (doi:10.3109/08916934.2010.499886)). La terapia de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) es un ejemplo de inmunoterapia empleada para reducir la incidencia de aborto espontáneo en mujeres que presentan un historial de abortos espontáneos recurrentes inmunológicos. Winger y Reed han demostrado la eficacia de la terapia de IgIV en un grupo de mujeres con abortos espontáneos recurrentes al compararlo con un grupo de mujeres que no recibieron terapia de IgIV (Winger EE, Reed JL, Ashoush S, El-Toukhy T, Ahuja S, Taranissi M. Elevated Preconception CD56(+) 16(+) and/or Th1:Th2 Levels Predict Benefit from IVIG Therapy in Subfertile Women Undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol.* 30 de mayo de 2011). Asimismo, cuando se excluía a las pacientes con anticuerpos antifosfolípidos del grupo de pacientes en este estudio, ya no se observaban diferencias

significativas entre los grupos tratados y no tratados (datos no publicados). Por consiguiente, la capacidad para identificar pacientes mediante con marcadores asociados a anticuerpos antifosfolípidos puede ser especialmente útil a la hora de decidir quién puede beneficiarse del tratamiento inmunológico.

5 **[0050]** La detección de microARN en PBMC y en sus subconjuntos constituyentes seleccionados proporciona al clínico medios adicionales para la categorización de pacientes que padecen o están en riesgo de padecer trastornos de reproducción de carácter inmunológico en grupos cuyo problema está provocado por un desequilibrio, por ejemplo, en la actividad, la inflamación o la coagulación de las células inmunes. Taylor y Gercel-Taylor muestran la detección de microARN en mujeres con problemas en el embarazo (Taylor y Gercel-Taylor en la solicitud de patente americana 20100151480 A1). Enseñan métodos para diagnosticar el cáncer y resultados adversos durante el embarazo en un sujeto mediante la medición de la cantidad de uno o más ARNs presentes en exosomas aislados de una muestra biológica de la persona afectada. Las técnicas que muestran pueden distinguirse de las del presente objeto de estudio. Indican que los microARN que interrogan derivan directamente de tejidos placentarios, representando así el estado patofisiológico de ese órgano. El material que se da a conocer en el presente documento muestra métodos para definir el estado inmunitario a nivel del sistema o a nivel local de la persona afectada, proporcionando así un medio alternativo y suplementario para evaluar el estado inmunitario de una persona que podría afectar negativamente a su salud reproductiva. La incorporación de estos parámetros debería aumentar la sensibilidad de un panel de diagnóstico. Por ejemplo, mir-155 ha demostrado tener una función importante en la estabilización de la expresión de FoxP3 y, por otro lado, en la función efectora de las células T reguladoras, en parte mediante la regulación de la expresión de CTLA-4 (Lu *et al.* *Immunity* 30, 80-91 (2009)). Se han postulado numerosos mecanismos redundantes para inducir un estado tolerante a la madre en distintos momentos que incluyen la fase de desarrollo del óvulo (ovogénesis), la fase anterior a la concepción, la inseminación, la implantación a lo largo del transcurso restante del embarazo y el período posterior al parto. La calidad del óvulo también puede verse afectada debido a eventos inmunológicos. En la ovogénesis se ve implicada una compleja interacción de citocinas, hormonas y factores de crecimiento que participan en las interacciones de las células inmunes. La cuantificación de microARN en células inmunes puede tanto describir un transcurso normal como ser distintivo del transcurso experimentado en pacientes con trastornos de reproducción u otro tipo de problemas de carácter inmunológico.

30 **[0051]** La cuantificación de microARN proporciona beneficios adicionales. Una vez identificados los patrones de respuesta a inmunoterapias, podrían utilizarse para predecir los patrones de respuesta entre subgrupos de pacientes identificados por sus perfiles de microARN. Al haber identificado microARN o grupos de microARN concretos cuyas respuestas tras las terapias podrían utilizarse para dicotomizar o multimerizar grupos de pacientes, los pacientes agrupados de esta forma podrían entonces ser evaluados según sus respuestas a las terapias y utilizados para predecir de forma más precisa las respuestas de los pacientes individuales agrupados.

**[0052]** La capacidad de separar pacientes en dos o más grupos es importante. El empleo de Herceptin para tratar el cáncer de mama no podría resultar eficaz si se utilizase en otros tipos de cáncer de mama clínicamente similares. Herceptin (trastuzumab) se une al receptor HER2/neu. En las primeras etapas del cáncer de mama, la presencia o ausencia del receptor no resulta clínicamente evidente. Sin embargo, al expresarse mediante un cáncer de mama, indica un tipo de tumores con un comportamiento futuro más agresivo. Se pueden emplear técnicas moleculares para evaluar el estado de HER2/neu del tumor. Existen estudios clínicos que han revelado que cuando el uso del medicamento estaba restringido a aquellas pacientes con un tumor positivo con respecto a la expresión de HER2/neu, el medicamento resultó ser efectivo. La identificación de perfiles de microARN que comprenden uno o más microARN individuales podría resultar igualmente importante en la segregación de pacientes en grupos separados que de lo contrario no se distinguirían, los cuales podrían ser analizados para determinar los grupos de individuos con respuestas similares al medicamento. Por otra parte, se conocen, a partir de documentos de la técnica anterior, métodos de identificación de al menos dos grupos característicos en una población de pacientes mediante la cuantificación de un microARN de una muestra biológica.

Algunos de estos documentos son:

- WO 2009/093254;
- WO 2009/015357;
- 55 – GLEN REID *ET AL* "Circulating micro RNAs: Association with disease and potential use as biomarkers";
- YI HU *ET AL* "Two common SNPs in pri-miR-125<sup>o</sup> alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population";
- REVEL *ET AL* "MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects";
- PINELES *ET AL* "Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia";
- 60 – DIANA M MORALES PRIETO *ET AL* "MicroRNAs in pregnancy"

No obstante, dicha muestra biológica, según se da a conocer en estos documentos de la técnica anterior, normalmente proviene de leche, sangre o suero.

65

**[0053]** La presente invención logra estos y otros objetivos.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 **[0054]** De acuerdo con las necesidades expuestas anteriormente y aquéllas que se mencionarán y aparecerán a continuación, esta descripción está dirigida a un método para identificar al menos dos grupos característicos en una población de pacientes en base a la expresión de microARN incluyendo las etapas de extracción de células inmunes, extracción de ARN que comprende microARN de las células inmunes, cuantificación de al menos un microARN del ARN extraído y segregación de la población de pacientes en los grupos en base a la expresión del  
10 al menos un microARN. Preferentemente, la etapa de extracción de células inmunes comprende la extracción de células mononucleares de sangre periférica.

**[0055]** En un aspecto, la etapa de segregación de la población de pacientes incluye la asignación de pacientes que expresan un nivel relativamente alto del al menos un microARN a un primer grupo, y la asignación de  
15 pacientes que expresan un nivel relativamente bajo del al menos un microARN a un segundo grupo. La extracción de células inmunes puede incluir la extracción de células antes o después de un tratamiento de inmunoterapia. Otro aspecto de la invención está dirigido a extraer las células antes o después de un tratamiento de inmunoterapia de forma que la segregación de la población de pacientes incluye la determinación de la variación en el nivel de expresión del al menos un microARN tras el tratamiento de inmunoterapia.  
20 Preferentemente, la segregación de la población de pacientes comprende la asignación de pacientes que muestran una primera variación en el nivel de expresión a un primer grupo, y la asignación de pacientes que muestran una segunda variación en el nivel de expresión a un segundo grupo. La primera variación puede ser una variación relativamente grande en el nivel de expresión, y la segunda variación puede ser una variación relativamente pequeña en el nivel de expresión. De forma alternativa, la primera variación puede ser una  
25 variación positiva en el nivel de expresión, y la segunda variación puede ser una variación negativa en el nivel de expresión.

**[0056]** Preferentemente, el valor absoluto de la media de la variación en el nivel de expresión del al menos un microARN en el primer grupo dividido por la desviación típica es mayor o igual a uno. Además, una forma de  
30 realización está dirigida a la siguiente etapa de identificación de un subconjunto de microARN dentro del grupo de microARN conocidos que muestran una variación en el nivel de expresión en el primer grupo de forma que el valor absoluto de la media de la variación en el nivel de expresión dividido por la desviación típica es mayor o igual a uno. Además, el procedimiento puede incluir también la identificación de un microARN dentro del grupo de microARN conocidos que muestra la mayor variación en el nivel de expresión en el primer grupo.  
35

**[0057]** Otra forma de realización de la invención está dirigida a las etapas adicionales de extracción de células inmunes de un paciente adicional, extracción de ARN que comprende microARN de las células inmunes del paciente adicional, cuantificación de al menos un microARN del ARN extraído del paciente adicional, e  
40 identificación del paciente adicional como miembro de uno de los grupos segregados en base a la expresión del al menos un microARN. Preferentemente, esto incluye la administración de un tratamiento al paciente adicional en base la identificación, como por ejemplo IgIV.

**[0058]** En otro aspecto, los procedimientos de la invención incluyen también el diagnóstico de una enfermedad a un paciente en base a su pertenencia a un grupo segregado. Una forma de realización está dirigida al  
45 diagnóstico de un paciente que padece trastornos de reproducción.

**[0059]** Otro aspecto de la invención incluye la etapa adicional de monitorización del tratamiento de un paciente que pertenece a uno de los grupos segregados mediante la extracción de células inmunes, la extracción de al menos un microARN y la cuantificación del al menos un ARN en un momento posterior.  
50

**[0060]** Entre los ejemplos de microARN adecuados que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción se incluyen, sin limitaciones, hsa-miR-582-3p MIMAT0004797 (SEQ ID NO: 1); hsa-miR-7-1-3p MIMAT0004553 (SEQ ID NO: 2); hsa-miR-340-5p MIMAT0004692 (SEQ ID NO: 3); hsa-miR-199b-3p MIMAT0004563 (SEQ ID NO: 4); hsa-miR-199a-3p MIMAT0000232 (SEQ ID NO: 5); hsa-miR-30e-5p MIMAT0000692 (SEQ ID NO: 6); hsa-miR-575 MIMAT0003240 (SEQ ID NO: 7); hsa-miR-7-5p MIMAT0000252 (SEQ ID NO: 8); hsa-miR-33a-3p MIMAT0004506 (SEQ ID NO: 9); hsa-miR-7-2-3p MIMAT0004554 (SEQ ID NO: 10); hsa-miR-199b-5p MIMAT0000263 (SEQ ID NO: 11); hsa-miR-144-5p MIMAT0004600 (SEQ ID NO: 12); hsa-miR-30e-3p MIMAT0000693 (SEQ ID NO: 13); hsa-miR-424-3p MIMAT0004749 (SEQ ID NO: 14); hsa-miR-33a-5p MIMAT0000091 (SEQ ID NO: 15); hsa-miR-671-3p MIMAT0004819 (SEQ ID NO: 16); hsa-miR-340-3p MIMAT0000750 (SEQ ID NO: 17); hsa-miR-1267 MIMAT0005921 (SEQ ID NO: 18); hsa-miR-1229-3p MIMAT0005584 (SEQ ID NO: 19); hsa-miR-424-5p MIMAT0001341 (SEQ ID NO: 20); hsa-miR-221-3p MIMAT0000278 (SEQ ID NO: 21); hsa-miR-1 MIMAT0000416 (SEQ ID NO: 22); hsa-miR-133b MIMAT0000770 (SEQ ID NO: 23); hsa-miR-221-5p MIMAT0004568 (SEQ ID NO: 24); hsa-miR-210 MIMAT0000267 (SEQ ID NO: 25); hsa-miR-1229-5p MIMAT0022942 (SEQ ID NO: 26); hsa-miR-671-5p MIMAT0003880 (SEQ ID NO: 27); hsa-miR-582-5p MIMAT0003247 (SEQ ID NO: 28); hsa-miR-199a-5p MIMAT0000231 (SEQ ID NO: 29); hsa-miR-144-3p MIMAT0000436 (SEQ ID NO: 30); hsa-miR-376a-5p MIMAT0003386 (SEQ ID NO: 31); hsa-miR-193a-3p  
65

MIMAT0000459 (SEQ ID NO: 32); hsa-miR-557 MIMAT0003221 (SEQ ID NO: 33); hsa-miR-34a-3p  
 MIMAT0004557 (SEQ ID NO: 34); hsa-miR-584-5p MIMAT0003249 (SEQ ID NO: 35); hsa-miR-1244  
 MIMAT0005896 (SEQ ID NO: 36); hsa-miR-125b-1-3p MIMAT0004592 (SEQ ID NO: 37); hsa-miR-32-3p  
 MIMAT0004505 (SEQ ID NO: 38); hsa-miR-933 MIMAT0004976 (SEQ ID NO: 39); hsa-miR-373-5p  
 5 MIMAT0000725 (SEQ ID NO: 40); hsa-let-7b-5p MIMAT0000063 (SEQ ID NO: 41); hsa-miR-376a-3p  
 MIMAT0000729 (SEQ ID NO: 42); hsa-miR-129-2-3p MIMAT0004605 (SEQ ID NO: 43); hsa-miR-548am-3p  
 MIMAT0019076 (SEQ ID NO: 44); hsa-let-7f-5p MIMAT0000067 (SEQ ID NO: 45); hsa-miR-876-3p  
 MIMAT0004925 (SEQ ID NO: 46); hsa-miR-371a-5p MIMAT0004687 (SEQ ID NO: 47); hsa-miR-423-5p  
 MIMAT0004748 (SEQ ID NO: 48); hsa-miR-373-3p MIMAT0000726 (SEQ ID NO: 49); hsa-miR-152  
 10 MIMAT0000438 (SEQ ID NO: 50); hsa-miR-34a-5p MIMAT0000255 (SEQ ID NO: 51); hsa-miR-335-5p  
 MIMAT0000765 (SEQ ID NO: 52); hsa-miR-181c-5p MIMAT0000258 (SEQ ID NO: 53); hsa-miR-125b-2-3p  
 MIMAT0004603 (SEQ ID NO: 54); hsa-miR-548am-5p MIMAT0022740 (SEQ ID NO: 55); hsa-miR-338-3p  
 MIMAT0000763 (SEQ ID NO: 56); hsa-miR-1225-5p MIMAT0005572 (SEQ ID NO: 57); hsa-miR-362-3p  
 MIMAT0004683 (SEQ ID NO: 58); hsa-miR-767-5p MIMAT0003882 (SEQ ID NO: 59); hsa-miR-136-3p  
 15 MIMAT0004606 (SEQ ID NO: 60); hsa-miR-29b-1-5p MIMAT0004514 (SEQ ID NO: 61); hsa-miR-29a-3p  
 MIMAT0000086 (SEQ ID NO: 62); hsa-miR-92b-3p MIMAT0003218 (SEQ ID NO: 63); hsa-miR-362-5p  
 MIMAT0000705 (SEQ ID NO: 64); hsa-miR-223-5p MIMAT0004570 (SEQ ID NO: 65); hsa-miR-505-3p  
 MIMAT0002876 (SEQ ID NO: 66); hsa-miR-634 MIMAT0003304 (SEQ ID NO: 67); hsa-miR-371a-3p  
 MIMAT0000723 (SEQ ID NO: 68); hsa-miR-129-1-3p MIMAT0004548 (SEQ ID NO: 69); hsa-miR-1238-5p  
 20 MIMAT0022947 (SEQ ID NO: 70); hsa-miR-876-5p MIMAT0004924 (SEQ ID NO: 71); hsa-miR-181c-3p  
 MIMAT0004559 (SEQ ID NO: 72); hsa-miR-338-5p MIMAT0004701 (SEQ ID NO: 73); hsa-miR-505-5p  
 MIMAT0004776 (SEQ ID NO: 74); hsa-miR-335-3p MIMAT0004703 (SEQ ID NO: 75); hsa-miR-543  
 MIMAT0004954 (SEQ ID NO: 76); hsa-miR-223-3p MIMAT0000280 (SEQ ID NO: 77); hsa-miR-125b-5p  
 MIMAT0000423 (SEQ ID NO: 78); hsa-miR-1238-3p MIMAT0005593 (SEQ ID NO: 79); hsa-miR-377-5p  
 25 MIMAT0004689 (SEQ ID NO: 80); hsa-miR-584-3p MIMAT0022708 (SEQ ID NO: 81); hsa-miR-22-5p  
 MIMAT0004495 (SEQ ID NO: 82); hsa-miR-376a-2-5p MIMAT0022928 (SEQ ID NO: 83); hsa-miR-301a-5p  
 MIMAT0022696 (SEQ ID NO: 84); hsa-miR-548m MIMAT0005917 (SEQ ID NO: 85); hsa-miR-29b-3p  
 MIMAT0000100 (SEQ ID NO: 86); hsa-miR-99a-3p MIMAT0004511 (SEQ ID NO: 87); hsa-miR-33b-3p  
 MIMAT0004811 (SEQ ID NO: 88); hsa-miR-92b-5p MIMAT0004792 (SEQ ID NO: 89); hsa-miR-602  
 30 MIMAT0003270 (SEQ ID NO: 90); hsa-miR-1237-3p MIMAT0005592 (SEQ ID NO: 91); hsa-miR-129-5p  
 MIMAT0000242 (SEQ ID NO: 92); hsa-miR-148b-3p MIMAT0000759 (SEQ ID NO: 93); hsa-miR-377-3p  
 MIMAT0000730 (SEQ ID NO: 94); hsa-let-7b-3p MIMAT0004482 (SEQ ID NO: 95); hsa-miR-125a-5p  
 MIMAT0000443 (SEQ ID NO: 96); hsa-miR-125a-3p MIMAT0004602 (SEQ ID NO: 97); hsa-miR-148b-5p  
 MIMAT0004699 (SEQ ID NO: 98); hsa-miR-22-3p MIMAT0000077 (SEQ ID NO: 99); hsa-miR-1237-5p  
 35 MIMAT0022946 (SEQ ID NO: 100); hsa-let-7f-1-3p MIMAT0004486 (SEQ ID NO: 101); hsa-miR-29a-5p  
 MIMAT0004503 (SEQ ID NO: 102); hsa-miR-193a-5p MIMAT0004614 (SEQ ID NO: 103); hsa-miR-423-3p  
 MIMAT0001340 (SEQ ID NO: 104); hsa-miR-191-3p MIMAT0001618 (SEQ ID NO: 105); hsa-miR-301a-3p  
 MIMAT0000688 (SEQ ID NO: 106); hsa-miR-767-3p MIMAT0003883 (SEQ ID NO: 107); hsa-miR-563  
 MIMAT0003227 (SEQ ID NO: 108); hsa-miR-95 MIMAT0000094 (SEQ ID NO: 109); hsa-miR-1234-3p  
 40 MIMAT0005589 (SEQ ID NO: 110); hsa-miR-1225-3p MIMAT0005573 (SEQ ID NO: 111); hsa-miR-136-5p  
 MIMAT0000448 (SEQ ID NO: 112); hsa-miR-1234-5p MIMAT0022944 (SEQ ID NO: 113); hsa-miR-99a-5p  
 MIMAT0000097 (SEQ ID NO: 114); hsa-miR-32-5p MIMAT0000090 (SEQ ID NO: 115); hsa-miR-191-5p  
 MIMAT0000440 (SEQ ID NO: 116); hsa-miR-33b-5p MIMAT0003301 (SEQ ID NO: 117); hsa-mir-1-1 MI0000651  
 (SEQ ID NO: 118); hsa-mir-1-2 MI0000437 (SEQ ID NO: 119); hsa-mir-7-1 MI0000263 (SEQ ID NO: 120); hsa-  
 45 mir-7-2 MI0000264 (SEQ ID NO: 121); hsa-mir-7- (SEQ ID NO:3 MI0000265 122); hsa-mir-30e MI0000749 (SEQ  
 ID NO: 123); hsa-mir-33a MI0000091 (SEQ ID NO: 124); hsa-mir-133b MI0000822 (SEQ ID NO: 125); hsa-mir-  
 144 MI0000460 (SEQ ID NO: 126); hsa-mir-199a-1 MI0000242 (SEQ ID NO: 127); hsa-mir-199a-2 MI0000281  
 (SEQ ID NO: 128); hsa-mir-199b MI0000282 (SEQ ID NO: 129); hsa-mir-210 MI0000286 (SEQ ID NO: 130); hsa-  
 mir-221 MI0000298 (SEQ ID NO: 131); hsa-mir-340 MI0000802 (SEQ ID NO: 132); hsa-mir-424 MI0001446  
 50 (SEQ ID NO: 133); hsa-mir-575 MI0003582 (SEQ ID NO: 134); hsa-mir-582 MI0003589 (SEQ ID NO: 135); hsa-  
 mir-671 MI0003760 (SEQ ID NO: 136); hsa-mir-1229 MI0006319 (SEQ ID NO: 137); hsa-mir-1267 MI0006404  
 (SEQ ID NO: 138); hsa-let-7a-3 M10000062 (SEQ ID NO: 139); hsa-let-7e M10000066 (SEQ ID NO: 140); hsa-  
 mir-22 M10000078 (SEQ ID NO: 141); hsa-mir-29a M10000087 (SEQ ID NO: 142); hsa-mir-29b-1 MI0000105  
 (SEQ ID NO: 143); hsa-mir-32 MI0000090 (SEQ ID NO: 144); hsa-mir-33b MI0003646 (SEQ ID NO: 145); hsa-  
 55 mir-34a MI0000268 (SEQ ID NO: 146); hsa-mir-92b MI0003560 (SEQ ID NO: 147); hsa-mir-95 MI0000097 (SEQ  
 ID NO: 148); hsa-mir-99a MI0000101 (SEQ ID NO: 149); hsa-mir-125a MI0000469 (SEQ ID NO: 150); hsa-mir-  
 125b-1 MI0000446 (SEQ ID NO: 151); hsa-mir-125b-2 MI0000470 (SEQ ID NO: 152); hsa-mir-129-1 MI0000252  
 (SEQ ID NO: 153); hsa-mir-129-2 MI0000473 (SEQ ID NO: 154); hsa-mir-136 MI0000475 (SEQ ID NO: 155);  
 hsa-mir-148b MI0000811 (SEQ ID NO: 156); hsa-mir-152 MI0000462 (SEQ ID NO: 157); hsa-mir-181c  
 60 MI0000271 (SEQ ID NO: 158); hsa-mir-191 MI0000465 (SEQ ID NO: 159); hsa-mir-193a MI0000487 (SEQ ID  
 NO: 160); hsa-mir-223 MI0000300 (SEQ ID NO: 161); hsa-mir-301a MI0000745 (SEQ ID NO: 162); hsa-mir-335  
 MI0000816 (SEQ ID NO: 163); hsa-mir-338 MI0000814 (SEQ ID NO: 164); hsa-mir-362 MI0000762 (SEQ ID NO:  
 165); hsa-mir-371a MI0000779 (SEQ ID NO: 166); hsa-mir-373 MI0000781 (SEQ ID NO: 167); hsa-mir-376a-1  
 MI0000784 (SEQ ID NO: 168); hsa-mir-376a-2 MI0003529 (SEQ ID NO: 169); hsa-mir-377 MI0000785 (SEQ ID  
 65 NO: 170); hsa-mir-423 MI0001445 (SEQ ID NO: 171); hsa-mir-425 MI0001448 (SEQ ID NO: 172); hsa-mir-505  
 MI0003190 (SEQ ID NO: 173); hsa-mir-543 MI0005565 (SEQ ID NO: 174); hsa-mir-548m MI0006400 (SEQ ID

NO: 175); hsa-mir-557 MI0003563 (SEQ ID NO: 176); hsa-mir-563 MI0003569 (SEQ ID NO: 177); hsa-mir-584 MI0003591 (SEQ ID NO: 178); hsa-mir-602 MI0003615 (SEQ ID NO: 179); hsa-mir-634 MI0003649 (SEQ ID NO: 180); hsa-mir-767 MI0003763 (SEQ ID NO: 181); hsa-mir-876 MI0005542 (SEQ ID NO: 182); hsa-mir-933 MI0005755 (SEQ ID NO: 183); hsa-mir-1225 MI0006311 (SEQ ID NO: 184); hsa-mir-1234 MI0006324 (SEQ ID NO: 185); hsa-mir-1237 MI0006327 (SEQ ID NO: 186); hsa-mir-1238 MI0006328 (SEQ ID NO: 187); hsa-mir-1244-1 MI0006379 (SEQ ID NO: 188); hsa-mir-1244-2 MI0015974 (SEQ ID NO: 189); hsa-mir-1244-3 MI0015975 (SEQ ID NO: 190); y hsa-mir-1825 MI0008193 (SEQ ID NO: 191)

**[0061]** Las formas de realización de la invención pueden incluir el uso de al menos un microARN seleccionado de entre hsa-let-7e, mir-1, hsa-mir-1181, hsa-miR-1183, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-mir-1296, hsa-mir-132, hsa-mir-136, hsa-miR-139-3p, hsa-mir-141, hsa-miR-142-3p, hsa-mir-142-5p, hsa-mir-144, hsa-mir-153, hsa-mir-1537, hsa-miR-154, hsa-miR-191, hsa-mir-193a-3p, hsa-miR-19a, hsa-mir-219-5p, hsa-mir-29b, hsa-mir-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-30e, hsa-mir-32, hsa-mir-33a, hsa-miR-340, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-377, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-432, hsa-mir-513a-5p, hsa-mir-545, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-574-5p, hsa-mir-582-3p, hsa-mir-590-5p, hsa-mir-15a, hsa-mir-548c-5p, hsa-mir-1225-3p, hsa-mir-29b, hsa-mir-21, hsa-mir-1237, hsa-mir-101, hsa-mir-1539, hsa-mir-557, hsa-mir-125a-3p y hsa-mir-423-5p. En otro aspecto, el microARN se selecciona de entre hsa-mir-136, hsa-mir-141, hsa-mir-142-5p, hsa-mir-144, hsa-mir-153, hsa-mir-1537, hsa-mir-193a-3p, hsa-mir-219-5p, hsa-mir-29b, hsa-mir-301a, hsa-mir-32, hsa-mir-33a, hsa-mir-545, hsa-mir-582-3p, hsa-mir-590-5p, hsa-mir-1181, hsa-mir-513a-5p, hsa-mir-132 y hsa-mir-1296. En otro aspecto, el microARN se selecciona de entre from hsa-miR-144, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-1229, hsa-miR-1267, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-1244, hsa-miR-1 y hsa-miR-133b. En otro aspecto, el al menos un microARN puede ser mir-1229 o mir-671-3p. En otro aspecto, la cuantificación y segregación puede incluir la utilización de al menos cuatro microARN seleccionados del grupo que consiste en miR-7-5p, miR-1229, miR-1267, miR-671-3p, miR-340-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-133b y hsa-miR-33a-5p.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS IMÁGENES**

**[0062]** Las características y ventajas adicionales quedarán patentes en la siguiente descripción más concreta de las formas de realización preferidas de la invención, según se ilustra en las imágenes adjuntas, y en la cual las características como las que se indican se refieren de forma general a las mismas partes o elementos en todas las vistas, y en la que:

Fig. 1 muestra los niveles de CT de los pacientes que tienen una elevada expresión inicial de microARN antes y después del tratamiento con IgIV, de acuerdo con una forma de realización de la invención;

Fig. 2 muestra los niveles de CT de los pacientes que tienen una baja expresión inicial de microARN antes y después del tratamiento con IgIV, de acuerdo con una forma de realización de la invención;

Fig. 3 muestra un sistema de puntuación para analizar los microARN seleccionados, de acuerdo con una forma de realización de la invención;

Figs. 4a-4g muestran los 100 mejores microARN y los 100 peores microARN en relación a los resultados del paciente, de acuerdo con una forma de relación de la invención; y

Figs. 5a-b muestran diferencias en la expresión de los 25 mejores microARN y los 25 peores microARN de las Figs. 4a-g, de acuerdo con una forma de realización de la invención.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

**[0063]** Ante todo, se entiende que la presente descripción no se limita a ejemplos particulares de materiales, arquitecturas, rutinas, métodos o estructuras ya que, en efecto, pueden variar. Así, aunque en la práctica de las formas de realización de la presente descripción se pueden utilizar varias de estas opciones, similares o equivalentes a las que se describen en el presente documento, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

**[0064]** Asimismo, se entiende que la terminología empleada en el presente documento tiene como único propósito describir formas de realización concretas de la presente descripción y no se pretende que tenga carácter limitante.

**[0065]** Este sumario proporciona una lista de varias formas de realización del objeto de estudio de la presente descripción. No obstante, se debe entender que existen variaciones y combinaciones de estas formas de realización. El objetivo de este sumario es brindar ejemplos de formas de realización potenciales.

**[0066]** El término "células inmunes" según se utiliza en el presente documento hará referencia a linfocitos, monocitos y granulocitos, sus precursores y derivados madurativos. Estos incluirán, por ejemplo, células

plasmáticas, células dendríticas, mastocitos, granulocitos y macrófagos. Se entiende que las células inmunes participan en un amplio abanico de actividades. Éstas incluyen la supervivencia y la intervención inmunológica (como la eliminación de células malignas y de agentes infecciosos). Asimismo, las células del sistema inmune, en concreto los monocitos y sus derivados, están implicados en la coagulación. Además, se entiende que la inflamación es una manifestación de actividades de las células del sistema inmunológico.

**[0067]** Tal como se utilizan en el presente documento, el término “inmunoterapia”, “inmunoterapéutico/a” o “terapia inmunológica” incluirá la intervención terapéutica orientada a modificar actividades de células del sistema inmune, contemplando de esta forma acciones que afectan a células inmunes donde dichas células afectan a la coagulación y a la inflamación.

**[0068]** En el presente documento, se pueden identificar microARN concretos por su prefijo mir- y su identificador, como en este caso en mir-155. Se pueden encontrar secuencias de un transcrito de ARN asociado a miARNs en cualquier lugar del transcripto. No obstante, son más habituales las secuencias de la región 3' no traducida. La nomenclatura del microARN comprende un prefijo de tres letras “mir” seguido por un número asignado generalmente con el fin de describir el microARN. En un convenio, cuando se utiliza la “R” minúscula, la secuencia hace referencia al pre-microARN, mientras que cuando se utiliza la mayúscula (miR), se indica la forma madura. Se pueden designar variantes donde las secuencias varían en una o dos bases mediante las letras “a” y “b”. En ocasiones, pre-microARN situados en regiones separadas del genoma dan lugar a un microARN maduro idéntico. Estos microARN se distinguen mediante un prefijo numérico (“miR-123-1” y “miR-123-2”). Cuando se originan dos microARN en distintas secciones del mismo pre-microARN, se designan con el sufijo -3p o -5p según si se utiliza la hebra 3' o 5'. Según se utiliza en el presente documento, el código numérico, por ejemplo “mir-123”, incluirá sus variantes, como mir-123-1, mir-123-2, así como las variantes -3p y -5p. Tal como se emplea en la presente, el término “pre-miARN” hará referencia al ARN asociado al complejo Drosha-Pasha. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “pre-miARN” se referirá al producto de la segmentación por el complejo Drosha-Pasha. Según se utiliza en el presente documento, no se hará ningún tipo de distinción en cuanto a secuencias entre la nomenclatura parental, por ejemplo mir-123, y cualquier secuencia más selectiva, como mir-123-5p, que difiera de la descripción ofrecida a lo largo del texto.

**[0069]** Algunas abreviaturas de microARN concretas también pueden incluir un prefijo adicional que identifica la especie de origen, como hsa para homo sapiens. Aunque las formas de realización principales descritas en el presente documento están orientadas a humanos, un experto podrá apreciar que las técnicas utilizadas en la presente descripción pueden aplicarse a otras especies.

**[0070]** El término “individuo de control” según se utiliza en el presente documento posee un significado especial. Un “individuo de control” hará referencia a individuos de características comparables, como edad y sexo, que no presentan un trastorno de reproducción y no están en riesgo conocido de desarrollar un trastorno de reproducción. El término “muestra de control” según se utiliza en el presente documento se referirá a una muestra biológica de la misma fuente, como sangre periférica, que se extrae en condiciones iguales o comparables que una muestra de paciente que comprende células inmunes extraídas de un individuo de control y que se procesa y se analiza de la misma forma que una muestra de paciente.

**[0071]** Se entiende además que el término “muestra de control” según se utiliza en el presente documento puede representar la media aritmética de varias muestras de individuos de control donde se recogen una cantidad de muestras considerada suficiente por un experto en la materia. Pueden obtenerse parámetros estadísticos adicionales a partir de dichas muestras, como la desviación típica de la media. Estos parámetros estadísticos adicionales se pueden utilizar para comparar un resultado de una prueba en un paciente con muestras de control para calcular la probabilidad de que el resultado de la prueba del paciente represente un descubrimiento anormal, sugiriendo así que el paciente padece un problema de reproducción o se encuentra en riesgo de padecer un trastorno de reproducción. Para simplificar, el término también puede utilizarse de forma distinta, donde se recogen y se analizan una pluralidad de muestras de un individuo comparables y separadas en el tiempo, y se contrastan entre sí de tal forma que se compara una primera muestra o una muestra concreta posterior como si la primera tuviera carácter de control sobre la segunda, lo que permite evaluar un cambio de estado posiblemente como una función del estado clínico, una etapa del embarazo o como resultado de una intervención terapéutica.

**[0072]** El término “disfunción reproductiva inmunológica” o “trastorno de reproducción” según se utiliza en el presente documento comprenderá aquellos trastornos del sistema reproductor sospechosos de presentar un componente inmunológico. Estos incluirán, sin limitaciones, los siguientes: infertilidad y fracaso tras la concepción como fracaso en la implantación que puede no ser reconocido y por tanto diagnosticado como infertilidad; aborto espontáneo; afecciones que no resultan en aborto espontáneo pero que ponen en peligro el resultado óptimo del embarazo como retraso del crecimiento intrauterino, RPM (ruptura prematura de membranas), preeclampsia, parto prematuro, desprendimiento de placenta y muerte fetal; afecciones que se sabe que contribuyen a la infertilidad, complicaciones en el embarazo y fracaso en la implantación temprana, como endometriosis y tiroiditis autoinmune y síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, trastornos del embarazo que ponen en riesgo el crecimiento, maduración y desarrollo fetal óptimo durante el embarazo y/o ponen en

riesgo el desarrollo infantil potencial tras el parto, aquellos trastornos reproductivos que ponen en riesgo el potencial reproductor de la madre a largo plazo durante el transcurso de su ciclo reproductor.

**[0073]** El término “trastorno inmunológico” según se utiliza en el presente documento comprenderá trastornos provocados por un componente anormal, ya sea humoral, mediado por células o ambos y/o relacionado con un componente inmune, como un componente inflamatorio o mediado por coagulación.

**[0074]** Según se utiliza en el presente documento, el término “expresado/s diferencialmente” o “expresión diferencial” se referirá a una diferencia detectable por los medios de detección seleccionados en la cuantificación de un microARN concreto entre la muestra biológica del paciente y el valor medio correspondiente de una población de control donde dicha diferencia ha sido identificada de entre una población de pacientes estadísticamente significativa con un trastorno reproductivo y una población de control correspondiente sin el trastorno o riesgo de padecer el trastorno. Los términos también se pueden aplicar donde la cuantificación de una pluralidad de microARN individuales conforman un patrón que se puede distinguir de un patrón correspondiente identificado en la población de control. La expresión diferencial de uno o más microARN entre pacientes con un trastorno reproductivo y/o riesgo de padecer un trastorno reproductivo y los individuos de control está determinado preferentemente en una pantalla de un panel de microARN como el que suministra SABiosciences (catálogo MAH-104A). Los microARN expresados diferencialmente entre los valores del paciente y del individuo de control pueden determinarse empleando varios medios. Cada método necesita incluir un número mínimo de muestras de cada grupo para poder establecer una diferencia significativa en la expresión entre los dos grupos. Una forma de realización preferida para determinar microARN expresados diferencialmente entre pacientes e individuos de control emplea la matriz de microARN relacionada con inmunopatología de microARN humano (tecnología SuperArray, SABiosciences, Frederick, catálogo MD MAH-104A de Stratagene Mx3005p). Se llevan a cabo reacciones de tres o más extractos de ARN de pacientes con un trastorno reproductivo o en riesgo de padecer un trastorno reproductivo y tres o más muestras de control siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador en tiempo real Stratagene 3005p siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada conjunto de triplicados o superiores, se determina el valor medio de cada microARN y se utiliza para calcular las diferencias en los niveles. Se determina que un valor de microARN está expresado diferencialmente cuando existe una diferencia entre el valor del paciente y el valor del individuo de control con un  $p$  valor  $\leq 0,05$ . Se pueden seleccionar otros  $p$  valores según indiquen los expertos en la materia. Se debe entender que un trastorno reproductivo inmunológico o el riesgo de padecer un trastorno de este tipo puede comprender distintos patrones de expresión diferencial. Por otro lado, el momento en el que se realice la prueba a un paciente puede dar como resultado un patrón diferente de expresión de microARN y, además, los patrones pueden ser distintos con respecto a la terapia en curso. Por ejemplo, las células T reguladoras aumentan fisiológicamente tras la concepción. Se podría esperar que microARN como mir-155, que participa activamente en la regulación de FoxP3, un regulador transcripcional implicado en la función T reguladora, estuvieran regulados de forma diferencial entre antes y después de la concepción.

**[0075]** El término “bimodal” o “distribución bimodal” tendrá el significado conocido habitualmente por los expertos en estadística. Los histogramas de datos que comprenden dos máximos se denominan “bimodales”, mientras que los que tienen un único máximo se denominan “unimodales”. Erhard Reschenhofer de la Universidad de Viena (Journal of Statistics Education, 9(1) (2001) <http://www.amstat.org/publications/jse/v9n1/reschenhofer.html>, descargado el 24-10-2011) define formalmente “bimodalidad” y ofrece pruebas estadísticas para determinar la bimodalidad. Es evidente que no todas las distribuciones con dos máximos, sobre todo máximos superpuestos, son bimodales. Estos deben estar claramente diferenciados. La bimodalidad se puede evaluar de forma menos formal mediante la revisión de un histograma de los datos. Si existe una superposición en los rangos según lo determinado por las medias y las desviaciones típicas de los dos máximos, no se puede afirmar que exista bimodalidad.

**[0076]** Las formas de realización expuestas en el presente documento se analizan principalmente en términos de bimodalidad de forma que existen grupos dicotómicos. No obstante, se debe entender que si varios grupos de pacientes son distinguibles utilizando las técnicas de la descripción, los principios pueden seguir aplicándose.

**[0077]** El término “heurístico” según se utiliza en el presente documento hará referencia a técnicas basadas en la experiencia para la resolución de problemas. Más concretamente, comprenderá técnicas diseñadas para la resolución de problemas en base a la experiencia tal como las comprendidas en una base de datos. Además, las técnicas pueden implicar un proceso de perfeccionamiento continuo donde un modelo de resolución de problemas se actualiza continuamente en base a la acumulación de datos adicionales en la base de datos. Estas técnicas pueden ser incorporadas a algoritmos informáticos.

**[0078]** Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “realizar un diagnóstico” o un término equivalente utilizado en el presente documento se referirá al agregado de métodos utilizados por una persona, preferentemente un médico experto en la materia de la medicina reproductiva, y hará referencia a la predicción de un resultado clínico con o sin tratamiento, la selección del tratamiento y la monitorización del tratamiento empleando la medición de uno o más niveles o perfiles de microARN de células inmunes comprendidas en una o más muestras biológicas del paciente y comparadas con los individuos de control apropiados. Se entiende

además que dicho diagnóstico puede implicar la consiguiente evaluación de otros hallazgos clínicos junto con el mencionado análisis de cuantificación de microARN.

**[0079]** A no ser que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones se deben entender como si estuvieran modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. En este sentido, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretendan obtener mediante el objeto de estudio que se describe.

**[0080]** Según se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje, quiere decir que abarca variaciones de  $\pm 20$  % en algunas formas de realización,  $\pm 10$  % en algunas formas de realización,  $\pm 5$  % en algunas formas de realización,  $\pm 1$  % en algunas formas de realización,  $\pm 0,5$  % en algunas formas de realización y  $\pm 1$  % en algunas formas de realización con respecto a la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo los procedimientos descritos.

**[0081]** La totalidad de las patentes y las referencias del presente documento, ya estén convenientemente citadas en la bibliografía o bien redirigidas mediante enlaces de internet, se incorporan completamente por referencia. Todos los términos técnicos y científicos empleados a lo largo de la presente descripción tendrán el mismo significado que normalmente entienden los expertos en la materia que se describe en el presente documento, excepto cuando se indique específicamente lo contrario. Siguiendo las convenciones arraigadas en la legislación sobre patentes, cuando se utilizan los términos “un/una” y “el/la” en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones, se hace referencia a “uno o más”. Por consiguiente, por ejemplo, cuando se menciona “un péptido” se incluye una pluralidad de dichos péptidos, y así sucesivamente.

**[0082]** Como se ha mencionado anteriormente, queda una necesidad sin cubrir. Los clínicos pueden recibir a pacientes en los que se crea que una inmunoterapia puede ser útil. Es bien sabido (véase Winger y Reed) que una selección de pacientes adecuada para la inmunoterapia es crucial para que una intervención terapéutica sea efectiva. Los autores identificaron pacientes apropiados para dicha intervención mediante el uso de diversos marcadores de PBMC *in vitro*. En la presente invención, Winger y Reed han cuantificado varias modificaciones de microARN y patrones de microARN en PBMC en distintos momentos antes y después de una intervención inmunoterapéutica. Estas “firmas” de microARN apoyan el diagnóstico clínico mediante la identificación de candidatos para recibir intervención/es terapéutica/s, y pronostican resultados en pacientes con trastornos diversos, por ejemplo, trastornos relacionados con el embarazo. Asimismo, se contempla que los procedimientos de diagnóstico de la presente invención pueden aplicarse a distintas afecciones clínicas y con diferentes intervenciones inmunoterapéuticas. Su uso reduce estrategias de diagnóstico complejas a un único procedimiento y proporciona información de la que no se disponía anteriormente.

**[0083]** Aunque los estudios y ejemplos iniciales descritos en el presente documento se refieren fundamentalmente al embarazo y a trastornos del sistema reproductor de las mujeres, estos estudios también pueden considerarse como ejemplos para una aplicación más amplia de la presente invención para otros estados patológicos que implican otros sistemas de órganos. Además, aunque algunas descripciones se refieren a variaciones en la expresión de uno o más microARN antes y después de una intervención seleccionada, se entiende que la presente invención puede aplicarse a mediciones realizadas en un único momento, ya fuera antes o después de una intervención prevista.

**[0084]** Un aspecto novedoso de la presente invención es la separación de pacientes en grupos que se distinguen por variaciones características en un único o varios microARN tras la intervención inmunoterapéutica seleccionada. La identificación de pacientes que pertenecen a grupos de respuesta de microARN se asocia con una mejora en la eficacia, pronóstico y utilidad de una/s intervención/es inmunoterapéutica/s en concreto. Por otro lado, niveles cuantitativos de ciertos microARN y patrones de modificación en microARN pueden predecir la respuesta del/de los grupo/s de pacientes, y los niveles posteriores a la terapia pueden presentar un valor predictivo adicional. El uso de patrones de microARN que responden a una intervención terapéutica o predictivos de la misma proporciona información útil en cuanto a la gestión que no está disponible mediante la identificación de marcadores directamente relacionados con el proceso patológico.

**[0085]** La presencia, ausencia o el nivel de proteínas que interactúan con el ADN supone el regulador principal del efecto de dichas interacciones de ADN nativo. Con respecto a la purificación, es evidente que dichas interacciones pueden suceder únicamente en la forma nativa y no purificada de ADN, donde interacciones adicionales con proteínas que interactúan de forma auxiliar se derivan de un resultado de dicha interacción. El “estado” de una célula, por ejemplo la proliferación, el estrés o la diferenciación, no está comprendido en dichas secuencias, sino en la interacción de ADN con las proteínas con las que interactúa. La separación de ADN mediante aislamiento o alteración *in situ* utilizando procesos de desnaturalización incluyendo calor o empleo de químicos o mediante interacción de sondas polinucleotídicas invasivas (ADN bloqueado, PNAs...) altera estas interacciones. Por lo que respecta al ARN, los efectos son todavía más evidentes. Ahora es bien sabido que las

moléculas de ARN de interacciones no canónicas resultan en actividades inesperadas como las observadas en las ribozimas. Se necesitan entonces interacciones esenciales con cationes divalentes concretos para el supuesto de una configuración catalítica. Los microARN necesitan interactuar con proteínas que deben estar disponibles en el formato adecuado.

5 **[0086]** El proceso de descubrimiento involucrado es una etapa de transformación. El procedimiento empleado para hallar los microARN de la presente invención implicó dos puntos de prueba, uno anterior y otro posterior a la intervención diseñada para perturbar el sistema. Se identificaron microARN que mostraron un comportamiento considerablemente distinto tras la intervención perturbadora. La intervención de la presente invención era de transformación, resultando en una respuesta distinguible entre microARN seleccionados de entre distintos subgrupos clínicos. Además, una única prueba realizada con anterioridad a la intervención revela que se pueden utilizar múltiples microARN, sobre todo los mismos microARN que muestran alteraciones distinguibles entre subgrupos clínicos, para pronosticar la pertenencia a subgrupos clínicos.

15 **[0087]** La cuantificación de microARN proporciona información sobre procesos fisiológicos y patológicos donde sus niveles son perceptiblemente distinguibles de los del estado estacionario. Se entiende que las interacciones entre factores genéticos y ambientales resultan en la expresión de un fenotipo que no se puede pronosticar únicamente mediante factores genéticos. En los últimos años, se han puesto de manifiesto interacciones a nivel de microARN y factores ambientales. Se sabe que los microARN tienen funciones cruciales en procesos biológicos celulares entre los que se incluyen el crecimiento, proliferación, diferenciación, desarrollo, apoptosis, estrés, inflamación y carcinogénesis (Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006;6:259-269, Catania A.S., *et al.* Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2009;53:550-559, Chow W.H., *et al.* Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2010;7:245-257, Das U.N. Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* 2010;26:459-473). Se han asociado disfunciones de varios microARN con diversos procesos patológicos (Lu M., *et al.* An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008;3:e3420). El tratamiento de patologías puede derivar en la restauración de un patrón de expresión de microARN alterado similar al observado en individuos no afectados. De forma alternativa, el tratamiento puede resultar en patrones de expresión de microARN en función a intervención/es o tipo/s de intervención/es concreta/s. La identificación de microARN afectados en un proceso fisiológico o patológico puede no ser visible mediante la aplicación de una estrategia de detección y comparación entre sujetos afectados y no afectados. La expresión diferencial puede no revelarse mediante la aplicación de un evento perturbador, como una intervención terapéutica. En un ejemplo donde se cubre suavemente un objeto invisible con agua calmada cerca de la superficie, el patrón de ondas regular que produce una piedra arrojada al agua cerca del objeto podría quedar distorsionado por el objeto bajo la superficie, revelando así su presencia. De la misma forma, el patrón de microARN de una intervención terapéutica podría verse alterado revelando un/os patrón/es distinto/s de su expresión. En el estudio presentado en este documento, demostramos un patrón de expresión alterado de mir-132 tras la intervención terapéutica con IgIV. Una característica destacable de la expresión de mir-132 tras la terapia con IgIV es su naturaleza dicotómica. Esta expresión diferencial de microARN revela inesperadamente dos grupos de pacientes que responden a la misma. Al segregar los análisis de micromatrices de microARN conocidos en dos grupos conforme a su respuesta de mir-132 a la IgIV, se muestran patrones de respuesta de microARN marcadamente diferentes. En análisis posteriores donde los pacientes se agruparon según sus resultados clínicos (sano, preeclampsia y aborto), se identificaron también distintos patrones de respuesta a IgIV de microARN entre los grupos separados. Se han estudiado efectos ambientales en la expresión de microARN, donde los efectos ambientes incluyen intervenciones farmacológicas (Yang Q, Qiu C, Yang J, Wu Q, y Cui Q\*. *miREnvironment Database: providing a bridge for microRNAs, environmental factors, and phenotypes.* *Bioinformatics* 2011 27: 3329-3330, Qiu C, Chen G, y Cui Q\*. *Towards the understanding of microRNA and environmental factor interactions and their relationships to human diseases.* *Scientific Reports* 2012, 2:318.) Estos mismos autores han desarrollado una base de datos que se puede consultar en línea (<http://202.38.126.151/hmdd/tools/miren.html>, descargado el 21/10/2012).

50 **[0088]** Varios microARN diferentes pueden coordinar en su regulación ARNms individuales de forma que la expresión de cualquier ARNm particular es el producto de efectos regulatorios de los microARN individuales. La expresión de microARN en sí puede estar regulada de forma similar por otros microARN ascendentes (en dirección 5'). Por consiguiente, se desarrolla una red compleja que implica microARN. Muchos estudios han proporcionado información acerca de interacciones de microARN concretos y sus ARNms diana. No obstante, la predicción de los resultados de estas interacciones concretas ha sido ensombrecida por la dificultad de sus interacciones interrelacionadas. Por tanto, es sorprendente que modificaciones en la expresión de microARNA concretos oernuta que las respuestas de pacientes sean dicotomizadas o segregadas en diversos grupos de terapias de intervención por su modificación en la expresión de microARN concretos. Experimentos iniciales permiten la segregación de pacientes en dos grupos distinguibles por su patrón de expresión de miR-132. En un grupo, permanece una baja expresión de miR-132 o se volvió algo más baja tras el tratamiento con administración de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) combinada. El otro grupo presentó una concentración relativamente alta de miR-132 pero experimentó un descenso significativo en su nivel tras la interrogación de cuatro miembros de cada grupo para todos los microARN humanos conocidos antes y después de la terapia con

IgIV en micromatriz: [http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4170-90011\\_miRNA\\_complete\\_2.4.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4170-90011_miRNA_complete_2.4.pdf).

5 **[0089]** Los resultados se muestran en tablas (4-21). Muestran una extracción de microARN con diferentes niveles de expresión comparando los valores detectados antes y después de la terapia con IgIV. Además, muchos de estos microARN, así como microARN adicionales, muestran distintos niveles absolutos entre los dos grupos en medidas en mediciones únicas antes y después de la intervención. Para excluir la posibilidad de que estos hallazgos puedan haberse detectado de forma aleatoria entre el gran número de microARN analizados, se reasignaron miembros de dos grupos para que los resultados de dos miembros del primer grupo se combinaran con resultados de dos miembros del segundo grupo y el resto de los dos grupos se combinaron de igual manera para formar los dos grupos de simulación. Cuando se examinaron los datos de la expresión diferencial similar de modificaciones entre antes y después de la terapia IgIV y para los valores absolutos únicos, no se pudo identificar la expresión diferencial según se ha indicado previamente.

15 **[0090]** Se extrajeron muestras de pacientes adicionales y se analizaron mediante análisis de micromatriz de la misma manera que se acaba de describir, donde los resultados clínicos eran conocidos: 1) embarazo sano, 2) aborto espontáneo y 3) preeclampsia. Se combinaron resultados con datos de resultado similares de los pacientes descritos anteriormente.

20 **[0092]** Otro aspecto de la invención es el uso de microARN para distinguir pacientes que es posible que respondan a una intervención terapéutica de aquéllos que es poco posible que respondan. En concreto, microARN específicos pueden identificar pacientes que es posible que respondan a terapia de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) de aquéllos que es poco probable que respondan. Se entiende que esta identificación de paciente se extiende a pacientes que no sufren trastornos de reproducción, sino que más bien incluye a todos los pacientes en los que se considera la aplicación de una terapia de IgIV. La monitorización de microARN se puede extender a la monitorización de la eficacia de IgIV en aquéllos pacientes candidatos para la terapia IgIV por otras afecciones. Asimismo, la invención puede utilizarse de la misma forma para determinar la idoneidad de otros agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo un inhibidor de TNF $\alpha$  como Humira, así como esteroides, intralípidos, inmunización de linfocitos e inhibidores de IL-1 (Anakinra) o medicamentos. Otros sistemas interactúan con el sistema inmune, donde los medicamentos tienen efectos moderados en el sistema inmune, la inflamación y la coagulación. Estos incluyen, por ejemplo, efectos en el sistema renina-angiotensina, por ejemplo angiotensina que convierte inhibidores de enzima ("ACE-I"), inhibidores de receptores de angiotensina ("ARB"), inhibidores de renina, agonistas de receptor de angiotensina tipo II (por ejemplo "C21") y medicamentos que afectan a la síntesis de ácido mevalónico como inhibidores de la HMGCoA reductasa ("estatinas"). Según se utiliza en el presente documento, cada una de las modalidades terapéuticas deberá considerarse como "intervención inmunoterapéutica".

35 **[0093]** Dicho método constituye una evaluación de la cantidad de uno o más microARN donde la cuantificación de dichos microARN se correlaciona clínicamente con microARN presente en células del sistema inmune en la muestra biológica. Así, donde una muestra biológica es sangre entera y microARN extraído de sangre entera, siempre que la cuantificación de microARN individuales se correlacione clínicamente con microARN presente en células del sistema inmune, se considera cuantificación de microARN donde dicho microARN está aislado de células del sistema inmune aisladas de sangre entera. La cuantificación de microARN de células del sistema inmune requiere la normalización a un patrón como un gen de mantenimiento. La cuantificación según se concibe en el presente documento contempla el uso de un patrón interno.

45 **[0094]** En una forma de realización del tema que se da a conocer en el presente documento, se da a conocer un método de diagnóstico de mujeres con trastornos reproductivos donde se interroga un único microARN que se sabe que se expresa diferencialmente en pacientes afectados por un trastorno reproductivo. El método implica el aislamiento de microARN de células inmunes aisladas de una muestra biológica y la identificación de un microARN que se sabe que se expresa de forma diferencial en pacientes con un trastorno reproductivo comprendido en dichas células y la comparación del microARN del sujeto con un microARN de control. Se diagnostica que el sujeto padece un trastorno reproductivo si el microARN está expresado diferencialmente.

50 **[0095]** En una forma de realización del tema que se da a conocer en el presente documento, se da a conocer un método de diagnóstico de mujeres con trastornos reproductivos donde se interroga una pluralidad de microARN que se sabe que se expresan diferencialmente en pacientes afectados por un trastorno reproductivo. El método comprende proporcionar un perfil de microARN concreto identificado con un trastorno reproductivo o un riesgo de padecer trastornos reproductivos. El método implica el aislamiento de microARN de dichas células y la identificación de un perfil de microARN comprendido en dichas células, y la comparación del perfil de microARN del sujeto con un perfil de microARN de control. Se diagnostica que el sujeto padece un trastorno reproductivo si se observa que dicho perfil de microARN está presente.

**[0096]** En una forma de realización del tema que se da a conocer en el presente documento, se da a conocer un método de diagnóstico de mujeres con trastornos reproductivos donde se seleccionan y se interrogan uno o más marcadores de microARN del grupo consistente en mir-155, mir-146a, mir-16-1, mir-16-2, let7a-1, let7a-2, let7a-

3, let7e, let7g, mir-132, mir-9, mir-142-3b, mir-17-92, mir-223 y mir-181a. El método comprende proporcionar un perfil de microARN concreto identificado con un trastorno reproductivo o un riesgo de padecer trastornos reproductivos. El método implica el aislamiento de microARN de dichas células y la identificación de un perfil de microARN comprendido en dichas células, y la comparación del perfil de microARN del sujeto con un perfil de microARN de control. Se diagnostica que el sujeto padece un trastorno reproductivo si se observa que dicho perfil de microARN está presente.

**[0097]** En otra forma de realización del tema que se da a conocer en el presente documento, se da a conocer un método para evaluar la eficacia del tratamiento y/o la evolución de un trastorno reproductivo. El proceso comprende proporcionar una pluralidad de muestras biológicas durante un período de tiempo donde dicha muestra comprende células del sistema inmune, la separación de dichas células y el aislamiento de microARN de dichas células y la cuantificación del tipo y cantidad de varios microARN comprendidos en dichas células, y la comparación de este perfil de microARN con uno o más perfiles de microARN de control con el objetivo de determinar la expresión diferencial de los perfiles, mediante lo cual se permite la evaluación del progreso de la enfermedad o la eficacia de la terapia.

**[0098]** Los sujetos pueden ser humanos u otros animales. "Trastornos reproductivos" comprende uno o más trastornos seleccionados de entre un grupo ejemplificado pero no limitado a ruptura prematura de membranas, preeclampsia, parto prematuro, restricción del crecimiento intrauterino, y pérdida recurrente del embarazo y síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.

**[0099]** La disfunción inmunitaria incluye trastornos inmunológicos provocados por mecanismos inmunológicos anormales, ya sean humorales, mediados por células, o ambos y/o está relacionado con un mecanismo de carácter inmunológico como una enfermedad de carácter inflamatorio, de complemento o de coagulación.

**[0100]** La disfunción inmunitaria puede aumentar el riesgo de dar a luz a hijos que posteriormente puedan desarrollar enfermedades como, por ejemplo, asma, autismo, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), síndrome de Tourette, diabetes y esquizofrenia, donde dicha disfunción inmunitaria se incluye en el concepto de trastornos reproductivos y/o inmunológicos. La invención también contempla períodos de periembarazo que comprenden alrededor de un año antes y después del embarazo. No obstante, en el alcance de la invención se incluye el período de tiempo implicado en la ovogénesis. Este período puede ser superior a un año antes del embarazo. Como se indica en Winger y Reed, el periodo anterior al embarazo puede constituir un estado inmunológico adverso con respecto al resultado del embarazo (Winger EE, Reed JL, Ashoush S, Sapna A, El-Toukhy T, Taranissi M: "Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin (IVIG) improves pregnancy rates in women undergoing IVF". American Journal of Reproductive Immunology, 2009; 61:113-120). De la misma forma, el período que sigue al embarazo puede verse afectado, por ejemplo, con enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, un trastorno conocido por exacerbar tras el embarazo. Se procesa una muestra biológica que comprende células del sistema inmune de un sujeto que se sospecha que puede padecer un trastorno reproductivo, donde dichas células se aíslan mediante varios medios conocidos por los expertos en la materia. En una forma de realización preferida, la muestra biológica es sangre entera. En una forma de realización más preferida, las células sanguíneas se aíslan por centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-hypaque) según el método que muestra Boyum (Boyum A 1983. Isolation of human blood monocytes with Nycodenz, a new non-ionic iodinated gradient medium. Scand J Immunol 17: 429-436). El ARN se extra empleando un procedimiento adecuado para extraer secuencias de ARN cortas. Preferentemente, dicho método utiliza un equipo optimizado de recuperación de secuencias de microARN, como el mirNeasy Mini Kit Qiagen del catálogo 217004 siguiendo las instrucciones proporcionadas. La cuantificación de microARN puede determinarse mediante varias técnicas conocidas por los expertos en la materia. En una forma de realización preferida, se cuantifican microARN concretos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real. En una forma de realización más preferida, un equipo suministrado por SABiosciences proporciona reactivos y métodos para microARN concretos que se sabe que están implicados en afecciones inmunopatológicas para optimizar dicha cuantificación en un termociclador concreto a tiempo a real, como el Stratagene Mx3005p (catálogo MAH-104A) ([www.SABiosciences.com](http://www.SABiosciences.com)). El fabricante proporciona instrucciones de uso del Stratagene Mx3005p, que comprenden instrucciones para la cuantificación espectrofotométrica de ARN recuperado, recomendaciones sobre la cantidad de ARN que ha de emplearse y la mezcla maestra de PCR. La cuantificación puede llevarse a cabo simultáneamente con la cuantificación de un "gen de mantenimiento" (un gen que se expresa de forma relativamente constante en las células interrogadas, manteniendo así una cuantificación relativa). Los genes de mantenimiento pueden seleccionarse de entre, por ejemplo, beta actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), anexina A2 (ANXA2), glutatión-S-transferasa (GST), ornitina descarboxilasa (ODC), hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT1), ubiquitina (UBQ) o ARN 18s. La proporción resultante comprende una cantidad relativa que es independiente de la cantidad de aporte de ARN en el sistema de ensayo. Esto permite la comparación con una muestra de control cuantificada de forma similar como una proporción de la señal del analito y el gen de mantenimiento seleccionado.

**[0101]** MicroARN de interés que se sabe que participan en afecciones inmunopatológicas comprenden pero no se limitan a mir146a, 1 mir-46b, mir-155, mir-605, mir-623, mir-583, mir-26a, mir-519d, 1 mir-26, 1 mir-6, 3 mir-69-3, Let-7a and 125b mir-126, mir-155, mir-21, Let-7a, let-7c, let-7d, let-7e, let-7g, mir- 214, mir- 409-3p, mir-

451, mir-103, mir-105, mir-106a, mir-125a-5p, mir-125b, mir-126, mir-128, mir-130a, mir-132, mir-134, mir-135a, mir-135b, mir-138, mir-142-3p, mir-142-5p, mir-143, mir-145, mir-147, mir-148a, mir-149, mir-150, mir-15a, mir-15b, mir-16, mir-181a, mir-183, mir-184, mir-185, mir-187, mir-18a, mir-191, mir-195, mir-196a, mir-198, mir-19a, mir-19b, mir-200a, mir-203, mir-205, mir-206, mir-20a, mir-20b, mir-21, mir-214, mir-223, mir-23b, mir-26a, mir-26a, mir-26b, mir-27a, mir-27b, mir-298, mir-299-3p, mir-29b, mir-29c, mir-302a, mir-302c, mir-30b, mir-30c, mir-30e, mir-31, mir-325, mir-335, mir-34a, mir-369-3, mir-370, mir-379, mir-383, mir-409-3p, mir-46b, mir-493, mir-519d, mir-574-3p, mir-577, mir-583, mir-605, mir-623, mir-9, mir-98, mir-99b.

**[0102]** En una forma de realización preferida, se utilizan uno o más microARN conocidos por expresarse diferencialmente de valores de la muestra de control. También preferentemente, se identifica una pluralidad de microARN que establece un patrón o firma de microARN expresados diferencialmente. La determinación de dichos microARN individuales o de la pluralidad de los mismos puede realizarse mediante la cuantificación de niveles de microARN en ambos pacientes que padecen trastornos reproductivos o están en riesgo de padecer trastornos reproductivos en paneles de microARN y la comparación de microARN determinado a partir de muestras biológicas de niveles de pacientes con aquellos derivados de muestras de control.

**[0103]** En una forma de realización preferida, las muestras de pacientes se separan en grupos. Los grupos pueden estar definidos por su perfil clínico o por otros medios. En un medio alternativo, por ejemplo que se utiliza en el presente documento, uno o más microARN tienen niveles distinguibles entre los pacientes o pueden responder a una intervención inmunoterapéutica de diferentes formas. Por ejemplo, y como se emplea en el presente documento, los grupos pueden distinguirse mediante su respuesta a terapia con IgIV, por su respuesta distinta a mir-132. En base a su respuesta a la respuesta distinta de mir-132 a la IgIV, pueden dividirse en dos grupos ("A" y "B"). Posteriormente, puede llevarse a cabo interrogación de muestras para sus respuestas de microARN diferenciales ante intervención inmunoterapéutica. Estos métodos pueden utilizarse para definir los patrones de respuesta de microARN entre grupos establecidos según los medios anteriormente expuestos.

**[0104]** La invención puede emplearse para sugerir la idoneidad de sujetos con trastornos reproductivos y/o inmunológicos para someterse a inmunoterapias que pueden mitigar dichos trastornos, y también puede utilizarse para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar dichos trastornos. Asimismo, la invención puede utilizarse para monitorizar el progreso del tratamiento de la enfermedad o para monitorizar la reducción del riesgo de padecer la enfermedad mediante una serie de ensayos y comparando los resultados. Pueden llevarse a cabo estudios en serie antes, durante y después del embarazo, así como durante el transcurso de la terapia, y compararse para determinar el éxito y la idoneidad de la terapia realizada.

**[0105]** La cuantificación de microARN de PBMC permite al investigador o al clínico comparar el resultado de un control apropiado donde se identifica una diferencia en la expresión. Por ejemplo, donde un microARN como mir-155 en un paciente con un trastorno reproductivo o con riesgo de padecer dicho trastorno, como aborto recurrente, se expresa diferencialmente con respecto a un control comprendido por individuos que no han experimentado aborto recurrente, puede diagnosticarse que el paciente padece un trastorno reproductivo y que el paciente es candidato para someterse a intervención inmunológica, como con un inhibidor de TNF alfa. Los pacientes diagnosticados de esta forma pueden tratarse de la manera descrita para pacientes que se determina que padecen trastornos similares por Winger y Reed (Edward E. Winger, Jane L. Reed, Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Intravenous Immunoglobulin Improves Live Birth Rates in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, 60(1), 8 - 16, Publicado en línea: 28 Jun 2008, Edward E. Winger, Jane L. Reed, Sherif Ashoush, Sapna Ahuja, Tarek El-Toukhy, Mohamed Taranissi, Treatment with Adalimumab (Humira) and Intravenous Immunoglobulin Improves Pregnancy Rates in Women Undergoing IVF, American Journal of Reproductive Immunology 61 (2009) 113-120).

**[0106]** En algunas formas de realización, las células de las que se extrae el ARN serán PBMC, mientras que en otras células serán células inmunes provenientes de tejidos corporales, como tejidos de endometrio, de decidua, fetales y de placenta, y de órganos linfoides secundarios, como de ganglio linfático. Posteriormente, se pueden seleccionar células mononucleares mediante diversas técnicas, por ejemplo mediante análisis de citometría de flujo tras el etiquetado de las células con marcadores como anticuerpos monoclonales que permiten su separación en subtipos de células inmunes. Por ejemplo, las células T reguladores se pueden seleccionar tras su etiquetado mediante anticuerpos monoclonales como CD4, CD 127 y CD25 (con o sin adición de CD3), de acuerdo con Betcon Dickinson Co. (empleando reactivos y equipo de la compañía de acuerdo con <http://www.bdbiosciences.com/research/tcell/regulatorycells/workflow/identifyingtregs.jsp>, descargado el 25/04/10). Puede extraerse ARN de células aisladas seleccionadas por estos medios y puede prepararse mediante extracción siguiendo las instrucciones del fabricante (catálogo Qiagen 763134). Se puede identificar y cuantificar microARN, como mir-155, mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) mediante el método descrito por Chen *et al.* ([http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_040548.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040548.pdf), descargado el 11/05/10). Se pueden seleccionar iniciadores y reactivos para microARN concretos de entre los indicados en la descripción del producto ([http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_068884.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_068884.pdf), descargado el 11/05/10). Este documento ofrece información acerca de la detección y cuantificación de microARN concretos.

**[0107]** El método comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto con historial de trastorno reproductivo y/o inmunológico o con riesgo de padecer dicho trastorno, proviniendo dicha muestra de células inmunes, por ejemplo, proveniente de sangre periférica, y posteriormente aislar células mononucleares según expone Boyum (Boyum A 1983. Isolation of human blood monocytes with Nycodenz, a new non-ionic iodinated gradient medium. Scand J Immunol 17: 429-436), y determinar la cantidad de ARN no codificado, como preferentemente microARN (microARN) para comparar la cantidad de ARN correspondiente en la muestra con muestra biológica tratada de forma similar de individuos de control. Además, el método puede comprender la cuantificación de una pluralidad de microARN concretos de la muestra biológica y la cuantificación de los microARN concretos para comparar la cantidad de microARN con los niveles de control de microARN correspondientes. Se diagnostica entonces que el sujeto padece un trastorno si existe expresión diferencial en la cantidad de uno o más ARNs de la muestra comparada con los niveles de control de ARN correspondientes. En algunas formas de realización, el método comprende además la selección de un tratamiento o la modificación de un tratamiento en base a la cantidad del uno o varios ARNs determinados. Esta decisión puede estar basada en la evaluación de microARN concretos o combinaciones de microARN concretos.

**[0108]** En otras formas de realización del asunto que se da a conocer en el presente documento, se proporciona un método para evaluar la eficacia del tratamiento y/o el progreso de un paciente con un trastorno reproductivo y/o inmunológico y/o con riesgo de desarrollar un trastorno reproductivo. En algunas formas de realización, el método comprende proporcionar una serie de muestras biológicas de un sujeto durante un período de tiempo, aislar el ARN que comprende ARNs de la serie de muestras biológicas según se ha indicado anteriormente, determinar la cantidad de uno o más de los microARN en cada una de las muestras biológicas de la serie y determinar cualquier cambio medible en las cantidad del uno o más microARN en cada muestra biológica de la serie, permitiendo una medición de la eficacia del tratamiento y/o del progreso del trastorno reproductivo o del riesgo de padecer un trastorno reproductivo en el sujeto.

**[0109]** En otras formas de realización del asunto que se da a conocer en el presente documento, se proporciona un método de caracterización de un trastorno reproductivo en un sujeto. En algunas formas de realización, el método comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto, aislar el ARN que comprende microARN de la muestra biológica, determinar una cantidad de uno o más de los ARNs y comparar la cantidad de uno o más microARN con los niveles de control de microARN correspondientes. El trastorno reproductivo se caracteriza entonces en base a la expresión diferencial de la cantidad del uno o más microARN de la muestra en comparación con los niveles de control del uno o varios microARN. En algunas formas de realización, el trastorno reproductivo se caracteriza al comparar con individuos caracterizados de forma correcta que se sabe que padecen trastornos reproductivos.

**[0110]** En algunos de estos métodos, la cuantificación de microARN comprende la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. SABiosciences proporciona reactivos y métodos para microARN concretos que se sabe que están implicados en afecciones inmunopatológicas humanas para dicha cuantificación optimizada en un termociclador concreto en tiempo real, como el Stratagene Mx3005p (catálogo MAH-104A) ([www.SABiosciences.com](http://www.SABiosciences.com)). La cuantificación puede llevarse a cabo de forma simultánea con la cuantificación de un "gen de mantenimiento" (un gen que se expresa de forma relativamente constante en el material celular interrogado y que permite la estandarización). Además, en algunas formas de realización de estos métodos, los mirARNs son uno o más microARN, entre los que se incluyen, sin limitación, microARN cuantificados.

**[0111]** Se ha demostrado que los microARN, sus regiones de flanco en pre-miARN o en dianas afectan a los procesos fisiológicos y patológicos. Polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) tanto en microARN como en sus regiones de flanco y en ARNs diana pueden alterar la especificidad derivando en la pérdida o la reducción de efecto entre especies silvestres y sus equivalentes que comprenden SNP. Además, dichos polimorfismos pueden generar nuevas interacciones con los ARNs diana (Gong J, Tong Y, Zhang HM, Wang K, Hu T, Shan G, Sun J, Guo AY, Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis Human Mutation (2012) 33(1):254-63. doi: 10.1002/humu.21641. Epub 23 de Nov de 2011). Estos polimorfismos pueden resultar en una eficiencia alterada de la regulación de microARN de ARNs diana (Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-mir-146a decreases mature mir-expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:7269-74.) Por otra parte, los polimorfismos pueden afectar potencialmente a la regulación mediada por microARN de la célula que puede estar presente en el 3'-UTR de un gen diana de microARN. También pueden existir otros polimorfismos en los genes implicados en la biogénesis de microARN, así como en las secuencias de pri-microARN, pre-microARN y microARN maduro. Las consecuencias de dichos polimorfismos en microARN procesados pueden tener importantes efectos en la expresión de múltiples genes diana y derivar en graves consecuencias, mientras que un polimorfismo en una diana de microARN, en el 3'-UTR del ARNm diana, puede ser más específico de la diana y/o vía (Prasun J Mishra y Joseph R Bertino, MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine, Pharmacogenomics. 2009 March; 10(3): 399-416. doi: 10.2217/14622416.10.3.399).

**[0112]** La detección de dichos polimorfismos mediante técnicas tales como la discriminación alélica en tiempo real, por ejemplo, también se encuentra en el alcance de la presente invención. Se pueden encontrar métodos para ello en el manual de instrucciones de Mx3000P ([www.bio.davidson.edu/courses/Bio343/Mx3000P\\_Manual.pdf](http://www.bio.davidson.edu/courses/Bio343/Mx3000P_Manual.pdf), descargado el 24/10/10). Se ha catalogado el reconocimiento de interacciones alélicas con dianas de tipo silvestre y con dianas que comprenden SNP. Véase, por ejemplo, <http://www.bioguo.org/miRNASNP/index.php> (descargado el 21/10/2012). La invención es particularmente adecuada para su uso en medicina personalizada. La caracterización y cuantificación de ácidos nucleicos se utilizan para evaluar la probabilidad de éxito de una intervención terapéutica particular. El objetivo de la medicina personalizada es identificar pacientes con probabilidad o, en cambio, con poca probabilidad de respuesta ante la terapia candidata. El coste, efectos secundarios y la respuesta terapéutica mejorada son razones aceptadas para llevar a cabo pruebas de ácidos nucleicos como medio de selección de terapias y para seguir el desarrollo de la terapia. La cuantificación de microARN no sólo podría ser útil para identificar pacientes que padecen trastornos reproductivos, sino que también puede ser de ayuda para seleccionar y dirigir elecciones terapéuticas, así como para monitorizar sus efectos en una variedad casi ilimitada de trastornos.

**[0113]** La capacidad para separar pacientes en dos o más grupos según las características de sus respuestas ante una intervención como por ejemplo una inmunoterapia con IgIV, permite predecir más específicamente la respuesta terapéutica ante otras intervenciones. Otro aspecto de dicha separación es el pronóstico y la exposición a otros trastornos, por ejemplo enfermedades autoinmunes. Si se identificara un microARN cuyo patrón de respuesta entre la cohorte de pacientes fuera bimodal, los pacientes podrían agruparse en dichos grupos de acuerdo con su respuesta.

**[0114]** La invención comprende la extracción de células inmunes, preferentemente PBMC, antes y después de una intervención, preferentemente inmunoterapéutica, por ejemplo IgIV, la extracción de ARN que comprende microARN de dichas células, la cuantificación de microARN en el ARN extraído y la determinación de si uno o más microARN cuantificados muestran una respuesta bimodal entre una cantidad de muestras de pacientes estadísticamente suficiente. Si se muestra un patrón de respuesta bimodal en uno o más microARN, entonces los pacientes pueden separarse en grupos según su respuesta.

**[0115]** Una "respuesta", según se utiliza en el presente documento, se define como la diferencia entre un resultado en una primera muestra y en una segunda muestra donde existe una intervención que interviene o un efecto que interviene de una intervención realizada con anterioridad. Puede ser un aumento, un descenso o una ausencia de cambio. El término "bimodal" o "bimodalidad", según se utiliza en el presente documento, se refiere a la distribución anormal de respuestas donde dos métodos distintos caracterizan los datos. Los datos pueden mostrarse de forma gráfica en un histograma y la bimodalidad se puede evaluar mediante control. Se han desarrollado métodos estadísticos para distinguir la bimodalidad. Una primera fase es el reconocimiento de agrupaciones de resultados en dos poblaciones. Mientras que el reconocimiento del punto de separación entre dos poblaciones se suele llevar a cabo mediante inspección visual de histogramas de datos, los métodos estadísticos los pueden aplicar los expertos en la materia estadística. Se calcula la media y la desviación típica de dos agrupaciones (*clusters*). En una definición preferida de bimodalidad, se considera que los datos son bimodales si las medias de las dos agrupaciones son iguales o están alejadas de la suma de las desviaciones típicas de las dos agrupaciones (Schilling, Watkins and Watkins, "Is Human Height Bimodal?", *The American Statistician* (2002), 56(3): 223-229).

**[0116]** Las poblaciones se consideran dicótomas con respecto a las respuestas de microARN si se puede demostrar una distribución bimodal en respuestas de la cohorte de prueba para uno o más microARN. Como se comprenderá, no todas las cohortes de pacientes son dicótomas con respecto a su respuesta ante respuestas de microARN concretos tras cualquier intervención realizada. Si se descubre una respuesta bimodal en uno o más microARN, las poblaciones de pacientes se consideran dicótomas.

**[0117]** En una forma de realización preferida, un experto en la materia que emplea una matriz de microARN humano de Agilent Technologies (por ejemplo del catálogo G4471A-029297 y siguiendo las instrucciones del fabricante) cuantifica todos los microARN conocidos en muestras de ARN extraídas de PBMC de acuerdo con las instrucciones del fabricante de micromatriz. La sangre extraída se introduce en tubos heparinizados y se mantiene a temperatura ambiente preferentemente durante aproximadamente 24 horas con anterioridad al aislamiento de PBMC. Muestreo y extracción de ARN: se extrajeron poblaciones de PBMC o de células elegidas ( $< 1 \times 10^7$  células viables) en 1 ml de TRIzol (Invitrogen) y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. El ARN total se aisló de acuerdo con el protocolo TRIzol (Invitrogen) o con RNeasy Mini Kit (Qiagen). Para emplear el RNeasy Mini Kit, todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente con el robot automatizado QIAcube (Qiagen). Se analizó el rendimiento de ARN total empleando el espectrofotómetro de microvolumen Thermo Scientific NanoDrop 1000 (absorbancia a 260 nm y ratio de 260/280 y 260/230). La integridad de ARN se evaluó utilizando el instrumento Bioanalyzer NANO Lab-on-Chip de Agilent. Se procesó con micromatriz de microARN. Los datos de micromatriz de microARN se normalizaron empleando el GeneSpring GX v11.5.1 de Agilent (ver link: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products-Services/Software-Informatics/GeneSpring-GX/pages/default.aspx>, descargado el 07/10/2012). El análisis de las muestras se lleva a cabo preferentemente de una a tres semanas o menos antes y de una a tres semanas o menos después de una intervención

terapéutica. En una forma de realización preferida, se selecciona un número de pacientes estadísticamente significativo que presentan características demográficas y clínicas similares, como edad, sexo y estado clínico, por ejemplo pérdida recurrente de embarazo. El objetivo del análisis de estos datos es segregar a pacientes en dos o más grupos. En una forma de realización más preferida, el objetivo es dicotomizar pacientes en dos grupos, cada uno presentando un perfil de microARN único.

**[0118]** Existen diversos métodos adecuados para determinar perfiles de microARN únicos que definen cada grupo. En una primera etapa, se calculan las diferencias entre cada microARN muestreado antes de la terapia y tras la terapia. Se calculan las medias y desviaciones típicas de cada una de las diferencias entre los diversos subgrupos de muestras “antes y después”, y se clasifican los microARN en orden de importancia estadística. Se seleccionan los subgrupos con microARN que presentan la mayor diferencia estadísticamente significativa en la media y desviación típica (prueba t-Student del *software* Graphpad). Se identifica mediante inspección un microARN en el que los resultados están distribuidos de forma dicótoma. Los resultados de pacientes se clasifican entonces en dos grupos según determine el grupo en el que se clasifique el microARN seleccionado.

**[0119]** Según se expone a continuación, se muestra una respuesta de hsa-mir-132 bimodal en una cohorte de diecisiete pacientes. Las muestras de ARN de antes y después de pacientes de cada una de las dos cohortes definidas por la distribución bimodal de hsa-mir-132 fueron posteriormente analizadas en una micromatriz de todos los microARN humanos “conocidos” o presumibles. Así, se identifica que hsa-mir-132 cumple el criterio indicado anteriormente.

**[0120]** Se seleccionaron diecisiete pacientes femeninas (edad media de 35,8±4,8 años) del centro Alan E. Beer de aborto espontáneo recurrente e infertilidad que están siendo tratadas con inmunoglobulina intravenosa (IgIV) (media de 1,5±1,8 abortos anteriores; 1,6±1,5 fracasos de FIV anteriores). Cada paciente había firmado un consentimiento que permitía el uso de su sangre para fines de investigación. Cada paciente seleccionada para el estudio se sometió a extracción de sangre en una media de 13,2±6,0 días con anterioridad a la terapia con IgIV y en una media de 11,8±5,6 días tras la terapia con IgIV (una media de 25,1±7,9 días entre extracciones de sangre de microARN). La extracción de sangre formaba parte de los estudios sanguíneos rutinarios llevados a cabo en pacientes. Se aislaron PBMC de sangre heparinizada que había sido extraída de veinticuatro a cuarenta y ocho horas antes y que se había mantenido a temperatura ambiente mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Se conservaron aproximadamente 10x10<sup>6</sup> células en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso. La Tabla 1 resume las características de las pacientes.

Tabla 1

Parámetros de población	Media±DT
Edad (años)	35,8±4,8
#abortos espontáneos anteriores	1,5±1,8
#fracasos de FIV anteriores	1,6±1,5
#días antes de la terapia con IgIV (Muestra 1)	13,2±6,0
#días tras la terapia con IgIV (muestra 2)	11,8±5,6
#días entre Muestra 1 y 2	25,1±7,9

**[0121]** Se interrogó entonces a las PBMC de las diecisiete pacientes en busca de mir-16, mir-132, mir-146a, mir-155, mir-181a, mir-196a y mir-223 empleando como gen de mantenimiento a RNU48 para fines de normalización en ARN transcrito inverso mediante PCR en tiempo real. Cada paciente había sido tratada con terapia con inmunoglobulina intravenosa (IgIV), la sangre había sido extraída antes y después de la terapia y los microARN se habían cuantificado en cada muestra. Se seleccionaron microARN candidatos a partir de la revisión de estudios. Los microARN se seleccionaron en base a estudios de trastornos autoinmunes/inflamatorios (lupus y artritis reumatoide en PBMC). Se seleccionaron mir-16, mir-132, mir146a mir-155, mir-181a, mir-196a y mir-223 en base a la información ofrecida por los siguientes artículos: (1) Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated mir-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R101.; (2) Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, Xu ZM, Yin YB. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2007;16(12):939-46.; (3) Fehniger TA, Wylie T, Germino E, Leong JW, Magrini VJ, Koul S, Keppel CR, Schneider SE, Koboldt DC, Sullivan RP, Heinz ME, Crosby SD, Nagarajan R, Ramsingh G, Link DC, Ley TJ, Mardis ER. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res.* Nov 2010;20(11):1590-604.

**[0122]** Las muestras de sangre se extraen en tubos con EDTA y las PBMC se aíslan mediante centrifugación en gradiente de densidad habitual de Ficoll de acuerdo con el procedimiento conocido por los expertos en la

materia. De forma alternativa, puede emplearse el procedimiento con tubos Accuspin de Signa-Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante (procedimiento no AST-1). Las PBMC se lavan una vez en un tampón fosfato salino estéril (PBS, por sus siglas en inglés) antes del aislamiento de ARN. El ARN total se aísla de PBMC recién obtenidas utilizando el kit de aislamiento de microARN mir-Vana (Ambion, Austin, Texas (EE UU)) según el protocolo del fabricante. Las concentraciones de ARN se determinan mediante espectroscopia de absorción debido a que el máximo de absorción de ADN y ARN es de 260 nm. Se utilizan 10 ng de cada muestra de ARN para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La qRT-PCR de microARN se llevó a cabo mediante el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan, la mezcla maestra de PCR universal TaqMan y el MicroRNA Assay de TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California (EE UU)). Se utilizaron iniciadores de SABiosciences para los siguientes microARN humanos: mir-16 (MPH00062A), mir-132 (MPH01167A), mir-146a (MPH00047A), mir-155 (MPH00059A), mir-223 (MPH01231A), let-7a (MPH00001A). Se puede llevar a cabo una qRT-PCR de ARNm utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de TaqMan, la mezcla maestra de PCR rápida de TaqMan y los iniciadores de ensayo de ARNm de TaqMan (Applied Biosystems). Véase [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042167.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042167.pdf). Las reacciones se pueden analizar utilizando el sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems). Los niveles de microARN se normalizan, por ejemplo, en el ARN 18S. Se determinaron los valores del ciclo umbral (CT), correspondientes al número de ciclos de PCR en los que la emisión de fluorescencia alcanza un umbral por encima de la referencia de las emisiones, y la expresión relativa de microARN o ARNm se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Applied Biosystems, User Bulletin n.º 2).

[0123] Según los estudios, se podría esperar un cambio coordinado en microARN. Además, también podrían esperarse cambios en múltiples proporciones entre muestras. Por ejemplo, se podrían esperar cambios en mir-146a con respecto a la referencia de Pauley anteriormente expuesta. Podrían anticiparse también cambios en mir-16. No obstante, de forma inesperada, un único microARN, mir-132, se vio suprimido hasta aproximadamente 100 veces. La terapia con IgIV parece suprimir muy concretamente y muy marcadamente la expresión de mir-132. Asimismo, los valores iniciales variaron significativamente entre pacientes hasta aproximadamente 100 veces. La Tabla 2 muestra que entre las 17 pacientes en las que se llevaron a cabo estudios antes y después de la terapia, el tratamiento con IgIV resultó en una disminución estadísticamente significativa.

Tabla 2

Casos secuenciales de 17 pacientes	Media de niveles de CT en mir-132 (media±DT)
Antes de IgIV	22,8±4,7*
Después de IgIV	26,7±2,1*
Diferencia	+3,9±4,0
*p=0,004	

30

[0124] Como se ha explicado en el presente documento, el grupo de tratamiento puede dividirse en dos grupos en base al patrón de expresión de un microARN, mir-132, antes de la terapia con IgIV. El grupo A presentaba CTs (ciclo umbral) iniciales bajos, indicando niveles iniciales relativamente altos de hsa-mir-132. El resto de pacientes, el grupo B, presentaba CTs iniciales altos, indicando niveles bajos de hsa-mir-132. Tras el tratamiento con IgIV, ambos grupos convergieron en sus niveles de hsa-mir-132 a CTs altos, indicando una disminución significativa de los niveles de mir-132. Los cambios fueron considerablemente mayores en el grupo A que en el grupo B. Parece que la IgIV ha sido muy efectiva en la disminución de mir-132 en el grupo que presentaba los niveles más altos de mir-132 antes del tratamiento.

35

[0125] Aunque ambos grupos respondieron estadísticamente al tratamiento con IgIV, la Tabla 3 dicotomiza pacientes según su CT inicial de hsa-mir-132. Se puede observar que los CTs iniciales se agrupan en aquellos que presentaban CTs relativamente bajos (altas concentraciones de hsa-mir-132) y aquellos que presentaban CTs relativamente altos (bajos niveles de hsa-mir-132). Tras la terapia con IgIV, ambos grupos convergen de forma que el cambio en CT en el grupo con CT bajo es significativamente superior que el del grupo con CT alto. Por consiguiente, una forma de realización de la invención es la separación de los pacientes en dos grupos distintos (dicotomización) en base a la expresión de microARN.

45

Tabla 3

	Grupo con bajo mir-132: 6 casos (Muestra 1 >21,0)	Grupo con alto mir-132: 11 casos (Muestra 1 <19,0)
Valor inicial medio de mir-132 (Muestra 1)	17,1±0,8	25,9±2,2
Valor inicial medio de mir-132 (Muestra 2)	25,7±1,2	27,4±2,2
Media del cambio en microARN	+8,5±1,2**	+1,5±2,4**
**p<0,0001		

**[0126]** Los resultados se representan en las Fig. 1 y 2, que muestran los niveles de CT de los pacientes antes y después del tratamiento con IgIV, para los grupos A y B respectivamente. Como se muestra en la Fig. 1, antes del tratamiento con IgIV, el grupo A presentaba niveles de CT de 16-18 y presentaba niveles de 24-27 tras el tratamiento. Por otro lado, la Fig. 2 muestra que el grupo 2 presentaba niveles de 21-29 antes del tratamiento y niveles de 23-30 tras el tratamiento.

**[0127]** Aquellas pacientes con niveles iniciales muy bajos presentaron grados de supresión de modestos a muy pequeños. Tras la terapia con IgIV, los valores de mir-132 de ambos grupos de pacientes parecieron converger relativamente en el mismo nivel de actividad de microARN baja (o de CT alto) (valor de CT entre 23-28). Parece que el efecto de IgIV en la expresión de mir-132 se reserva en gran medida a aquellos pacientes con relativamente grandes cantidades iniciales de mir-132 (pacientes con niveles de CT bajos). Esta población presenta un rango de CT de mir-132 inicial entre 16-18. Así, la terapia con IgIV es más efectiva en la supresión de mir-132 en el grupo de pacientes con los niveles de mir-132 más altos antes del tratamiento.

**[0128]** Mediante el empleo de hsa-mir-132 para identificar pacientes que pertenecen a dos grupos discretos como se ha descrito anteriormente, se evaluaron entonces cuatro pacientes de cada uno de los grupos A y B con una micromatriz Agilent que comprende todos los microARN humanos conocidos (aproximadamente 900 microARN).

**[0129]** Se analizaron los datos de cada uno de los dos grupos de forma separada y se clasificó cada grupo en función de las diferencias de la media entre la primera y la segunda cuantificación del microARN concreto de cada grupo de forma separada, y se listaron en orden decreciente de las diferencias. De dichas listas, las diferencias que aumentaron más en un primer grupo se comparan con las que disminuyeron más en un segundo grupo. En cambio, las que disminuyeron más en un primer grupo se comparan con las que aumentaron más en un segundo grupo. Los microARN concretos que presentan las mayores diferencias entre las medias de las diferencias en cada grupo se consideran provisionalmente marcadores óptimos. El poder de estos microARN óptimos se analiza posteriormente mediante la suma de las desviaciones típicas de las medias de los respectivos grupos para confirmar su estatus como marcadores óptimos, donde el ratio de las diferencias se divide por la suma de las desviaciones típicas. Los marcadores óptimos presentan los ratios más altos. Por ejemplo, todos los microARN que se listan a continuación en las Tablas 4-6 presentan ratios con un valor absoluto superior o igual a uno. Más preferentemente, pueden seleccionarse los microARN que presentan un ratio con un valor absoluto superior o igual a dos.

**[0130]** Los datos de la Tabla 4 indican marcadores de microARN útiles que cumplen con los criterios anteriormente expuestos. En lo sucesivo, un valor se ve “disminuido” donde la diferencia observada entre un primer valor menos un segundo valor es negativa, e “incrementado” donde un primer valor menos un segundo valor da un resultado positivo.

Tabla 4

Marcadores de microARN seleccionados	Diferencia de medias tras IgIV en Grupo A	DT media en Grupo A	Diferencia de medias tras IgIV en Grupo B	DT media en Grupo B
hsa-mir-136	2,52122	1,497334	-5,43651	0,82098
hsa-mir-141	1,083703	0,288785	-4,77102	0,469596
hsa-mir-142-5p	1,041446	0,142776	-5,94462	0,44929
hsa-mir-144	0,335061	1,466308	-5,88934	1,274726

Marcadores de microARN seleccionados	Diferencia de medias tras IgIV en Grupo A	DT media en Grupo A	Diferencia de medias tras IgIV en Grupo B	DT media en Grupo B
hsa-mir-153	2,082454	0,849342	-7,84218	0,691729
hsa-mir-1537	1,301357	0,995047	-7,47155	1,143166
hsa-mir-193a-3p	0,952666	0,441789	-4,08226	0,877131
hsa-mir-219-5p	2,083515	1,609553	-6,60915	0,991381
hsa-mir-29b	1,068173	0,318097	-5,26843	0,506796
hsa-mir-301a	1,140525	0,150147	-4,74399	0,497264
hsa-mir-32	1,757013	0,663302	-6,60811	0,775835
hsa-mir-33a	2,208455	0,541141	-6,66695	0,528549
hsa-mir-545	1,955594	1,558846	-6,95672	0,388828
hsa-mir-582-3p	0,885343	0,493095	-5,63284	1,148245
hsa-mir-590-5p	1,195371	0,219509	-5,34069	0,410219
hsa-mir-1181	-1,82126	1,984385	4,492508	1,085892
hsa-mir-513a-5p	-0,90253	1,698756	8,720988	1,695736

5 **[0131]** Como se puede deducir del análisis de los microARN que se listan de cada uno de los dos grupos, se pueden realizar dos observaciones distintas. En primer lugar, los valores se movieron en dirección opuesta tras la terapia con IgIV en los dos grupos. Por ejemplo, hsa-mir-136 aumenta tras la IgIV, mientras que disminuye en el grupo B. En cambio, hsa-mir-513-5p disminuye en el grupo A mientras que aumenta en el grupo B. En segundo lugar, como un grupo único, las desviaciones típicas son bastante amplias, mientras que las desviaciones típicas en cada grupo, A o B, disminuyen notablemente. Estos hallazgos confirman el reconocimiento de dos grupos distintos de pacientes. Se puede asignar de forma estadística al paciente a uno de los dos grupos a partir de un único resultado de microARN para un paciente. Un experto en la materia puede 10 asignar a pacientes al grupo apropiado.

15 **[0132]** Se han identificado otras secuencias que pueden usarse de forma separada o combinadas para determinar que los miembros del grupo A o B se seleccionan en base a si muestran un comportamiento opuesto tras la IgIV. En la Tabla 5 se listan microARN comunes seleccionados de entre los 100 que más aumentan en el grupo A y los 100 que más disminuyen en el grupo B, mientras que en la Tabla 6 se listan microARN comunes seleccionados de entre los 100 que más disminuyen en el grupo A y los 100 que más aumentan en el grupo B.

Tabla 5

MicroARN	Diferencia de medias Grupo A	DT del grupo A	Diferencia de medias Grupo B	DT del grupo B
hsa-mir-1	1,270745	1,003145	-3,44195	2,957159
hsa-mir-101	0,698965	0,235172	-4,10335	0,423924
hsa-mir-1183	0,332102	2,511271	-7,18912	2,240812
hsa-mir-1249	0,511253	0,559915	-2,90416	0,69329
hsa-mir-136	2,52122	1,497334	-5,43651	0,82098
hsa-mir-140-5p	0,419807	0,265255	-2,03009	0,349193
hsa-mir-141	1,083703	0,288785	-4,77102	0,469596
hsa-mir-142-3p	1,0677	0,202879	-3,59343	0,583092
hsa-mir-142-5p	1,041446	0,142776	-5,94462	0,44929
hsa-mir-144	0,335061	1,466308	-5,88934	1,274726
hsa-mir-153	2,082454	0,849342	-7,84218	0,691729

ES 2 666 282 T3

MicroARN	Diferencia de medias Grupo A	DT del grupo A	Diferencia de medias Grupo B	DT del grupo B
hsa-mir-1537	1,301357	0,995047	-7,47155	1,143166
hsa-mir-15a	0,533715	0,100281	-2,8992	0,322076
hsa-mir-18a	0,382843	0,13646	-1,92863	0,464262
hsa-mir-18b	0,405855	0,187818	-2,19576	0,531698
hsa-mir-193a-3p	0,952666	0,441789	-4,08226	0,877131
hsa-mir-19a	0,872497	0,133295	-4,3393	0,511408
hsa-mir-19b	0,457604	0,158196	-2,57291	0,322324
hsa-mir-21	0,441811	0,278029	-2,1423	0,382552
hsa-mir-219-5p	2,083515	1,609553	-6,60915	0,991381
hsa-mir-27a	0,53133	0,25451	-2,12834	0,263011
hsa-mir-29b	1,068173	0,318097	-5,26843	0,506796
hsa-mir-29c	0,443375	0,117018	-2,75245	0,365226
hsa-mir-301a	1,140525	0,150147	-4,74399	0,497264
hsa-mir-301b	0,976275	0,357315	-3,26383	0,442348
hsa-mir-30e	0,59185	0,144703	-3,24738	0,251854
hsa-mir-32	1,757013	0,663302	-6,60811	0,775835
hsa-mir-324-5p	0,698976	0,359357	-1,87021	0,15051
hsa-mir-335	0,617394	0,711001	-2,4438	0,722963
hsa-mir-337-5p	1,10453	1,617308	-4,14723	2,179625
hsa-mir-338-3p	0,391677	0,0348	-3,00793	0,498721
hsa-mir-33a	2,208455	0,541141	-6,66695	0,528549
hsa-mir-340	0,830669	0,481914	-4,16497	0,300849
hsa-mir-362-3p	0,8536	0,294971	-3,28599	0,665745
hsa-mir-371-5p	0,971021	1,083568	-2,46387	1,359333
hsa-mir-376b	0,46162	1,952296	-6,23567	1,991346
hsa-mir-374a	0,363715	0,19741	-2,06665	0,272203
hsa-mir-377	0,873289	1,253133	-1,92671	1,06699
hsa-mir-421	0,824237	1,119436	-2,52667	0,979143
hsa-mir-424	0,676429	0,131418	-3,30699	0,509319
hsa-mir-542-3p	0,835738	0,202614	-5,38285	0,608003
hsa-mir-545	1,955594	1,558846	-6,95672	0,388828
hsa-mir-548c-5p	0,710325	0,382632	-1,977	0,399167
hsa-mir-551b	1,132591	0,828951	-2,30701	0,520072
hsa-mir-582-3p	0,885343	0,493095	-5,63284	1,148245
hsa-mir-590-5p	1,195371	0,219509	-5,34069	0,410219

Tabla 6

MicroARN	Diferencia de medias Grupo A	DT Grupo A	Diferencia de medias Grupo B	DT Grupo B
hsa-mir-100	-0,75803	1,061571	1,154144	0,766084
hsa-mir-1181	-1,82126	1,984385	4,492508	1,085892
hsa-mir-1227	-0,36135	0,981072	3,887691	0,570974
hsa-mir-1271	-0,49835	0,575051	1,251907	0,418329
hsa-mir-127-3p	-1,07828	1,295253	1,312743	0,450348
hsa-mir-1275	-0,47159	0,576344	0,968348	0,519534
hsa-mir-1300_v13.0	-1,27118	1,97	2,768853	0,297402
hsa-mir-1307	-0,41137	1,091938	5,269371	0,913262
hsa-mir-139-3p	-0,37258	0,494547	2,047472	0,768133
hsa-mir-181a-2*	-0,39928	0,430931	2,779431	0,677482
hsa-mir-182	-0,53534	0,745866	3,998238	0,721076
hsa-mir-191	-0,60784	0,657613	3,506353	0,577494
hsa-mir-224	-0,5147	1,993012	2,390506	1,670223
hsa-mir-300	-1,48121	1,881716	2,084424	1,659764
hsa-mir-339-5p	-1,7283	1,326469	1,405327	0,459023
hsa-mir-483-3p	-0,58871	2,243166	2,07591	0,843905
hsa-mir-486-5p	-1,20003	1,525774	1,160433	1,15879
hsa-mir-501-5p	-0,48667	1,118063	4,393115	0,758058
hsa-mir-513a-5p	-0,90253	1,698756	8,720988	1,695736
hsa-mir-564	-0,38684	0,709046	1,351019	0,832139
hsa-mir-602	-0,45617	0,664475	1,969851	0,830315
hsa-mir-630	-1,20769	3,331194	0,968519	2,660711
hsa-mir-647	-0,84299	1,117714	4,483333	1,436393
hsa-mir-770-5p	-0,57186	1,473769	1,18536	0,33416
hsa-mir-885-5p	-0,47354	3,442087	3,238278	1,381079
hsa-mir-892b	-0,48425	1,487033	2,127233	0,882215
hsa-mir-92b	-0,5896	0,830008	5,23262	0,53149

5 [0133] Se puede determinar la identificación de los grupos dicotomizados a partir de un único ensayo de microARN llevado a cabo. Como se puede apreciar por lo expuesto anteriormente, hsa-mir-132 separa de forma discreta los grupos A y B. Las secuencias adicionales tabuladas en la Tabla 6 proporcionan secuencias adicionales que pueden utilizarse para definir los dos grupos. Pueden utilizarse por separado o combinados. La naturaleza dicotómica de una población puede determinarse de entre una selección de microARN que muestran desviaciones típicas altas. Es posible que estos microARN comprendan una distribución bimodal de las medias de microARN. El análisis o la aplicación de pruebas estadísticas por un experto en la materia estadística puede constatar la bimodalidad.

15 [0134] Para comprobar la hipótesis de que se pueden dividir a pacientes en grupos dicotómicos donde se pueden identificar microARN concretos que responden de forma diferencial a una intervención terapéutica, se creó un grupo de simulación de los mismos pacientes donde los grupos dicotómicos muestran respuesta de microARN diferencial según se observa en las Tablas 4-6. En los ejemplos anteriores, los pacientes se asignaron al grupo A o B de acuerdo con la respuesta de hsa-mir-132 tras la terapia con IgIV. Cada grupo comprendía cuatro pacientes. En el experimento de simulación, se seleccionaron dos pacientes de forma arbitraria del grupo A y dos del grupo B para comprender un grupo de simulación C, mientras que el resto de los dos pacientes del

grupo A y el resto de los dos pacientes del grupo B comprenden un grupo de simulación D. Se calcularon las diferencias en las medias y las desviaciones típicas antes y después de la terapia y se mostraron como las 30 que más aumentan tras la terapia y las 30 que más disminuyen, según se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

MicroARN	$\Delta$ Media Grupo C	DT	MicroARN	$\Delta$ Media Grupo D	DT
hsa-miR-24-1 *	1,139664	1,751306	hsa-miR-34b*	-0,495378	0,661462
hsa-miR-513b	1,10647	1,745331	hsa-miR-1207-5p	-0,499623	0,345578
hsa-miR-513a-5p	1,081663	2,387287	hsa-miR-1274a	-0,507595	0,863872
hsa-miR-513c	1,006773	1,331825	hsa-miR-1280	-0,516564	0,713269
hsa-miR-345	0,873768	1,69969	hsa-miR-28-3p	-0,525916	0,890524
hsa-miR-892b	0,823898	0,561379	hsa-miR-181a*	-0,526303	0,449876
hsa-miR-1826_v15.0	0,753516	0,90899	hsa-miR-1226*	-0,537768	0,995808
hsa-miR-501-5p	0,721953	1,183809	hsa-miR-582-5p	-0,538055	0,930185
hsa-miR-760	0,720185	1,313588	hsa-miR-500a	-0,539322	0,799103
hsa-miR-92b	0,719088	0,986911	hsa-miR-133a	-0,553997	1,031349
hsa-miR-23a*	0,711232	0,624211	hsa-miR-720	-0,570416	0,810315
hsa-miR-607	0,694857	0,669177	hsa-miR-1260	-0,575785	0,947614
hsa-miR-338-5p	0,694838	0,66914	hsa-miR-135a*	-0,577329	1,032842
hsa-miR-665	0,657335	0,594854	hsa-miR-92a-1*	-0,595985	0,496119
hsa-miR-576-3p	0,640433	0,562254	hsa-miR-1202	-0,62187	0,826414
hsa-miR-574-3p	0,636028	1,161566	hsa-miR-194*	-0,632359	1,510496
miRNABrightCorner30	0,619267	0,43915	hsa-miR-629*	-0,635601	1,061238
hsa-miR-494	0,574397	0,384558	hsa-miR-26b*	-0,66143	0,511278
hsa-miR-1288	0,572928	0,526309	hsa-miR-192*	-0,672978	1,370112
hsa-miR-378	0,508068	0,394278	hsa-miR-630	-0,679997	2,042544
hsa-miR-139-3p	0,463569	0,641463	hsa-miR-183	-0,687276	2,202468
hsa-let-7a*	0,448805	0,297109	hsa-miR-373*	-0,707562	1,093235
hsa-let-7c*	0,448805	0,297109	hsa-miR-1181	-0,727918	2,188832
hsa-let-7e*	0,448805	0,297109	hsa-miR-557	-0,759721	0,679964
hsa-let-7f-2*	0,448805	0,297109	hsa-miR-134	-0,761638	0,814211
hsa-let-7g*	0,448805	0,297109	hsa-miR-892b	-0,78585	0,907683
hsa-miR-100*	0,448805	0,297109	hsa-miR-18b*	-0,803171	1,135087
hsa-miR-103-as	0,448805	0,297109	hsa-miR-188-5p	-0,885158	1,808363
hsa-miR-105	0,448805	0,297109	hsa-miR-760	-0,901819	1,305335
hsa-miR-105*	0,448805	0,297109	hsa-miR-150*	-0,93806	0,866707

5

[0135] Las diferencias en las medias entre los dos grupos de simulación no eran solo relativamente pequeñas, sino que las desviaciones típicas eran suficientemente elevadas como para que no se identificara ningún microARN que pudiera considerarse bimodal. En otras palabras, el valor absoluto de las diferencias de las medias dividido por la suma de las desviaciones típicas era menor de uno para cada microARN utilizando este grupo aleatorio. Por lo tanto, una “dictomización” aleatoria no identifica grupos separados de pacientes según se describe en la presente exposición.

10

5 [0136] Para predecir la asignación de pacientes a un grupo de respuesta, en una muestra adquirida antes y después de una intervención, se clasifican microARN según la diferencia máxima entre niveles de microARN entre los dos grupos descritos anteriormente. El poder de estos microARN como marcadores se analiza posteriormente mediante el ratio de las diferencias en las medias de los valores de microARN divididas por la suma de sus desviaciones típicas. Las Tablas 8 y 9 comprenden una lista selectiva y más completa de dichos microARN, respectivamente, con las medias y las desviaciones típicas de los niveles de expresión antes del tratamiento con IgIV.

Tabla 8

Ratio calculado	microARN
5,120617	hsa-miR-548d-5p
4,969583	hsa-miR-548a-5p
3,438886	hsa-miR-1537
2,615145	hsa-miR-590-5p
2,558528	hsa-miR-33a
2,547821	hsa-let-7e
2,480264	hsa-miR-32
2,330219	hsa-miR-301a
2,27536	hsa-miR-30e
2,22848	hsa-miR-19a
2,151041	hsa-miR-142-5p
2,144081	hsa-miR-362-3p
2,10237	hsa-miR-301b
2,052236	hsa-miR-1183
2,051132	hsa-miR-142-3p
2,027244	hsa-miR-340
1,977995	hsa-miR-371-5p
-1,98464	hsa-miR-154
-2,11305	hsa-miR-423-3p
-2,1648	hsa-miR-1224-5p
-2,19	hsa-miR-191
-2,19444	hsa-miR-127-3p
-2,24513	hsa-miR-574-5p
-2,4263	hsa-miR-139-3p
-2,7148	hsa-miR-432

10

Tabla 9

Ratio calculado	microARN
5,120617	hsa-miR-548d-5p
4,969583	hsa-miR-548a-5p
3,438886	hsa-miR-1537
2,615145	hsa-miR-590-5p
2,558528	hsa-miR-33a
2,547821	hsa-let-7e
2,480264	hsa-miR-32

Ratio calculado	microARN
2,330219	hsa-miR-301a
2,27536	hsa-miR-30e
2,22848	hsa-miR-19a
2,151041	hsa-miR-142-5p
2,144081	hsa-miR-362-3p
2,10237	hsa-miR-301b
2,052236	hsa-miR-1183
2,051132	hsa-miR-142-3p
2,027244	hsa-miR-340
1,977995	hsa-miR-371-5p
1,861578	hsa-miR-15a
1,857642	hsa-miR-548c-5p
1,850123	hsa-miR-1225-3p
1,837303	hsa-miR-29b
1,834596	hsa-miR-21
1,820351	hsa-miR-1237
1,813523	hsa-miR-101
1,802173	hsa-miR-1539
-1,38055	hsa-miR-602
-1,38147	hsa-miR-132
-1,44539	hsa-miR-1471
-1,45911	hsa-miR-495
-1,59946	hsa-miR-1181
-1,60944	hsa-miR-339-5p
-1,62878	hsa-miR-134
-1,6329	hsa-miR-183
-1,72047	hsa-miR-557
-1,81989	hsa-miR-125a-3p
-1,83853	hsa-miR-423-5p
-1,94998	hsa-miR-382
-1,98464	hsa-miR-154
-2,11305	hsa-miR-423-3p
-2,1648	hsa-miR-1224-5p
-2,19	hsa-miR-191
-2,19444	hsa-miR-127-3p
-2,24513	hsa-miR-574-5p
-2,4263	hsa-miR-139-3p
-2,7148	hsa-miR-432

**[0137]** En consecuencia, las Tablas 10 y 11 comprenden una lista selectiva y completa de dichos microARN, respectivamente, representando ratios significativos en pacientes tras el tratamiento con IgIV.

Tabla 10

Ratio calculado	microARN
2,883848	hsa-miR-125a-Sp
2,589854	hsa-miR-92b
2,108284	hsa-let-7e
2,083486	hsa-miR-1307
-2,13615	hsa-miR-376b
-2,25541	hsa-miR-29b
-2,28617	hsa-miR-543
-2,29295	hsa-miR-301a
-2,35023	hsa-miR-15a
-2,37193	hsa-miR-1249
-2,40239	hsa-miR-542-3p
-2,43732	hsa-miR-136
-2,44794	hsa-miR-140-5p
-2,5479	hsa-miR-32
-2,56767	hsa-miR-33a
-2,58454	hsa-miR-545
-2,75021	hsa-miR-340
-2,7781	hsa-miR-590-5p
-2,80882	kshv-miR-K12-10b
-2,82348	hsa-miR-142-5p
-3,0019	hsa-miR-923_v12.0
-3,02147	hsa-miR-101
-3,20361	hsa-miR-19a
-3,88505	hsa-miR-141
-4,08184	hsa-miR-548c-5p
-4,53511	hsa-miR-30e
-5,1227	hsa-miR-153

Tabla 11

Ratio calculado	microARN
2,883848	hsa-miR-125a-5p
2,589854	hsa-miR-92b
2,130259	miRNABrightCorner30
2,108284	hsa-let-7e
2,083486	hsa-miR-1307
2,073077	hsa-miR-886-3p_v15.0
1,956005	hsa-miR-222
1,860369	mr_1
1,798634	hsa-miR-338-5p
1,793474	hsa-miR-664
1,781682	hsa-miR-1227

ES 2 666 282 T3

Ratio calculado	microARN
1,717443	hsa-miR-99b
1,676623	hsa-miR-363
-1,6569	hsa-miR-377
-1,68107	hsa-miR-450a
-1,72193	hsa-miR-376c
-1,76059	hsa-miR-382
-1,78329	hsa-miR-1537
-1,82416	hsa-miR-29c
-1,8549	hsa-miR-144
-1,85679	hsa-miR-19b
-1,88001	hsa-miR-106b
-1,88841	hsa-miR-499-5p
-1,90758	hsa-miR-376a
-1,96386	hsa-miR-362-3p
-1,99976	hsa-miR-154
-2,035	hsa-miR-337-5p
-2,04325	hsa-miR-424
-2,06191	hsa-miR-219-5p
-2,13615	hsa-miR-376b
-2,25541	hsa-miR-29b
-2,28617	hsa-miR-543
-2,29295	hsa-miR-301a
-2,35023	hsa-miR-15a
-2,37193	hsa-miR-1249
-2,40239	hsa-miR-542-3p
-2,43732	hsa-miR-136
-2,44794	hsa-miR-140-5p
-2,5479	hsa-miR-32
-2,56767	hsa-miR-33a
-2,58454	hsa-miR-545
-2,75021	hsa-miR-340
-2,7781	hsa-miR-590-5p
-2,80882	kshv-miR-K12-10b
-2,82348	hsa-miR-142-5p
-3,0019	hsa-miR-923 v12.0
-3,02147	hsa-miR-101
-3,20361	hsa-miR-19a
-3,88505	hsa-miR-141
-4,08184	hsa-miR-548c-5p
-4,53511	hsa-miR-30e
-5,1227	hsa-miR-153

Para evaluar la capacidad de microARN de predecir la respuesta de microARN a la terapia, se extrajeron microARN que funcionan de forma similar ante el tratamiento entre los grupos dicotomizados, ya sean microARN que aumentan a la vez o disminuyen a la vez, y se listan en la Tabla 12.

Tabla 12

MicroARN		$\Delta$ Media Grupo A	DT	$\Delta$ Media Grupo B	DT		$\Delta$ Neta A y B
hsa-mir-1470	dis	-0,7673864	1,235473	-4,12664194	1,5502503	dis	-3,35926
hsa-mir-1290	dis	-0,0147208	1,1018548	-3,15440146 3	1,1577212	dis	-3,13968
hsa-mir-1202	dis	-0,3401371	0,8489831	-3,3743004	1,1013233	dis	-3,03416
hsa-mir-212	dis	-0,694552	0,7209563	-3,7040352	0,89993	dis	-3,00948
hsa-mir-26b	dis	-0,0189347	0,3277201	-1,486439	0,2695336	dis	-1,4675
hsa-mir-623	au	0,5154214	0,3045152	3,2896302	1,1049068	au	2,774209
hsa-mir-1826_v15.0	au	0,0226423	0,5811046	2,88962271	1,1343319	au	2,86698
hsa-mir-574-3p	au	0,2439299	1,5461713	3,300805	0,7679533	au	3,056875
hsa-mir-1471	au	0,6108116	2,9157016	4,0440545	1,3350063	au	3,433243
hsa-mir-337-3p	au	0,2684066	1,4140522	4,8525722	0,9392156	au	4,584166
hsa-mir-513b	au	0,6818242	1,3846447	5,8524707	1,7107123	au	5,170647

5

**[0138]** Ciertos patrones de respuesta pueden indicar resistencia o capacidad de respuesta de uno de los dos grupos. Al existir un cambio significativo en el valor de uno o más microARN en un grupo, puede haber una respuesta pequeña en el otro. El grupo que muestra un cambio menor puede indicar una falta de respuesta a la intervención terapéutica. Este grupo puede ser resistente a la intervención o puede ser que no se necesite el efecto terapéutico pretendido. La respuesta de hsa-mir-132 es ejemplar. Los pacientes del grupo A presentaban CTs relativamente bajos mediante PCR (concentraciones relativamente elevadas del microARN), mientras que los pacientes del grupo B presentaban CTs relativamente elevadas. Se observó una respuesta rápida tras la terapia en los pacientes del grupo A que convergen con los niveles bajos observados en los pacientes del grupo B. Existe la posibilidad de que el efecto terapéutico en los niveles del microARN en el grupo B estén ya en el nivel en el que la intervención terapéutica es capaz de surtir efecto. Las siguientes tablas presentan subconjuntos de microARN que muestran un cambio relativamente significativo en un grupo y un cambio reducido en el otro grupo. Además, puede observarse que el grupo que presenta un cambio significativo puede converger en un nivel de expresión correspondiente con el otro grupo, o bien divergir. Concretamente, las Tablas 13 y 14 son listas selectivas de microARN que presentan un comportamiento divergente o convergente, respectivamente, y que muestran un cambio significativo en el grupo A pero un cambio relativamente pequeño en el grupo B.

10

15

20

Tabla 13

$\Delta$ Media Grupo A	DT	NombreSistemático	Dirección
2,52122	1,497334	hsa-miR-136	Más aumentado
2,208455	0,541141	hsa-miR-33a	Más aumentado
2,083515	1,609553	hsa-miR-219-5p	Más aumentado
2,082454	0,849342	hsa-miR-153	Más aumentado
1,955594	1,558846	hsa-miR-545	Más aumentado
1,757013	0,663302	hsa-miR-32	Más aumentado
1,301357	0,995047	hsa-miR-1537	Más aumentado
1,195371	0,219509	hsa-miR-590-5p	Más aumentado
-1,82126	1,984385	hsa-miR-1181	Más disminuido

Tabla 14

$\Delta$ Media Grupo A	DT	NombreSistemático	Dirección
1,270745	1,003145	hsa-miR-1	Más aumentado

ES 2 666 282 T3

Δ Media Grupo A	DT	NombreSistemático	Dirección
0,933754	1,321562	hsa-miR-376a	Más aumentado
-1,20769	3,331194	hsa-miR-630	Más disminuido
-1,26517	0,328726	hsa-miR-886-3p_v15.0	Más disminuido
-1,27118	1,97	hsa-miR-1300_v13.0	Más disminuido
-1,29486	3,144593	hsa-miR-485-3p	Más disminuido
-1,32161	1,728257	hsa-miR-1224-5p	Más disminuido
-1,48121	1,881716	hsa-miR-300	Más disminuido
-1,50279	0,935894	hsa-miR-132	Más disminuido
-1,7283	1,326469	hsa-miR-339-5p	Más disminuido
-1,74399	3,594059	kshv-miR-K12-9	Más disminuido

[0139] Del mismo modo, las Tablas 15 y 16 son listas más completas de microARN que presentan comportamiento divergente y convergente, respectivamente, y que muestran un cambio significativo en el grupo A pero relativamente pequeño en el grupo B.

5

Tabla 15

Δ Media Grupo A	DT	NombreSistemático	Dirección
2,52122	1,497334	hsa-miR-136	Más aumentado
2,208455	0,541141	hsa-miR-33a	Más aumentado
2,083515	1,609553	hsa-miR-219-5p	Más aumentado
2,082454	0,849342	hsa-miR-153	Más aumentado
1,955594	1,558846	hsa-miR-545	Más aumentado
1,757013	0,663302	hsa-miR-32	Más aumentado
1,301357	0,995047	hsa-miR-1537	Más aumentado
1,195371	0,219509	hsa-miR-590-5p	Más aumentado
1,140525	0,150147	hsa-miR-301a	Más aumentado
1,083703	0,288785	hsa-miR-141	Más aumentado
1,068173	0,318097	hsa-miR-29b	Más aumentado
1,041446	0,142776	hsa-miR-142-5p	Más aumentado
0,952666	0,441789	hsa-miR-193a-3p	Más aumentado
0,885343	0,493095	hsa-miR-582-3p	Más aumentado
-0,90253	1,698756	hsa-miR-513a-Sp	Más disminuido
-1,82126	1,984385	hsa-miR-1181	Más disminuido

Tabla 16

Δ Media Grupo A	DT	NombreSistemático	Dirección
1,270745	1,003145	hsa-miR-1	Más aumentado
1,13486	1,316732	hsa-miR-376c	Más aumentado
1,132591	0,828951	hsa-miR-551b	Más aumentado
1,10453	1,617308	hsa-miR-337-5p	Más aumentado
1,0677	0,202879	hsa-miR-142-3p	Más aumentado
1,049269	1,235692	hsv1-miR-H1_v14.0	Más aumentado
1,035347	2,190203	hsa-miR-410	Más aumentado

ES 2 666 282 T3

Δ Media Grupo A	DT	NombreSistemático	Dirección
0,976275	0,357315	hsa-miR-301b	Más aumentado
0,971021	1,083568	hsa-miR-371-5p	Más aumentado
0,933754	1,321562	hsa-miR-376a	Más aumentado
0,88329	0,745268	hsa-miR-133b	Más aumentado
-0,75803	1,061571	hsa-miR-100	Más disminuido
-0,76739	1,235473	hsa-miR-1470	Más disminuido
-0,80433	0,948616	hsa-miR-1260	Más disminuido
-0,84299	1,117714	hsa-miR-647	Más disminuido
-0,8683	2,617779	hsa-miR-595	Más disminuido
-0,87714	1,87364	hsa-miR-525-5p	Más disminuido
-0,88588	2,114378	hsa-miR-188-5p	Más disminuido
-0,94706	0,701991	hsa-miR-28-3p	Más disminuido
-0,99436	2,03129	hsa-miR-96	Más disminuido
-1,02709	1,633777	hsa-miR-451	Más disminuido
-1,07284	0,683653	hsa-miR-134	Más disminuido
-1,07828	1,295253	hsa-miR-127-3p	Más disminuido
-1,08028	2,11365	hsa-miR-663	Más disminuido
-1,20003	1,525774	hsa-miR-486-5p	Más disminuido
-1,20769	3,331194	hsa-miR-630	Más disminuido
-1,26517	0,328726	hsa-miR-886-3p_v15.0	Más disminuido
-1,27118	1,97	hsa-miR-1300_v13.0	Más disminuido
-1,29486	3,144593	hsa-miR-485-3p	Más disminuido
-1,32161	1,728257	hsa-miR-1224-5p	Más disminuido
-1,48121	1,881716	hsa-miR-300	Más disminuido
-1,50279	0,935894	hsa-miR-132	Más disminuido
-1,7283	1,326469	hsa-miR-339-5p	Más disminuido
-1,74399	3,594059	kshv-miR-K12-9	Más disminuido

[0140] En consecuencia, las Tablas 17 y 18 son una lista selectiva de microARN que presentan comportamiento divergente y convergente, respectivamente, que muestran un cambio significativo en el grupo B y un cambio relativamente pequeño en el grupo A.

5

Tabla 17

Δ Media Grupo B	DT	NombreSistemático	Dirección
8,720988	1,695736	hsa-miR-513a-5p	Más aumentado
4,492508	1,085892	hsa-miR-1181	Más aumentado
-5,88934	1,274726	hsa-miR-144	Más disminuido
-5,94462	0,44929	hsa-miR-142-5p	Más disminuido
-6,60811	0,775835	hsa-miR-32	Más disminuido
-6,60915	0,991381	hsa-miR-219-5p	Más disminuido
-6,66695	0,528549	hsa-miR-33a	Más disminuido
-6,95672	0,388828	hsa-miR-545	Más disminuido
-7,47155	1,143166	hsa-miR-1537	Más disminuido

ES 2 666 282 T3

Δ Media Grupo B	DT	NombreSistemático	Dirección
-7,84218	0,691729	hsa-miR-153	Más disminuido

Tabla 18

Δ Media Grupo B	DT	NombreSistemático	Dirección
6,045644	1,810638	hsa-miR-1296	Más aumentado
5,852471	1,710712	hsa-miR-513b	Más aumentado
5,269371	0,913262	hsa-miR-1307	Más aumentado
5,23262	0,53149	hsa-miR-92b	Más aumentado
4,852572	0,939216	hsa-miR-337-3p	Más aumentado
4,483333	1,436393	hsa-miR-647	Más aumentado
4,446777	2,354756	hsa-miR-345	Más aumentado
4,393115	0,758058	hsa-miR-501-5p	Más aumentado
-6,23567	1,991346	hsa-miR-376b	Más disminuido
-7,18912	2,240812	hsa-miR-1183	Más disminuido

- 5 **[0141]** Por último, las Tablas 19 y 20 con listas más completas de microARN que presentan comportamiento divergente y convergente, respectivamente, que muestran un cambio significativo en el grupo B pero un cambio relativamente pequeño en el grupo A.

Tabla 19

Δ Media Grupo B	DT	NombreSistemático	Dirección
8,720988	1,695736	hsa-miR-513a-5p	Más aumentado
4,492508	1,085892	hsa-miR-1181	Más aumentado
-4,08226	0,877131	hsa-miR-193a-3p	Más disminuido
-4,74399	0,497264	hsa-miR-301a	Más disminuido
-4,77102	0,469596	hsa-miR-141	Más disminuido
-5,26843	0,506796	hsa-miR-29b	Más disminuido
-5,34069	0,410219	hsa-miR-590-5p	Más disminuido
-5,43651	0,82098	hsa-miR-136	Más disminuido
-5,63284	1,148245	hsa-miR-582-3p	Más disminuido
-5,88934	1,274726	hsa-miR-144	Más disminuido
-5,94462	0,44929	hsa-miR-142-5p	Más disminuido
-6,60811	0,775835	hsa-miR-32	Más disminuido
-6,60915	0,991381	hsa-miR-219-5p	Más disminuido
-6,66695	0,528549	hsa-miR-33a	Más disminuido
-6,95672	0,388828	hsa-miR-545	Más disminuido
-7,47155	1,143166	hsa-miR-1537	Más disminuido
-7,84218	0,691729	hsa-miR-153	Más disminuido

Tabla 20

Δ Media Grupo B	DT	NombreSistemático	Dirección
6,045644	1,810638	hsa-miR-1296	Más aumentado

ES 2 666 282 T3

Δ Media Grupo B	DT	NombreSistemático	Dirección
5,852471	1,710712	hsa-miR-513b	Más aumentado
5,269371	0,913262	hsa-miR-1307	Más aumentado
5,23262	0,53149	hsa-miR-92b	Más aumentado
4,852572	0,939216	hsa-miR-337-3p	Más aumentado
4,483333	1,436393	hsa-miR-647	Más aumentado
4,446777	2,354756	hsa-miR-345	Más aumentado
4,393115	0,758058	hsa-miR-501-Sp	Más aumentado
4,139791	1,284721	hsa-miR-765	Más aumentado
4,10815	2,241581	hsa-miR-299-5p	Más aumentado
4,044055	1,335006	hsa-miR-1471	Más aumentado
3,998238	0,721076	hsa-miR-182	Más aumentado
3,887691	0,570974	hsa-miR-1227	Más aumentado
3,841755	0,995814	hsa-miR-34b	Más aumentado
3,622937	1,26476	hsa-miR-491-3p	Más aumentado
3,506353	0,577494	hsa-miR-191	Más aumentado
3,399269	1,692025	hsa-miR-513c	Más aumentado
3,300805	0,767953	hsa-miR-574-3p	Más aumentado
3,28963	1,104907	hsa-miR-623	Más aumentado
3,238278	1,381079	hsa-miR-885-5p	Más aumentado
3,047651	0,813464	hsa-miR-338-5p	Más aumentado
2,961104	1,572459	hsa-miR-609	Más aumentado
2,889623	1,134332	hsa-miR-1826 v15.0	Más aumentado
-4,09785	0,929085	kshv-miR-K12-10b	Más disminuido
-4,10335	0,423924	hsa-miR-101	Más disminuido
-4,12664	1,55025	hsa-miR-1470	Más disminuido
-4,14723	2,179625	hsa-miR-337-5p	Más disminuido
-4,16497	0,300849	hsa-miR-340	Más disminuido
-4,3393	0,511408	hsa-miR-19a	Más disminuido
-4,3514	0,995718	hsa-miR-487a	Más disminuido
-5,38285	0,608003	hsa-miR-542-3p	Más disminuido
-6,23567	1,991346	hsa-miR-376b	Más disminuido
-7,18912	2,240812	hsa-miR-1183	Más disminuido

[0142] Las tablas mostradas anteriormente representan una cantidad de técnicas adecuadas para clasificar microARN que presentan comportamiento dicotómico en los grupos de pacientes. A su vez, puede esperarse que dichos microARN puedan utilizarse para separar poblaciones de pacientes y para asignar pacientes concretos a grupos apropiados a efectos de diagnóstico, tratamiento o similares. Además, un experto en la materia reconocerá que ciertos microARN destacan por ser identificados en varias de las tablas. Por consiguiente, las técnicas de la presente descripción pueden ponerse en práctica utilizando uno o más microARN seleccionados del siguiente grupo:

5

10

hsa-let-7e, hsa-mir-1181, hsa-miR-1183, hsa-miR-1224-Sp, hsa-miR-127-3p, hsa-mir-1296, hsa-mir-132, hsa-mir-136, hsa-miR-139-3p, hsa-mir-141, hsa-miR-142-3p, hsa-mir-142-5p, hsa-mir-144, hsa-mir-153, hsa-mir-1537, hsa-miR-154, hsa-miR-191, hsa-mir-193a-3p, hsa-miR-19a, hsa-mir-219-5p, hsa-mir-29b, hsa-mir-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-30e, hsa-mir-32, hsa-mir-33a, hsa-miR-340, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-377, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-432, hsa-mir-513a-5p, hsa-mir-545, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-574-5p, hsa-mir-582-3p, hsa-mir-590-5p, hsa-mir-15a, hsa-mir-548c-5p, hsa-mir-1225-3p, hsa-mir-29b,

hsa-mir-21, hsa-mir-1237, hsa-mir-101, hsa-mir-1539, hsa-mir-557, hsa-mir-125a-3p y hsa-mir-423-5p. En otro aspecto, la Tabla 21 presenta una lista de 19 microARN seleccionados que han sido seleccionados en base a uno o más de los criterios indicados y que pueden utilizarse en las técnicas de esta descripción.

Tabla 21

	17 mejores promotores bidireccionales (A y B)	Promotor unidireccional (A o B)	Pronosticador A o B antes de IgIV	Pronosticador A o B después de IgIV	Comportamiento divergente/convergente AB conocido
hsa-mir-136	x	x		x	x
hsa-mir-141	x			x	
hsa-mir-142-5p	x		x	x	
hsa-mir-144	x				
hsa-mir-153	x	x			
hsa-mir-1537	x	x	x		
hsa-mir-193a-3p	x				
hsa-mir-219-5p	x				
hsa-mir-29b	x			x	
hsa-mir-301a	x		x		
hsa-mir-32	x		x	x	
hsa-mir-33a	x	x	x	x	
hsa-mir-545	x				
hsa-mir-582-3p	x				
hsa-mir-	x		x	x	

	17 mejores promotores bidireccionales (A y B)	Promotor unidireccional (A o B)	Pronosticador A o B antes de IgIV	Pronosticador A o B después de IgIV	Comportamiento divergente/convergente AB conocido
590-5p					
hsa-mir-1181	x	x			
hsa-mir-513a-5p	x	x			
hsa-mir-132				x	x
hsa-mir-1296		x			

**[0143]** Como se ha indicado anteriormente, las Tablas 5 y 6 se crearon listando los microARN más divergentes (con mayores diferencias entre la "delta" antes y después de la terapia) en los grupos A y B. En la Tabla 5, el grupo A lo formaban los microARN seleccionados de entre las 100 deltas más positivas, y, en cambio, el grupo B lo formaban los microARN con las 100 deltas más negativas en la Tabla 6. En la Tabla 22, se listan estos microARN, donde en la columna III se listan microARN del grupo A y en la columna IV se listan microARN del grupo B. Los microARN están marcados individualmente con una única X ("X") si provienen de los 100 mejores y los 100 peores microARN de las Tablas 5 y 6, y con una X doble ("XX") si provienen de una lista más corta que comprende los 25 mejores y los 25 peores microARN.

5

10

Tabla 22

		Más aumentados Grupo A	Más disminuidos Grupo A
		Más disminuidos Grupo B	Más aumentados Grupo B
		XX	XX
	MicroARN	de los 25 mejores	de los 25 mejores
		X	X
		de los 100 mejores	de los 100 mejores
I	II	III	IV
1.	hsa-miR-136	xx	
2.	hsa-miR-141	xx	
3.	hsa-miR-142-5p	xx	
4.	hsa-miR-144	xx	
5.	hsa-miR-153	xx	
6.	hsa-miR-1537	xx	
7.	hsa-miR-193a-3p	xx	
8.	hsa-miR-219-5p	xx	
9.	hsa-miR-29b	xx	
10.	hsa-miR-301a	xx	
11.	hsa-miR-32	xx	
12.	hsa-miR-33a	xx	
13.	hsa-miR-545	xx	

ES 2 666 282 T3

		Más aumentados Grupo A	Más disminuidos Grupo A
		Más disminuidos Grupo B	Más aumentados Grupo B
		XX	XX
	MicroARN	de los 25 mejores	de los 25 mejores
		X	X
		de los 100 mejores	de los 100 mejores
14.	hsa-miR-582-3p	xx	
15.	hsa-miR-590-5p	xx	
16.	hsa-miR-1181		xx
17.	hsa-miR-1	x	
18.	hsa-miR-101	x	
19.	hsa-miR-1183	x	
20.	hsa-miR-142-5p	x	
21.	hsa-miR-15a	x	
22.	hsa-miR-19a	x	
23.	hsa-miR-301b	x	
24.	hsa-miR-30e	x	
25.	hsa-miR-340	x	
26.	hsa-miR-362-3p	x	
27.	hsa-miR-371-5p	x	
28.	hsa-miR-424	x	
29.	hsa-miR-548a-5p	x	
30.	hsa-miR-1249	x	
31.	hsa-miR-140-5p	x	
32.	hsa-miR-18a	x	
33.	hsa-miR-19b	x	
34.	hsa-miR-21	x	
35.	hsa-miR-324-5p	x	
36.	hsa-miR-335	x	
37.	hsa-miR-337-5p	x	
38.	hsa-miR-374a	x	
39.	hsa-miR-376b	x	
40.	hsa-miR-377	x	
41.	hsa-miR-421	x	
42.	hsa-miR-542-3p	x	
43.	hsa-miR-548c-5p	x	
44.	hsa-miR-551b	x	
45.	hsa-miR-224		x
46.	hsa-miR-1224-5p		x
47.	hsa-miR-191		x
48.	hsa-miR-423-5p		x
49.	hsa-miR-513a-5p		x
50.	hsa-miR-630		x
51.	hsa-miR-92b		x

		Más aumentados Grupo A	Más disminuidos Grupo A
		Más disminuidos Grupo B	Más aumentados Grupo B
		XX	XX
	MicroARN	de los 25 mejores	de los 25 mejores
		X	X
		de los 100 mejores	de los 100 mejores
52.	hsa-miR-100		x
53.	hsa-miR-1227		x
54.	hsa-miR-1271		x
55.	hsa-miR-1275		x
56.	hsa-miR-1307		x
57.	hsa-miR-182		x
58.	hsa-miR-18b		x
59.	hsa-miR-300		x
60.	hsa-miR-338-3p		x
61.	hsa-miR-501-Sp		x
62.	hsa-miR-513b		x
63.	hsa-miR-513c		x
64.	hsa-miR-564		x
65.	hsa-miR-647		x
66.	hsa-miR-760		x
67.	hsa-miR-770-5p		x
68.	hsa-miR-885-5p		x
69.	hsa-miR-892b		x

5 [0144] Se examinó a doce pacientes con resultados clínicos de la misma manera (micromatriz de microARN humanos conocidos). Seis pacientes presentaban resultados normales, mientras que tres presentaban aborto espontáneo y tres presentaban preeclampsia respectivamente en el primer trimestre antes del desarrollo de la enfermedad. Se tomaron dos muestras de microARN para cada paciente, habiendo tomado una muestra una semana antes de la IgIV y la segunda muestra una semana después de la IgIV. En la Tabla 23 se listan microARN según su resultado clínico. La letra "H" designa a un embarazo no diagnosticado con aborto espontáneo ni preeclampsia, mientras que la letra "P" designa embarazos diagnosticados con preeclampsia, y la letra "M" designa embarazos diagnosticados con aborto espontáneo. La doble X ("XX") designa los 25 microARN más divergentes entre grupos de pacientes, y una única X ("X") designa los 100 microARN más divergentes entre los dos grupos de pacientes. En adelante, una flecha hacia abajo significará que el primer valor menos un segundo valor es negativo, y una flecha hacia arriba significará que el primer valor menos un segundo valor es positivo.

Tabla 23

	(XX)	(XX)	(XX)	Referencia de la Tabla 22: Categoría de comportamiento de miR en Grupo A - B en respuesta a IgIV
	H↓P↑ de los mejores	H↑ M↓ de los mejores	H↓ M↑ de los mejores	
<i>Leyenda:</i>				
↑ <i>Más aumentado</i>				
↓ <i>Más disminuido</i>	(X)	(X)	(X)	
<i>H=Sano</i>	H↓P↑ de los mejores	H↑ M↓ de los mejores	H↓ M↑ de los mejores	

ES 2 666 282 T3

<i>P=Preeclampsia</i>	100	100	100	(XX)
<i>M=Aborto espontáneo</i>				de los 25 mejores
MicroARN				(X) de los 100 mejores
A	B	C	D	E
hsa-miR-144-3p	xx		x	XX
hsa-miR-199a-5p	xx		x	
hsa-miR-199b-5p	xx			
hsa-miR-210	xx			
hsa-miR-221-5p	xx			
hsa-miR-30e-3p	xx			x
hsa-miR-33a-5p	xx			
hsa-miR-340-5p	xx			x
hsa-miR-424-5p	xx			x
hsa-miR-575	xx			
hsa-miR-582-5p	xx			XX
hsa-miR-7-Sp	xx			
hsa-miR-1229		xx		
hsa-miR-1267		xx		
hsa-miR-671-3p		xx		
hsa-miR-144-5p			xx	XX
hsa-miR-425-5p	x			
hsa-miR-125b-5p	x			
hsa-miR-136-5p	x		x	XX
hsa-miR-148b-3p	x			
hsa-miR-152	x			
hsa-miR-181c-5p	x		x	
hsa-miR-193a-3p	x			XX
hsa-miR-223-5p	x			
hsa-miR-301a-3p	x			XX
hsa-miR-32-5p	x			XX
hsa-miR-338-3p	x			X
hsa-miR-34a-5p	x			
hsa-miR-362-3p	x			
hsa-miR-376a-3p	x			
hsa-miR-377-3p	x			X
hsa-miR-548am-5p	x			X
hsa-miR-584-5p	x			
hsa-miR-95	x			
hsa-let-7b-3p		x		
hsa-let-7f-1-3p		x		
hsa-miR-1225-3p		x		

ES 2 666 282 T3

	(XX)	(XX)	(XX)	
	H↓P↑ de los mejores	H↑ M↓ de los mejores	H↓ M↑ de los mejores	Referencia de la Tabla 22: Categoría de comportamiento de miR en Grupo A - B en respuesta a IgIV
<i>Leyenda:</i>				
↑ <i>Más aumentado</i>				
↓ <i>Más disminuido</i>	(X)	(X)	(X)	
<i>H=Sano</i>	H↓P↑ de los mejores	H↑ M↓ de los mejores	H↓ M↑ de los mejores	
<i>P=Preeclampsia</i>	100	100	100	(XX)
<i>M=Aborto espontáneo</i>				de los 25 mejores
MicroARN				(X) de los 100 mejores
A	B	C	D	E
hsa-miR-1234		x		
hsa-miR-1237		x		
hsa-miR-1238		x		
hsa-miR-1244		x		
hsa-miR-1274b_v16.0		x		
hsa-miR-129-1-3p		x		
hsa-miR-129-2-3p		x		
hsa-miR-1825		x		
hsa-miR-191-3p		x		
hsa-miR-29a-5p		x		
hsa-miR-29b-1-5p		x		XX
hsa-miR-33b-3p		x		
hsa-miR-340-5p		x		X
hsa-miR-362-5p		x		
hsa-miR-371a-Sp		x		X
hsa-miR-425-3p		x		
hsa-miR-557		x		
hsa-miR-563		x		
hsa-miR-602		x		
hsa-miR-634		x		
hsa-miR-767-3p		x		
hsa-miR-876-3p		x		
hsa-miR-92b-3p		x		
hsa-miR-933		x		
hsa-miR-373-5p		x		
hsa-miR-125a-5p			x	
hsa-miR-22-5p			x	X

	(XX)	(XX)	(XX)	Referencia de la Tabla 22: Categoría de comportamiento de miR en Grupo A - B en respuesta a IgIV
	H↓P↑ de los mejores	H↑ M↓ de los mejores	H↓ M↑ de los mejores	
<i>Leyenda:</i>				
↑ <i>Más aumentado</i>				
↓ <i>Más disminuido</i>	(X)	(X)	(X)	
<i>H=Sano</i>	H↓P↑ de los mejores	H↑ M↓ de los mejores	H↓ M↑ de los mejores	
<i>P=Preeclampsia</i>	100	100	100	(XX)
<i>M=Aborto espontáneo</i>				de los 25 mejores
MicroARN				(X) de los 100 mejores
A	B	C	D	E
hsa-miR-335-5p			x	X
hsa-miR-423-5p			x	
hsa-miR-505-5p			x	
hsa-miR-543			x	
hsa-miR-548m			x	
hsa-miR-99a-5p			x	

5 **[0145]** En una forma de realización preferida, las listas de microARN de la Tabla 23 pueden acortarse para comprender únicamente aquellos microARN que muestran los resultados divergentes más extremos entre grupos clínicos (indicados con "XX"). Se utilizan únicamente aquellos microARN que se encuentran en estos grupos más selectos. Además, en una forma de realización preferida, se utilizan dichos microARN selectos en conjunto. Aunque un microARN concreto que presenta comportamiento divergente puede proporcionar información sobre la tendencia y el diagnóstico en cuanto a las respuestas clínicas de los grupos de pacientes, grupos selectos de microARN divergentes proporcionan una información más valiosa y personalizada sobre casos de pacientes concretos. Esto puede resultar útil, por ejemplo, en el diagnóstico, pronóstico y monitorización iniciales de 10 intervenciones terapéuticas. Naturalmente, los resultados de estos análisis pueden emplearse junto con otros datos clínicos y de laboratorio. Las listas también pueden acortarse para comprender 5, 10, 15 microARN, por ejemplo. Los microARN de una única muestra, preferentemente tomada antes de la terapia y más preferentemente en función de la terapia, se pueden cuantificar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. En una forma de realización preferida, se emplea una micromatriz que comprende todos 15 los microARN humanos conocidos, y los resultados cuantitativos se disponen del más elevado al más bajo. Si un microARN de la lista que se muestra en la Tabla 23 se clasifica dentro de los 100 más elevados o más bajos de la lista, recibe entonces una puntuación positiva o negativa de "1". Se le asocia un signo positivo (+) donde un valor alto o bajo corresponde a un valor alto o bajo en embarazos sanos. Se le da un signo negativo (-) donde un valor alto o bajo corresponde a un valor alto o bajo en embarazos no sanos ("M" para embarazo espontáneo, y 20 "P" para preeclampsia). La Tabla 25 es una lista acortada a partir de la Tabla 23.

**[0146]** Se pueden emplear otros sistemas de cuantificación conocidos en la materia, como PCR en tiempo real. Se desarrollan en este caso estándares que proporcionan valores umbrales para asignar puntuaciones positivas y negativas.

25

Tabla 24

	(XX)	(XX)	(XX)	Referencia de la Tabla 22
	H↓P↑ de los 25 mejores	H↑ M↓ de los 25 mejores	H↓ M↑ de los 25 mejores	Categoría de respuesta de miR de Grupo A-B a IgIV
		(X)		

Leyenda:	(X)	H↑ M↓ de los 100 mejores	(X)	(XX)
↑Más aumentado	H↓P↑ de los 100 mejores		H↓ M↑ de los 100 mejores	De los 25 mejores
↓Más disminuido				
H=Sano				(X) de los 100 mejores
P=Preeclampsia				
M=Aborto espontáneo				
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
hsa-miR-144	xx		xx	XX
hsa-miR-582-5p	xx			XX
hsa-miR-30e-3p	xx			x
hsa-miR-340-5p	xx			x
hsa-miR-424-5p	xx			x
hsa-miR-199a-5p	xx		x	
hsa-miR-199b-5p	xx			
hsa-miR-210	xx			
hsa-miR-221-5p	xx			
hsa-miR-33a-5p	xx			
hsa-miR-575	xx			
hsa-miR-7-5p	xx			
hsa-miR-1229		xx		
hsa-miR-1267		xx		
hsa-miR-671-3p		xx		

**[0147]** En formas de realización más preferidas, se pueden añadir métodos adicionales para realizar el sistema de puntuación de microARN. Además del sistema de selección “microARN divergente” que se representa en la Tabla 23, se pueden seleccionar también microARN en base a la resistencia relativa de mediciones de una única señal. En una forma de realización, se listan microARN de un grupo de pacientes con una afección similar en orden descendente según su fuerza de señal. Los más de 900 microARN se listan de las fuerzas de señal más elevadas a las más bajas. Los 25 microARN más elevados y los 25 microARN más bajos se seleccionan como marcadores potenciales para la afección en cuestión. En otra forma de realización, estas selecciones de los mejores microARN pueden combinarse con otros métodos de selección para conformar sistemas de puntuación combinados más eficaces. Por ejemplo, microARN-1 y microARN-133b muestran las fuerzas de señal medias más elevadas de los más de 900 miRs observados en estos casos de aborto espontáneo. En el sistema de puntuación que se representa en la Fig. 3, se han añadido los resultados de microARN-1 y microARN-133b a los totales de los 15 “microARN divergentes” originales para crear una puntuación final de carácter más predictivo.

**[0148]** La detección y cuantificación de estos microARN de la presente invención en células inunes, preferentemente en sangre periférica, es útil para diversos fines. Estos incluyen, por ejemplo, predicción de resultados, pronóstico, determinación de si se es candidato a una intervención terapéutica, selección de intervención terapéutica, dosis, duración de intervención, determinación de eficacia terapéutica, evaluación de pacientes para comprobar si existe riesgo y para futuras investigaciones. En una forma de realización preferida, el análisis de microARN se ofrece para la evaluación de mujeres antes del embarazo y durante el embarazo. De esta forma, la Fig. 3 indica la eficacia de microARN concretos para los usos citados anteriormente. Un único microARN, por ejemplo mir-1229 o mir-671-3p, puede utilizarse individualmente para la evaluación. Se puede proporcionar un poder de diagnóstico mejorado mediante la detección y cuantificación de más de un único microARN. Por ejemplo, un panel que comprende mir-7-5p, mir-1229, mir-1267, y mir-671-3p ofrece pruebas claras para un proceso patológico, mientras que un panel que comprende mir-340-5p, mir-424-5p, mir-199b-5p y mir-210 proporcionaría pruebas claras de un transcurso benigno de embarazo. Otras combinaciones de dos o más microARN, incluyendo otros microARN de la lista de la Fig. 3 o de otras listas y tablas de la presente descripción, pueden también ser útiles y pueden incluir la tabla o lista en su totalidad. Es evidente que se entiende que las combinaciones de cualquiera de los microARN listados en el rango de 1 a 17 proporcionan un poder de diagnóstico adicional. En las Figs. 4a-g, se listan resultados de expresión combinados de los 100 microARN mayores y menores antes del tratamiento con IgIV, que pueden emplearse también para seleccionar

uno o más microARN adecuados para poner en práctica las técnicas de la presente descripción. Las Figs. 5a-b muestran diferencias clasificadas entre las medias de los niveles de resultados de embarazo (diferencias de nivel de los 25 mayores y los 25 menores) de los microARN de las Figs. 4a-g.

**[0149]** Mediante el uso de la invención se han descubiertos varios grupos de secuencias, donde las secuencias se identifican con grupos dicotómicos con respecto a su respuesta ante una inmunoterapia. Las secuencias emparejadas, aquellas que representan niveles o diferencias en los niveles de uno o más microARN comprendido en una célula inmune pueden utilizarse para fines clínicos.

**[0150]** Por consiguiente, una forma de realización incluye el método de extracción de muestras de células inmunes, preferentemente PBMC, de un número estadísticamente suficiente de pacientes que contemplan una inmunoterapia antes y después de la terapia. Como se comprenderá, de la misma forma que pueden utilizarse PBMC, se pueden seleccionar subconjuntos de PBMC mediante técnicas conocidas en la materia, por ejemplo citometría de flujo. Los pacientes se clasifican en grupos dicotómicos según sus diferencias. Se establecen rangos de respuesta esperados o rangos normales para los pacientes en cada grupo conforme a prácticas conocidas en el campo de laboratorio clínico. Se pueden clasificar a los pacientes como miembros de uno o de otro grupo, donde sus resultados individuales se encuentran en rangos no coincidentes según si uno o más microARN demostraron presentar el potencial para distinguir a una población de pacientes en los grupos que se han descrito anteriormente.

**[0151]** En otra forma de realización, para catalogar clínicamente a pacientes en grupos dicotómicos, se puede utilizar un panel de secuencias de microARN de microARN no secuenciales cuantificados en muestras de células inmunes, preferentemente PBMC, con anterioridad a una inmunoterapia prevista. Antes de la terapia, se extraen muestras de células inmunes, preferentemente PBMC, de un número estadísticamente suficiente de pacientes que van a someterse a una inmunoterapia. Según las diferencias, los pacientes se dividen en grupos dicotómicos. Se establecen rangos de respuesta esperados o rangos normales para los pacientes en cada grupo de acuerdo con prácticas conocidas en el campo de laboratorio clínico. Se pueden clasificar a los pacientes como miembros de uno u otro grupo, donde sus resultados individuales se encuentran en rangos no coincidentes por uno o más microARN. Esta clasificación permite determinar la idoneidad de la inmunoterapia prevista, por ejemplo la resistencia a la inmunoterapia prevista.

**[0152]** La invención no solo enseña un método para la dicotomización o multimerización de grupos de pacientes clínicamente similares en grupos distinguibles por sus perfiles de microARN, sino que también da a conocer especies de microARN importantes que son distintas en los grupos y que pueden ser de una gran importancia a nivel clínico. Por ejemplo, en una disección del genoma de funciones de microARN predichas por un algoritmo informático, se identificaron varios microARN a cuyos patrones de respuesta separados según dicotomización se le asignaron funciones *in vivo* (John S. Tsang, Margaret S. Ebert, and Alexander van Oudenaarden, Genome-wide dissection of microRNA functions and co-targeting networks using gene-set signatures, *Mol Cell*. 9 Abril 2010; 38(1): 140-153. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.007). De entre los microARN que mostraron diferencias significativas en la respuesta entre los dos grupos, se identificó que hsa-mir-582-3p y 140-5p estaban expresados diferencialmente en adenomas pituitarios no funcionantes (Pituitary (2011) 14:112-124). Se pronosticó que estos microARN afectaban a Smad3, un miembro de la cascada de señalización de TGFβ. Cabe destacar que TGFβ tiene una importancia crucial en el mantenimiento del embarazo. Onouchi y Hata identifican resistencia a IgIV en aproximadamente el quince por ciento de pacientes tratados para la enfermedad de Kawasaki y que requieren una dosis más alta o una terapia alternativa. Relacionaron las variaciones genéticas (SNPs) en los genes que codifican ITPKC y caspasa-3 con la falta de respuesta ante IgIV (Yoshihiro Onouchi and Akira Hata, Responsible Genetic Factors for Vasculitis in Kawasaki Disease, *Advances in the Etiology, Pathogenesis and Pathology of Vasculitis*, 71-92). Desde el punto de vista clínica, la identificación de marcadores moleculares que evalúan la resistencia a medicamentos o la capacidad de respuesta es muy importante. Además, no hay que olvidar que la identificación de pacientes en grupos dicotómicos podría permitir la definición de pacientes con mayores riesgos de padecer enfermedades, incluyendo pero no limitándose a enfermedades autoinmunes, lo cual supone un importante aspecto de la presente invención.

**[0153]** En una forma de realización preferida, el método comprende proporcionar una muestra biológica que comprende células inmunes de un sujeto con un historial de trastorno reproductivo o con riesgo de padecer un trastorno reproductivo, proviniendo dicha muestra de células inmunes, por ejemplo, de sangre periférica, y aislar células mononucleares siguiendo el método de Boyum (Boyum A 1983. Isolation of human blood monocytes with Nycodenz, a new non-ionic iodinated gradient medium. *Scand J Immunol* 17: 429-436). Siguiendo las instrucciones proporcionadas, se puede utilizar un equipo optimizado para la recuperación de secuencias de microARN, como el Mini Kit mirNeasy del catálogo Qiagen 217004. La cuantificación de microARN se puede determinar mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. En una forma de realización preferida, se cuantifican microARN concretos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. En una forma de realización más preferida, se siguen las instrucciones proporcionadas para la PCR cuantitativa en tiempo real según indica el Dr. Frederick de SABiosciences, para su uso con iniciadores indicados a continuación y reactivos optimizados para el equipo de termociclado en tiempo real concreto, como el Stratagente Mx3005p ([www.SABiosciences.com](http://www.SABiosciences.com)). Las instrucciones de funcionamiento del Stratagente Mx3005p

las proporciona en fabricante, que comprenden instrucciones para la cuantificación espectrofotométrica de ARN recuperado y recomendaciones sobre la cantidad que hay que introducir de ARN y mezcla maestra para la PCR. La cuantificación se puede llevar a cabo de forma simultánea con la cuantificación de un “gen de mantenimiento” (un gen que se expresa de forma relativamente constante en las células que se interrogan, permitiendo así la cuantificación relativa, preferentemente de ARN 18s), determinando la cantidad de microARN para compararla con la cantidad de microARN correspondiente en la muestra con la muestra biológica tratada de forma similar de los individuos de control. Se diagnostica entonces al sujeto como candidato para una inmunoterapia, como IgIV, inmunoterapia con linfocitos o terapia anti-TNFalfa según los métodos de Winger *et al.* si existe expresión diferencial y/o patrón de expresión diferencial en una cantidad de uno o más de los microARN de la muestra en comparación con los niveles y/o patrones del control de microARN correspondiente. La expresión diferencial se define estadísticamente a partir de tres o más muestras de individuos de control, donde el valor y/o el patrón del paciente está dos desviaciones típicas por encima del valor y/o patrón medio del control. Preferentemente, se determinan los valores/patrones del control y los valores/patrones del paciente en muestras tomadas al mismo tiempo con respecto al embarazo, por ejemplo, durante el período anterior a la concepción y al mismo tiempo durante un ciclo menstrual o tras la implantación. Por otra parte, el método puede comprender la cuantificación de una pluralidad de muestras, donde la muestra control es el primer valor de muestra para uno o más de los microARN listados anteriormente. El desarrollo de la enfermedad se puede evaluar mediante la comparación de valores y/o patrones con posterioridad al patrón y/o valor de control. Se puede determinar la eficacia de la intervención terapéutica comparando los valores y/o patrones con posterioridad al inicio de una intervención terapéutica con un valor y/o patrón de control en una muestra biológica tomada con anterioridad al inicio de la terapia.

**[0154]** Otras formas de realización están dirigidas al diagnóstico y tratamiento de problemas reproductivos inmunológicos. De acuerdo con los métodos descritos anteriormente, los niveles y patrones de microARN de PBMC pueden utilizarse para diagnosticar problemas reproductivos inmunológicos. Entre los ejemplos de dichos problemas reproductivos se incluyen fracaso en la implantación, infertilidad, aborto espontáneo, parto prematuro, ruptura prematura de membrana (RPM), retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, muerte fetal, endometriosis y otros. Además, los niveles y patrones de microARN de PBMC pueden utilizarse también para monitorizar el tratamiento de estos problemas reproductivos inmunológicos.

**[0155]** Como se podrá apreciar, los niveles y patrones de microARN de PBMC pueden también utilizarse para diagnosticar y monitorizar el tratamiento de problemas reproductivos que pueden no ser de carácter inmunológico pero estar correlacionados con problemas reproductivos inmunológicos. Entre las enfermedades representativas se incluyen el aumento de los niveles de factor tisular (concretamente de microARN 19b y 20a) en el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, aumento de factores de riesgo de coagulación, síndrome del ovario poliquístico (SOP) y fallo ovárico precoz (FOP).

**[0156]** En otro aspecto, los niveles y patrones de microARN de PBMC pueden utilizarse para diagnosticar y monitorizar el tratamiento, y para prevenir riesgos a largo plazo en el bebé como resultado del embarazo afectado inmunológicamente. Entre estos se incluyen riesgo para el bebé de desarrollar asma, autismo, TDAH, diabetes, esquizofrenia, síndrome de Tourette, trastorno bipolar u otras afecciones. Además, los niveles y patrones de ARN de PBMC pueden utilizarse para diagnosticar y monitorizar el tratamiento para problemas que pueden no ser de carácter reproductivo pero estar correlacionados con problemas reproductivos inmunológicos, incluidos tiroiditis autoinmune, migrañas, lupus (LES), brotes de artritis reumatoide, deficiencia de estrógenos, osteoporosis, resistencia a la insulina y otros.

**[0157]** Los métodos y composiciones de la invención pueden aplicarse también en el diagnóstico del tratamiento de enfermedades inmunológicas no reproductivas. Concretamente, los niveles y patrones de microARN de PBMC pueden emplearse para diagnosticar pacientes que padecen enfermedades inmunológicas no reproductivas pero que pueden verse beneficiados por la inmunoterapia (como IgIV), incluidas la enfermedad de Kawasaki, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), síndrome de Guillain-Barré, autismo, EM, lupus (LES) y otras afecciones no identificadas todavía que responden al tratamiento con inmunoterapia.

**[0158]** Mediante la identificación de grupos de pacientes representativos y de respuestas de microARN, se pueden seleccionar terapias inmunológicas y de otro tipo óptimas. Entre las terapias representativas adecuadas se incluyen IgIV, terapia de intralípidos, G-CSF (Neupogen), corticosteroides (prednisona, prednisolona, dexametasona, etc.), terapias anti-TNF $\alpha$  (Humira, Enbrel, Simponi), aceite de pescado (aceites con omega-3), vitamina D, terapia de inmunización de linfocitos (LIT, por sus siglas en inglés), levotiroxina, metformina, heparina y otros.

**[0159]** Otras formas de realización incluyen la utilización de niveles y patrones de microARN de PBMC para determinar las dosis óptimas y las elecciones y/o combinaciones de tratamiento para controlar las enfermedades inmunológicas concretas identificadas. Las dosis y combinaciones pueden incluir una única dosis de 25 g de IgIV combinada con 20 mg una vez al día seguida por una segunda prueba de microARN 2 meses después, inyecciones mensuales de Himuria sin segundas pruebas posteriores, intralípidos únicamente cada mes, 2 mg de dexametasona al día durante 3 meses y una disminución posterior del medicamento, u otros.

**[0160]** Como se podrá apreciar, los niveles y patrones de microARN de PBMC pueden emplearse para identificar pacientes que no se verán beneficiados o que presentarán efectos secundarios negativos tras la terapia, a pesar de que reciba un diagnóstico positivo de la enfermedad.

5 **[0161]** Otro aspecto más de la presente descripción se dirige a la identificación de niveles y patrones de comportamiento de un microARN de PBMC característicos en relación a otros microARN. Estos niveles y patrones pueden estar asociados con fenotipos distintos de enfermedad y tratamiento. Estos pueden definirse por los rangos en los que operan los microARN concretos, incluyendo los niveles basales, niveles completamente activos, niveles medios, desviaciones típicas observadas, de patrones observados en niveles  
10 de secuencias, y patrones y cambios en patrones observados entre múltiples microARN de muestras concretas o secuenciales.

15 **[0162]** Los niveles y patrones de microARN de PBMC también pueden definirse en parte por polimorfismos. Como se ha expuesto anteriormente, pueden darse polimorfismos en la base 22-24 del propio microARN, en la región que rodea al microARN en el pre-microARN que afecta al plegamiento de la horquilla y a su transcripción, en el ARNm diana, o en la cadena de ARN complementaria a la cadena guía que entra en el complejo RISC, por ejemplo.

20 **[0163]** Algunos niveles y patrones de microARN pueden medirse mejor mediante pruebas eficaces de cambios de microARN en la población de células mononucleares mediante PBMC. Se muestra un análisis eficaz de la población de células mononucleares de microARN al eliminar PBMC, que suprime la medición de microARN mononuclear.

25 **[0164]** Como se ha señalado anteriormente, se pueden determinar los patrones y niveles de microARN de varias maneras adecuadas. En una forma de realización preferida, el comportamiento bimodal (dicotomo) o multimodal de uno o más microARN se puede verificar antes o después de los grupos de tratamiento. Además, se pueden identificar características clínicas útiles asociadas a estos grupos de pacientes separados (como el grado de mejora clínica con IgIV). De forma similar, los microARN con comportamiento bimodal o multimodal se pueden emplear como marcadores para seleccionar los grupos óptimos para un posterior análisis de microARN u otros procedimientos de diagnóstico. También preferentemente, los métodos adecuados que incluyen la selección de microARN en común entre las fracciones principales que han aumentado más y las que han disminuido más de grupos separados perfeccionan la identificación de los grupos.

30 **[0165]** En el presente documento se describen las formas de realización preferidas actualmente. No obstante, un experto en la materia relacionada con la presente invención podrá comprender que los principios de la presente descripción pueden ampliarse fácilmente a otras aplicaciones con las modificaciones adecuadas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### **[0166]**

35 <110> Winger, Ed  
 <120> test  
 <130> 186.03  
 40 <160> 191  
 <210> 1  
 <211> 22  
 45 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-582-3p MIMAT0004797  
 <400> 1  
 50 uaacugguug aacaacugaa cc 22  
 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 55 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-7-1-3p MIMAT0004553  
 <400> 2  
 caacaaaucagucugcca ua 22

<210> 3  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 5 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-340-5p MIMAT0004692  
  
 <400> 3  
 uuauaaagca augagacuga uu 22  
 10  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 15 <223> hsa-miR-199b-3p MIMAT0004563  
  
 <400> 4  
 acaguagucu gcacauuggu ua 22  
 20  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-199a-3p MIMAT0000232  
 25  
 <400> 5  
 acaguagucu gcacauuggu ua 22  
 30  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-30e-5p MIMAT0000692  
 35  
 <400> 6  
 uguaaacauc cuugacugga ag 22  
 40  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-575 MIMAT0003240  
 45  
 <400> 7  
 gagccaguug gacaggagc 19  
 50  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-7-5p MIMAT0000252  
 55  
 <400> 8  
 uggaagacua gugauuuugu ugu 23  
 60  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-33a-3p MIMAT0004506  
 65  
 <400> 9  
 caauguuucc acagugcauc ac 22  
 <210> 10  
 <211> 22

<212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-7-2-3p MIMAT0004554

5 <400> 10  
 caacaaaucc cagucuaccu aa 22

<210> 11  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-199b-5p MIMAT0000263

10

15 <400> 11  
 cccaguguuu agacuaucug uuc 23

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-144-5p MIMAT0004600

20

25 <400> 12  
 ggauaucauc auauacugua ag 22

<210> 13  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-30e-3p MIMAT0000693

30

<400> 13  
 cuucagucg gauguuaca gc 22

35

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-424-3p MIMAT0004749

40

<400> 14  
 caaaacguga ggcgcugcua u 21

45

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-33a-5p MIMAT0000091

50

<400> 15  
 gugcauugua guugcauugc a 21

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-671-3p MIMAT0004819

55

<400> 16  
 uccgguucuc agggcuccac c 21

60

<210> 17  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-340-3p MIMAT0000750

65

<400> 17  
 uccgucucag uuacuuuaua gc 22

5 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1267 MIMAT0005921

10 <400> 18  
 ccguugaag uguaaucucc a 21

15 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1229-3p MIMAT0005584

20 <400> 19  
 cucucaccac ugcccucca cag 23

25 <210> 20  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-424-5p MIMAT0001341

30 <400> 20  
 cagcagcau ucauguuuug aa 22

35 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-221-3p MIMAT0000278

40 <400> 21  
 agcuacauug ucugcugggu uuc 23

45 <210> 22  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1 MIMAT0000416

50 <400> 22  
 uggaauguaa agaaguaugu au 22

55 <210> 23  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-133b MIMAT0000770

60 <400> 23  
 uuugguuccc uucaaccagc ua 22

65 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-221-5p MIMAT0004568

<400> 24  
 accuggcaua caauguagau uu 22

<210> 25  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 5 <223> hsa-miR-210 MIMAT0000267  
  
 <400> 25  
 cugugcgugu gacagcggu ga 22  
  
 10 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1229-5p MIMAT0022942  
  
 15 <400> 26  
 guggguaggg uuugggggag agcg 24  
  
 20 <210> 27  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-671-5p MIMAT0003880  
  
 25 <400> 27  
 aggaagcccu ggaggggcug gag 23  
  
 30 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-582-5p MIMAT0003247  
  
 35 <400> 28  
 uuacaguugu ucaaccaguu acu 23  
  
 40 <210> 29  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-199a-5p MIMAT0000231  
  
 45 <400> 29  
 cccaguguuc agacuaccug uuc 23  
  
 50 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-144-3p MIMAT0000436  
  
 <400> 30  
 uacaguauag augauguacu 20  
  
 55 <210> 31  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-376a-5p MIMAT0003386  
  
 60 <400> 31  
 guagauucuc cuucuagag ua 22  
  
 65 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> RNA

<213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-193a-3p MIMAT0000459  
 <400> 32  
 aacuggccua caaagucca gu 22  
 5  
 <210> 33  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 10 <223> hsa-miR-557 MIMAT0003221  
 <400> 33  
 guuugcacgg gugggccuug ucu 23  
 15 <210> 34  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 20 <223> hsa-miR-34a-3p MIMAT0004557  
 <400> 34  
 caaucagcaa guauacugcc cu 22  
 25 <210> 35  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-584-5p MIMAT0003249  
 30 <400> 35  
 uuaugguuug ccugggacug ag 22  
 <210> 36  
 <211> 26  
 35 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1244 MIMAT0005896  
 <400> 36  
 40 aaguaguugg uuuguagag augguu 26  
 <210> 37  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 45 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-125b-1-3p MIMAT0004592  
 <400> 37  
 50 acggguuagg cucuugggag cu 22  
 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 55 <223> hsa-miR-32-3p MIMAT0004505  
 <400> 38  
 cauuuagug ugugugauu uu 22  
 60 <210> 39  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-933 MIMAT0004976  
 65 <400> 39

ES 2 666 282 T3

ugugcgcagg gagaccucuc cc 22  
 <210> 40  
 <211> 22  
 5 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-373-5p MIMAT0000725  
 <400> 40  
 10 acucaaaaug ggggcgcuuu cc 22  
 <210> 41  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 15 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-let-7b-5p MIMAT0000063  
 <400> 41  
 20 ugagguagua gguugugugg uu 22  
 <210> 42  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 25 <223> hsa-miR-376a-3p MIMAT0000729  
 <400> 42  
 aucauagagg aaaauccacg u 21  
 30 <210> 43  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-129-2-3p MIMAT0004605  
 35 <400> 43  
 aagccuuac cccaaaaagc au 22  
 40 <210> 44  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-548am-3p MIMAT0019076  
 45 <400> 44  
 caaaaacugc aguuacuuuu gu 22  
 <210> 45  
 <211> 22  
 50 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-let-7f-5p MIMAT0000067  
 <400> 45  
 55 ugagguagua gauuguauag uu 22  
 <210> 46  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 60 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-876-3p MIMAT0004925  
 <400> 46  
 65 uggugguuua caaaguaauu ca 22  
 <210> 47

<211> 20  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-371a-5p MIMAT0004687  
 5 <400> 47  
 acuccaaacug ugggggcacu 20

<210> 48  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-423-5p MIMAT0004748  
 10

<400> 48  
 15 ugaggggcag agagcgagac uuu 23

<210> 49  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-373-3p MIMAT0000726  
 20

<400> 49  
 25 gaagugcuuc gauuuugggg ugu 23

<210> 50  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-152 MIMAT0000438  
 30

<400> 50  
 ucagugcaug acagaacuug g 21

<210> 51  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-34a-5p MIMAT0000255  
 35

<400> 51  
 40 uggcaguguc uuagcugguu gu 22

<210> 52  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-335-5p MIMAT0000765  
 45

<400> 52  
 50 ucaagagcaa uaacgaaaaa ugu 23

<210> 53  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-181c-5p MIMAT0000258  
 55

<400> 53  
 60 aacauucaac cugucgguga gu 22

<210> 54  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-125b-2-3p MIMAT0004603  
 65

<400> 54  
 ucacaaguca ggcucuuggg ac 22

5 <210> 55  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-548am-5p MIMAT0022740

10 <400> 55  
 aaaaguaauu gcgguuuuug cc 22

15 <210> 56  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-338-3p MIMAT0000763

20 <400> 56  
 uccagcauca gugauuuugu ug 22

25 <210> 57  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1225-5p MIMAT0005572

30 <400> 57  
 guggguacgg cccagugggg gg 22

35 <210> 58  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-362-3p MIMAT0004683

40 <400> 58  
 aacacaccua uucaaggauu ca 22

45 <210> 59  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-767-5p MIMAT0003882

<400> 59  
 ugcaccaugg uugucugagc aug 23

50 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-136-3p MIMAT0004606

55 <400> 60  
 caucaucguc ucaaugagu cu 22

60 <210> 61  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-29b-1-5p MIMAT0004514

65 <400> 61  
 gcugguuuca uauggugguu uaga 24

<210> 62  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 5 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-29a-3p MIMAT0000086  
 <400> 62  
 uagcaccauc ugaaaucggu ua 22

10 <210> 63  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-92b-3p MIMAT0003218

15 <400> 63  
 uauugcacuc gucccggccu cc 22

20 <210> 64  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-362-5p MIMAT0000705

25 <400> 64  
 aaucuuugga accuaggugu gagu 24

30 <210> 65  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-223-5p MIMAT0004570

35 <400> 65  
 cguguauuug acaagcugag uu 22

40 <210> 66  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-505-3p MIMAT0002876

45 <400> 66  
 cgucaacacu ugcugguuuc cu 22

50 <210> 67  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-634 MIMAT0003304

<400> 67  
 aaccagcacc ccaacuuugg ac 22

55 <210> 68  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-371a-3p MIMAT0000723

60 <400> 68  
 aagugccgcc aucuuuugag ugu 23

65 <210> 69  
 <211> 22  
 <212> RNA

ES 2 666 282 T3

<213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-129-1-3p MIMAT0004548  
  
 <400> 69  
 5 aagccuuac cccaaaaagu au 22  
  
 <210> 70  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 10 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1238-5p MIMAT0022947  
  
 <400> 70  
 15 gugaguggga gccccagugu gug 23  
  
 <210> 71  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 20 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-876-5p MIMAT0004924  
  
 <400> 71  
 uggauuuuuu ugugaaucac ca 22  
  
 25 <210> 72  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-181c-3p MIMAT0004559  
 30  
 <400> 72  
 aaccaucgac cguugagugg ac 22  
  
 <210> 73  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-338-5p MIMAT0004701  
 35  
 <400> 73  
 aacaauaucc uggugcugag ug 22  
  
 <210> 74  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-505-5p MIMAT0004776  
 45  
 <400> 74  
 50 gggagccagg aaguauugau gu 22  
  
 <210> 75  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 55 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-335-3p MIMAT0004703  
  
 <400> 75  
 60 uuuuucauuu uugcuccuga cc 22  
  
 <210> 76  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 65 <223> hsa-miR-543 MIMAT0004954

ES 2 666 282 T3

<400> 76  
 aaacauucgc ggugcacuuc uu 22

5 <210> 77  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-223-3p MIMAT0000280  
 <400> 77  
 10 ugucaguuug ucaaaauaccc ca 22

<210> 78  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 15 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-125b-5p MIMAT0000423

<400> 78  
 20 ucccugagac ccuaacuugu ga 22

<210> 79  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 25 <223> hsa-miR-1238-3p MIMAT0005593

<400> 79  
 cuuccucguc ugucugcccc 20

30 <210> 80  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-377-5p MIMAT0004689  
 35 <400> 80  
 agagguugcc cuuggugaau uc 22

40 <210> 81  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-584-3p MIMAT0022708

45 <400> 81  
 ucaguuccag gccaccagg cu 22

<210> 82  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 50 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-22-5p MIMAT0004495

<400> 82  
 55 aguucuucag uggcaagcuu ua 22

<210> 83  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 60 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-376a-2-5p MIMAT0022928

<400> 83  
 65 gguagauuuu ccuucuaugg u 21

<210> 84

<211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-301a-5p MIMAT0022696  
 5  
 <400> 84  
 gcucugacuu uauugcacua cu 22  
  
 <210> 85  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-548m MIMAT0005917  
 10  
  
 <400> 85  
 caaagguauu ugugguuuuu g 21  
 15  
  
 <210> 86  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-29b-3p MIMAT0000100  
 20  
  
 <400> 86  
 uagcaccauu ugaaucagu guu 23  
 25  
  
 <210> 87  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-99a-3p MIMAT0004511  
 30  
  
 <400> 87  
 caagcucgcu ucuauggguc ug 22  
 35  
  
 <210> 88  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-33b-3p MIMAT0004811  
 40  
  
 <400> 88  
 cagugccucg gcagucagc cc 22  
 45  
  
 <210> 89  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-92b-5p MIMAT0004792  
 50  
  
 <400> 89  
 agggacggga cgcggugcag ug 22  
 55  
  
 <210> 90  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-602 MIMAT0003270  
 60  
  
 <400> 90  
 gacacgggcg acagcugcgg ccc 23  
 65  
  
 <210> 91  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens

<223> hsa-miR-1237-3p MIMAT0005592  
 <400> 91  
 uccuucugcu cgcucccca g 21  
 5  
 <210> 92  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 10 <223> hsa-miR-129-5p MIMAT0000242  
 <400> 92  
 cuuuuugcgg ucugggcuug c 21  
 15  
 <210> 93  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-148b-3p MIMAT0000759  
 20 <400> 93  
 ucagugcauc acagaacuuu gu 22  
 25  
 <210> 94  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-377-3p MIMAT0000730  
 30 <400> 94  
 aucacacaaa ggcaacuuuu gu 22  
 35  
 <210> 95  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-let-7b-3p MIMAT0004482  
 40 <400> 95  
 cuauacaacc uacugccuuc cc 22  
 45  
 <210> 96  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-125a-5p MIMAT0000443  
 <400> 96  
 ucccugagac ccuuuaaccu guga 24  
 50 <210> 97  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-125a-3p MIMAT0004602  
 55 <400> 97  
 acaggugagg uucuugggag cc 22  
 60 <210> 98  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-148b-5p MIMAT0004699  
 65 <400> 98  
 aaguucuguu auacacucag gc 22

<210> 99  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 5 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-22-3p MIMAT0000077  
  
 <400> 99  
 aagcugccag uugaagaacu gu 22  
 10  
 <210> 100  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 15 <223> hsa-miR-1237-5p MIMAT0022946  
  
 <400> 100  
 cgggggcggg gccgaagcgc g 21  
 20  
 <210> 101  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-let-7f-1-3p MIMAT0004486  
 25  
 <400> 101  
 cuauacaau uauugccuuc cc 22  
 30  
 <210> 102  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-29a-5p MIMAT0004503  
 35  
 <400> 102  
 acugauuucu uuugguguuc ag 22  
 40  
 <210> 103  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-193a-5p MIMAT0004614  
 45  
 <400> 103  
 ugggucuuug cgggcgagau ga 22  
 50  
 <210> 104  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-423-3p MIMAT0001340  
 55  
 <400> 104  
 agcucggucu gaggcccuc agu 23  
 60  
 <210> 105  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-191-3p MIMAT0001618  
 65  
 <400> 105  
 gcugcguug gauuucgucc cc 22  
 <210> 106  
 <211> 23

<212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-301a-3p MIMAT0000688

5 <400> 106  
 cagugcaaua guauugucac agc 23

<210> 107  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-767-3p MIMAT0003883  
 <400> 107  
 ucugcucuaa ccccaugguu ucu 23

10

<210> 108  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-563 MIMAT0003227

15

<400> 108  
 agguugacau acguuuccc 19

20

<210> 109  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-95 MIMAT0000094

25

<400> 109  
 uucaacgggu auuuauugag ca 22

30

<210> 110  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1234-3p MIMAT0005589

35

<400> 110  
 ucggccugac cacccacccc ac 22

40

<210> 111  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1225-3p MIMAT0005573

45

<400> 111  
 ugagccccug ugccgcccc ag 22

50

<210> 112  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-136-5p MIMAT0000448

55

<400> 112  
 acuccauuug uuuugaugau gga 23

60

<210> 113  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-1234-5p MIMAT0022944

65

ES 2 666 282 T3

<400> 113  
 gggggggggg ggggggggcc g 21

5 <210> 114  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-99a-5p MIMAT0000097

10 <400> 114  
 aaccguaga uccgaucuug ug 22

15 <210> 115  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-32-5p MIMAT0000090

20 <400> 115  
 uauugcacau uacuaaguug ca 22

25 <210> 116  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-191-5p MIMAT0000440

30 <400> 116  
 caacggauc ccaaagcag cug 23

35 <210> 117  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-miR-33b-5p MIMAT0003301

40 <400> 117  
 gugcauugcu guugcauugc 20

45 <210> 118  
 <211> 71  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-mir-1-1 MI0000651

<400> 118  
 ugggaaacau acuucuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauaggaa uguaaaagaag 60  
 uauguaucuc a 71

50 <210> 119  
 <211> 85  
 <212> RNA  
 <213> homo sapiens  
 <223> hsa-mir-1-2 MI0000437

55 <400> 119  
 accuacucag aguacauacu ucuuuuagua ccacauaggaa cauacaaugc uauggaaugu 60  
 aaagaaguau guauuuuugg uaggc 85

60 <210> 120  
 <211> 110  
 <212> RNA

ES 2 666 282 T3

	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-7-1 MI0000263	
	<400> 120	
5	uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa	60
	aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag	110
	<210> 121	
	<211> 110	
10	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-7-2 MI0000264	
	<400> 121	
15	cuggauacag aguggaccgg cuggcccau cuggaagacu agugauuuug uuguugucu	60
	acugcgcuca acaacaaauc ccagucuacc uaauggugcc agccaucgca	110
	<210> 122	
	<211> 110	
20	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-7-3 MI0000265	
	<400> 122	
25	agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug	60
	uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac	110
	<210> 123	
	<211> 92	
30	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-30e MI0000749	
	<400> 123	
35	gggcagucu ugcuaacugua acauccuug acuggaagcu gaaagguguu cagaggagcu	60
	uucagucgga uguuuacagc ggcaggcugc ca	92
	<210> 124	
	<211> 69	
40	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-33a MI0000091	
	<400> 124	
45	cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu	60
	gcaucacag	69
	<210> 125	
	<211> 119	
50	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-133b MI0000822	
	<400> 125	
55		

ES 2 666 282 T3

	ccucagaaga aagaugcccc cugcucuggc uggucaaaacg gaaccaaguc cgucuuccug	60
	agagguuugg ucccuucaa ccagcuacag cagggcuggc aaugcccagu ccuuggaga	119
5	<210> 126 <211> 86 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-144 MI0000460	
10	<400> 126 uggggcccug gcugggauau caucauauac uguaaguug cgaugagaca cuacaguaua	60
	gaugauguac uaguccgggc accccc	86
15	<210> 127 <211> 71 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-199a-1 MI0000242	
20	<400> 127 gccaaccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac	60
	auugguuagg c	71
25	<210> 128 <211> 110 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-199a-2 MI0000281	
30	<400> 128 aggaagcuuc uggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa	60
	ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca	110
35	<210> 129 <211> 110 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-199b MI0000282	
40	<400> 129 ccagaggaca ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacucccaa	60
	uuguacagua gucugcaca ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg	110
45	<210> 130 <211> 110 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-210 MI0000286	
50	<400> 130 accggcagu gccuccaggc gcagggcagc ccugcccac cgcacacugc gcugcccag	60
	accacugug cgugugacag cggcugaucu gugccugggc agcgcgacct	110
	<210> 131 <211> 110 <212> RNA	

ES 2 666 282 T3

	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-221 MI0000298	
	<400> 131	
5	ugaacaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaaugu agauuucugu guucguuagg	60
	caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa acauguucuc	110
	<210> 132	
	<211> 95	
10	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-340 MI0000802	
	<400> 132	
15	uuguaccugg ugugauuaua aagcaaugag acugauuguc auaugucguu ugugggaucc	60
	gucucaguua cuuuauagcc auaccuggua ucuua	95
	<210> 133	
	<211> 98	
20	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-424 MI0001446	
	<400> 133	
25	cgagggggaua cagcagcaau ucauguuuug aaguguucua aaugguuca aacgugaggc	60
	gcugcuauac ccccucgugg ggaagguaga aggugggg	98
	<210> 134	
	<211> 94	
30	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-575 MI0003582	
	<400> 134	
35	aaucagccc ugccacuggc uuaugucaug accuugggcu acucaggcug ucugcacaau	60
	gagccaguug gacaggagca gugccacuca acuc	94
	<210> 135	
	<211> 98	
40	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-582 MI0003589	
	<400> 135	
45	aucugugcuc uuugauuaca guuguucaac caguuaacua ucuaacuaau uguaacuggu	60
	ugaacaacug aacccaaagg gugcaaagua gaaacauu	98
	<210> 136	
	<211> 118	
50	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-671 MI0003760	
	<400> 136	
55		

ES 2 666 282 T3

	gcaggugaac uggcaggcca ggaagaggag gaagcccugg aggggcugga ggugauggau	60
	guuuuccucc gguucucagg gcuccaccuc uuucgggccg uagagccagg gcuggugc	118
5	<210> 137 <211> 69 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1229 MI0006319	
10	<400> 137 guggguaggg uuugggggag agcgugggcu gggguucagg gacaccucu caccacugcc	60
	cuccacag	69
15	<210> 138 <211> 78 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1267 MI0006404	
20	<400> 138 cuccaaauc uccuguugaa guguaauccc caccuccagc auuggggauu acauuacaac	60
	augaguuug gaugagga	78
25	<210> 139 <211> 74 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-let-7a-3 MI0000062 <400> 139	
30	gggugaggua guagguugua uaguuuuggg cucugcccug cuaugggaua acuauacaau	60
	cuacugucu uccu	74
35	<210> 140 <211> 79 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-let-7e MI0000066	
40	<400> 140 cccgggcuga gguagggagu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuaucgg	60
	ccuccuagcu uucccagg	79
45	<210> 141 <211> 85 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-22 MI0000078	
50	<400> 141 ggcugagccg caguaguucu ucaguggcaa gcuuuauugc cugacccagc uaaagcugcc	60
	aguugaagaa cuguugcccu cugcc	85
	<210> 142 <211> 64 <212> RNA	

ES 2 666 282 T3

	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-29a MI0000087	
	<400> 142	
5	augacugauu ucuuuuggug uucagaguca auauuuuuu cuagcaccau cugaaaucgg	60
	uuau	64
	<210> 143	
	<211> 81	
10	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-29b-1 MI0000105	
	<400> 143	
15	cuucaggaag cugguuucau auggugguuu agauuuuuu agugauuguc uagcaccauu	60
	ugaaaucagu guucuuugggg g	81
	<210> 144	
	<211> 70	
20	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-32 MI0000090	
	<400> 144	
25	ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug	60
	ugauuuuuuc	70
	<210> 145	
	<211> 96	
30	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-33b MI0003646	
	<400> 145	
35	gcgggcggcc ccgcgugca uugcuguugc auugcacgug ugugaggcgg gugcagugcc	60
	ucggcagugc agcccggagc cggccccugg caccac	96
	<210> 146	
	<211> 110	
40	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-34a MI0000268	
	<400> 146	
45	ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauguaag	60
	aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu uguggggcc	110
	<210> 147	
	<211> 96	
50	<212> RNA	
	<213> homo sapiens	
	<223> hsa-mir-92b MI0003560	
	<400> 147	
55		

ES 2 666 282 T3

	cgggccccgg gcgggcggga gggacgggac gcggugcagu guuuuuuuu cccccgcaa	60
	uauugcacuc gucccggccu cggcccccc cggccc	96
5	<210> 148 <211> 81 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-95 MI0000097	
10	<400> 148 aacacagugg gcacucaua aaugucuguu gaauugaaau gcguuacauu caacggguau	60
	uuauugagca cccacucugu g	81
15	<210> 149 <211> 81 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-99a MI0000101	
20	<400> 149 ccc <u>au</u> uggca uaa <u>acc</u> gua ga <u>ucc</u> gaucu ug <u>gg</u> gugaag ug <u>gacc</u> gcac aagcucgcu	60
	cua <u>ggg</u> ucu gu <u>guc</u> agugu g	81
25	<210> 150 <211> 86 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-125a MI0000469	
30	<400> 150 ugccagucuc uaggu <u>ccc</u> ug ag <u>acc</u> cuua accu <u>g</u> agagg aca <u>ccagg</u> g ucacagguga	60
	ggu <u>cu</u> uggg ag <u>ccu</u> ggcgu cu <u>ggc</u>	86
35	<210> 151 <211> 88 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-125b-1 MI0000446	
40	<400> 151 ug <u>cg</u> uccuc ucag <u>ucc</u> ug ag <u>acc</u> cuac uu <u>g</u> ugauguu u <u>acc</u> guuaa au <u>ccac</u> gggu	60
	uag <u>gc</u> ucuug ggag <u>cug</u> ca gu <u>c</u> ugcu	88
45	<210> 152 <211> 89 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-125b-2 MI0000470	
50	<400> 152 accagacuuu u <u>ccu</u> agucc ugag <u>acc</u> cuu ac <u>u</u> ugugagg u <u>auuuu</u> agua acau <u>caca</u> ag	60
	ucag <u>gc</u> ucuu ggg <u>acc</u> uagg cggag <u>ggg</u> ga	89
	<210> 153 <211> 72	

ES 2 666 282 T3

	<212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-129-1 MI0000252	
5	<400> 153	
	ggaucuuuuu gcgguucuggg cuugcuguuc cucucaacag uagucaggaa gcccuuacc	60
	caaaaaguau cu	72
10	<210> 154 <211> 90 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-129-2 MI0000473	
15	<400> 154	
	ugcccuucgc gaucuuuuu gcgguucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc	60
	ccuuacccca aaaagcauuu gcggagggcg	90
20	<210> 155 <211> 82 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-136 MI0000475	
25	<400> 155	
	ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaugcucca ucaucgucuc	60
	aaaugagucu ucagaggguu cu	82
30	<210> 156 <211> 99 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-148b MI0000811	
35	<400> 156	
	caagcacgau uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucucugaa	60
	agucagugca ucacagaacu uugucucgaa agcuuucua	99
40	<210> 157 <211> 87 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-152 MI0000462	
45	<400> 157	
	ugucuuuuuu ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag cagucagugc	60
	augacagaac uugggcccgg aaggacc	87
50	<210> 158 <211> 110 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-181c MI0000271	
55	<400> 158	

ES 2 666 282 T3

	cggaaaauuu gccaaagguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca	60
	ggcaaaccuau cgaccguuga guggaccucg aggccuggaa uugccaucuu	110
5	<210> 159 <211> 92 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-191 MI0000465	
10	<400> 159 cggcuggaca gcgggcaacg gaaucccaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu	60
	gcgcuuuggau uucgucccu gcucuccugc cu	92
15	<210> 160 <211> 88 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-193a MI0000487	
20	<400> 160 cgaggauagg agcugagggc ugggucuuug cgggagagau gagggugucg gaucaacugg	60
	ccuacaaagu cccaguucuc ggcccccg	88
25	<210> 161 <211> 110 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-223 MI0000300	
30	<400> 161 ccuggccucc ugcagugcca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacuccaugu	60
	gguagagugu caguuuugca aauaccccaa gugcggcaca ugcuuaccag	110
35	<210> 162 <211> 86 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-301a MI0000745	
40	<400> 162 acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua	60
	guauugucua agcaucugaa agcagg	86
45	<210> 163 <211> 94 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-335 MI0000816	
50	<400> 163 uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaaauuuu gucauaaacc guuuuucauu	60
	auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca	94
	<210> 164 <211> 67	

ES 2 666 282 T3

	<212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-338 MI0000814	
5	<400> 164	
	ucuccaaciaa uauccuggug cugagugaug acucaggcga cuccagcauc agugauuuug	60
	uugaaga	67
10	<210> 165 <211> 65 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-362 MI0000762	
15	<400> 165	
	cuugaauccu uggaaccuag gugugagugc uauuucagug caacacaccu auucaaggau	60
	ucaaa	65
20	<210> 166 <211> 67 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-371a MI0000779	
25	<400> 166	
	guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc caucuuuuga	60
	guguuac	67
30	<210> 167 <211> 69 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-373 MI0000781	
35	<400> 167	
	gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac uggaagugc uucgauuuug	60
	ggguguccc	69
40	<210> 168 <211> 68 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-376a-1 MI0000784	
45	<400> 168	
	uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca uuauuuuga uaaaucauag aggaaaaucc	60
	acguuuuc	68
50	<210> 169 <211> 80 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-376a-2 MI0003529	
55	<400> 169	

ES 2 666 282 T3

	gguauuuaaa agguagauuu uccuucuaug guuacguguu ugaugguuaa ucauagagga	60
	aaauccacgu uuucaguauc	80
5	<210> 170 <211> 69 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-377 MI0000785	
10	<400> 170 uugagcagag guugcccuug gugaaucgc uuuuuuuug uugaaucaca caaaggcaac	60
	uuuuguuug	69
15	<210> 171 <211> 94 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-423 MI0001445	
20	<400> 171 auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuauuuucca aaagcucggu	60
	cugaggcccc ucagucuugc uuccuaaccc gcgc	94
25	<210> 172 <211> 87 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-425 MI0001448	
30	<400> 172 gaaagcgcuu uggaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg	60
	aaugucgugu ccgcccagug cucuuuc	87
35	<210> 173 <211> 84 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-505 MI0003190	
40	<400> 173 gaugcaccca gugggggagc caggaaguau ugauguuucu gccaguuuag cgucaacacu	60
	ugcugguuuc cucucuggag cauc	84
45	<210> 174 <211> 78 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-543 MI0005565	
50	<400> 174 uacuuuauga gaaguugccc guguuuuuuu cgcuuuuuuu gugacgaaac auucgcggug	60
	cacuucuuuu ucaguauc	78
	<210> 175 <211> 86	

ES 2 666 282 T3

	<212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-548m MI0006400	
5	<400> 175	
	auauuagguu ggugcaaagg uauuuguggu uuuugucauu aaaguaaugc aaaagccaca	60
	aauaccuuug caccaaccua auauua	86
10	<210> 176 <211> 98 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-557 MI0003563	
15	<400> 176	
	agaauaggca aaugaacagu aaauuuggag gccuggggcc cuccugcug cuggagaagu	60
	guuugcacgg gugggccuug ucuuugaaag gaggugga	98
20	<210> 177 <211> 79 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-563 MI0003569	
25	<400> 177	
	agcaaagaag uguguugccc ucuaggaaau guguguugcu cugaugaaau uagguugaca	60
	uacguuuccc ugguaagcca	79
30	<210> 178 <211> 97 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-584 MI0003591	
35	<400> 178	
	uagggugacc agccauuauug guuugccugg gacugaggaa uuugcuggga uaugucaguu	60
	ccaggccaac caggcugguu ggucucccug aagcaac	97
40	<210> 179 <211> 98 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-602 MI0003615	
45	<400> 179	
	uucucacccc cgccugacac gggcgacagc ugcggcccgc uguguucacu cgggccgagu	60
	gcgucuccug ucaggcaagg gagagcagag cccccug	98
50	<210> 180 <211> 97 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-634 MI0003649	
55	<400> 180	

ES 2 666 282 T3

	aaaccacac cacugcauu uggccaucga ggguuugggc uugguguc <u>au</u> gccc <u>ca</u> agau	60
	aaccagcacc ccaacuuugg acagcaugga uuaguc <u>u</u>	97
5	<210> 181 <211> 109 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-767 MI0003763	
10	<400> 181 gcuuuuauau uguagguuuu ugcucaugca ccaugguugu cugagcaugc agcaugcu <u>g</u>	60
	ucugcuc <u>aua</u> ccccaugguu ucugagcag <u>g</u> aaccuuc <u>au</u> gucuacugc	109
15	<210> 182 <211> 81 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-876 MI0005542	
20	<400> 182 ugaagugcug uggauuuc <u>u</u> ugugaauca <u>c</u> cauaucaag cu <u>aa</u> uguggu ggugguuuac	60
	aa <u>g</u> ua <u>au</u> c auagugcu <u>c</u> a	81
25	<210> 183 <211> 77 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-933 MI0005755	
30	<400> 183 acuuggguca guucagaggu ccucggggcg cgcgucgag <u>u</u> cagccgugug cgcagggag <u>a</u>	60
	ccuc <u>u</u> cc <u>ca</u> c ccacag <u>u</u>	77
35	<210> 184 <211> 90 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1225 MI0006311	
40	<400> 184 guggguacg <u>g</u> cccagugggg gggagaggg <u>a</u> cacgcccugg gcucugcc <u>ca</u> gggugcagc <u>c</u>	60
	ggacugacug agcc <u>cu</u> gug ccgccc <u>ca</u> g	90
45	<210> 185 <211> 84 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1234 MI0006324	
50	<400> 185 gugagugugg gguggcuggg gggggggggg gggggccggg gacggcuugg gccugccuag	60
	ucggccugac cacc <u>ca</u> cccc acag	84
	<210> 186 <211> 102	

ES 2 666 282 T3

	<212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1237 MI0006327		
5	<400> 186		
	gugggagggc ccaggcgagg gcaggggugg ggguggcaga ggcuguccc gggggcggg	60	
	ccgaagcgcg ggcaccguaa cuccuucugc uccgucuccc ag	102	
10	<210> 187 <211> 83 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1238 MI0006328		
15	<400> 187		
	gugaguggga gccccagugu gugguugggg ccauggcggg ugggcagccc agccucugag	60	
	ccuuccucgu cugucugccc cag	83	
20	<210> 188 <211> 85 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1244-1 MI0006379		
25	<400> 188		
	aucuuauucc gagcauucca gaaacuuuuu uguguaugua cuuagcugua cuauaaguag	60	
	uugguuugua ugagaugguu aaaaa	85	
30	<210> 189 <211> 85 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1244-2 MI0015974		
35	<400> 189		
	aucuuauucc gagcauucca gaaacuuuuu uguguaugua cuuagcugua cuauaaguag	60	
	uugguuugua ugagaugguu aaaaa	85	
40	<210> 190 <211> 85 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1244-3 MI0015975		
45	<400> 190		
	aucuuauucc gagcauucca gaaacuuuuu uguguaugua cuuagcugua cuauaaguag	60	
	uugguuugua ugagaugguu aaaaa	85	
50	<210> 191 <211> 53 <212> RNA <213> homo sapiens <223> hsa-mir-1825 MI0008193		
55	<400> 191		
	agagacuggg gucgugggc cccuagacu aggacuccag ugcccuccuc ucc	53	

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Método para identificar al menos dos grupos característicos en una población de pacientes en base a la expresión de microARN, donde un grupo característico está asociado con un trastorno reproductivo o un riesgo de desarrollar dicho trastorno, comprendiendo las etapas de:
- a) cuantificación de al menos un microARN de una muestra biológica derivada de células inmunes; y  
b) segregación de la población de pacientes en los grupos en base a la expresión del al menos un microARN.
- 10 **2.** Método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de aislamiento de células mononucleares de la muestra biológica.
- 3.** Método de la reivindicación 2, donde las células mononucleares comprenden células mononucleares de sangre periférica.
- 15 **4.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además la etapa adicional de extracción de ARN que comprende microARN de la muestra biológica.
- 5.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la etapa de segregación de la población de pacientes comprende la asignación de pacientes que expresan un nivel relativamente alto del al menos un microARN a un primer grupo y la asignación de pacientes que expresan un nivel relativamente bajo del al menos un microARN a un segundo grupo.
- 20 **6.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además comprende las etapas de:
- a) cuantificación de al menos un microARN de una muestra biológica derivada de células inmunes de otro paciente; e  
b) identificación del paciente adicional como miembro de uno de los grupos segregados en base a la expresión del al menos un microARN.
- 25 **7.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende la etapa de diagnóstico de un paciente que padece dicho trastorno reproductivo o está en riesgo de desarrollar dicho trastorno en base a su pertenencia a un grupo segregado.
- 8.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el trastorno reproductivo es preeclampsia.
- 30 **9.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el al menos un microARN se selecciona de entre el grupo consistente en hsa-let-7e, hsa-miR-1181, hsa-miR-1183, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1296, hsa-miR-132, hsa-miR-136, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-144, hsa-miR-153, hsa-miR-1537, hsa-miR-154, hsa-miR-191, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-19a, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-29b, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-30e, hsa-miR-32, hsa-miR-33a, hsa-miR-340, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-377, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-432, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-545, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-15a, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-1237, hsa-miR-101, hsa-miR-1539, hsa-miR-557, hsa-miR-125a-3p y hsa-miR-423-5p.
- 35 **10.** Método de la reivindicación 9, donde el al menos un microARN se selecciona de entre el grupo consistente en hsa-miR-136, hsa-miR-141, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-144, hsa-miR-153, hsa-miR-1537, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-29b, hsa-miR-301a, hsa-miR-32, hsa-miR-33a, hsa-miR-545, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-1181, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-132 y hsa-miR-1296.
- 40 **11.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el al menos un microARN se selecciona de entre el grupo consistente en hsa-miR-144, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-1229, hsa-miR-1267, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-1244, hsa-miR-1 y hsa-miR-133b.
- 45 **12.** Método de la reivindicación 11, donde el al menos un microARN se selecciona del grupo consistente en hsa-miR-1229 y hsa-miR-671-3p.
- 50 **13.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el al menos un microARN comprende al menos cuatro microARN seleccionados del grupo consistente en hsa-miR-7-5p, hsa-miR-1229, hsa-miR-1267, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-133b y hsa-miR-33a-5p.

**14.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el un grupo característico está asociado con un riesgo de desarrollar un trastorno reproductivo.

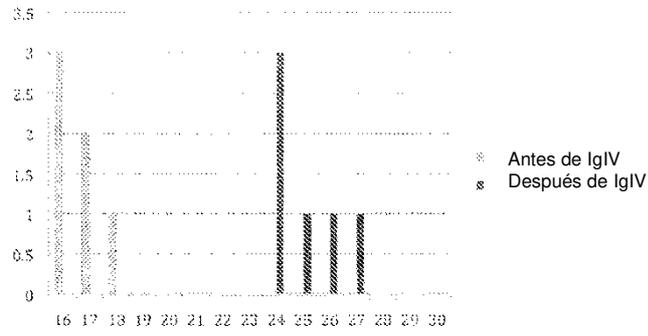


FIG. 1

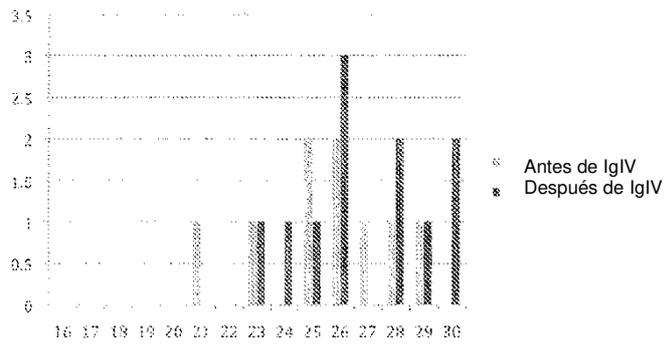


FIG. 2

FIG. 3

Sistema de puntuación de microARN	(XX) H1PL de los 25 mejores	(XX) H1ML de los 25 mejores	Sano + (CH)	Sano (DL)	- Sano (DG)	- Sano (LM)	- Sano (KV)	- Sano (LP)	- Preeclamp (EO)	- Preeclamp (CW)	- Preeclamp (TL)	- Aborto (SR)	- Aborto (ML)	- Aborto (PB)
hsa-miR-144-3p	XX		+1	-1			+1	-1	+1		+1	-1		+1
hsa-miR-582-5p	XX		+1	-1	+1		+1			-1				
hsa-miR-30e-3p	XX		+1	-1		+1	+1							
hsa-miR-34b-5p	XX		+1	+1		+1	+1							
hsa-miR-424-5p	XS		+1	+1		+1	+1							
hsa-miR-109b-5p	XX		+1			+1								
hsa-miR-199b-5p	AA		+1			+1	+1							
hsa-miR-210	XX		+1		+1	+1	+1							
hsa-miR-221-5p	XX		+1	-1		+1	+1		+1	+1				
hsa-miR-33a-5p	XX		+1	+1	-1				-1	-1				+1
hsa-miR-575	AA							+1						
hsa-miR-7-5p	XX		+1			+1	+1		-1	-1				
hsa-miR-1229	XX		+1	+1		+1	+1		-1		-1	-1	+1	-1
hsa-miR-1367	XX		+1	+1		+1	+1		+1		-1	-1	-1	-1
hsa-miR-671-3p	XX		+1	+1		+1	+1		-1		-1	-1	-1	-1
Puntuaciones: Sano (+) No sano (-)			+13 0	+6 -4	+2 -2	+9 0	+11 0	+1 -3	+4 -3	+1 -1	+1 -3	0 -4	+1 -2	+1 -3
hsa-miR-1				-1	+1						-1	-1	-1	-1
hsa-miR-133b				-1	+1						-1	-1	-1	-1
Totales con datos de mir-1 y mir-133b añadidos			+13 0	+6 -6	+4 -2	+9 0	+11 0	+1 -3	+4 -3	+3 -4	+1 -5	0 -6	+1 -4	+1 -5

FIG. 4a

	Media "Antes" Sano	Media Antes Sano	DT	Media "Antes" Preeclampsia	Media Antes Preec	DT	Media "Antes" Aborto	Media Antes Aborto	DT
1	NC1_09900215	3.334493	6.33029	NC1_09900215	3.321443	3.768361	hsa-miR-133b	4.461794	1.638689
2	hsa-miR-1244	3.748536	4.32586	hsa-miR-665	2.717173	1.796999	hsa-miR-1	3.983321	1.610381
3	hsa-miR-609	3.556638	3.830439	hsa-miR-192b	2.586584	3.192311	hsa-miR-142-3p	3.968229	2.2873
4	hsa-miR-196b	3.083116	4.776977	hsa-miR-548m	2.265665	4.389446	hsa-miR-9-3p	3.407726	4.302322
5	hsa-miR-591	2.980426	4.859984	hsa-miR-591	2.296319	3.92377	hsa-miR-350a-3p	3.366019	1.304942
6	hsa-miR-548m	2.830334	4.412853	hsa-miR-1292a	2.237386	4.157492	hsa-miR-314a-3p	2.369195	0.5066
7	hsa-miR-520a-3p	2.997131	3.35775	hsa-miR-219-3p	2.18285	2.789997	hsa-miR-99b-3p	2.338778	3.186704
8	hsa-miR-593-3p	2.80714	4.225766	ebv-miR-BARF110	2.136657	3.424334	hsa-miR-99b-3p	2.338778	3.001946
9	hsa-miR-658	2.668746	3.578648	hsa-miR-41	2.113461	3.493374	hsa-miR-34b-3p	2.138999	2.61197
10	hsa-miR-876-3p	2.580118	3.330418	hsa-miR-615-3p	3.108109	3.764965	hsa-miR-32-3p	2.02635	0.24678
11	hsa-miR-1293a	2.53378	2.827912	hsa-miR-532	2.088228	3.330348	hsa-miR-202-3p	1.993814	1.87219
12	hsa-miR-671-3p	2.494215	3.260563	hsa-miR-593-3p	2.069966	3.55084	hsa-miR-160-3p	1.89935	3.769607
13	hsa-miR-877-3p	2.482469	3.460078	hsa-miR-892b	1.826334	2.291569	hsa-miR-139-3p	1.811185	1.46201
14	hsa-miR-767-3p	2.20392	4.453079	hsa-miR-1244	1.861276	3.773378	hsa-miR-219-3p	1.801948	2.83386
15	hsa-miR-760	2.115636	1.97618	ebv-miR-BARF19	1.845331	3.211955	hsa-miR-313a-3p	1.739667	2.850332
16	hsa-miR-1294	2.096886	3.317396	hcmv-miR-UL22A	1.739067	2.764414	hsa-miR-303	1.746655	1.21396
17	hsa-miR-129-2-3p	1.966632	3.281373	hsa-miR-377-3p	1.696786	3.92276	ebv-miR-BARF110	1.759157	2.104801
18	hsa-miR-624	1.96662	3.009301	hsa-miR-449a	1.661522	1.715752	hsa-miR-601	1.67243	1.586762
19	hsa-miR-299-3p	1.959881	3.733819	hsa-miR-299-3p	1.649677	4.217563	hsa-miR-459a-5p	1.637885	1.037958
20	hsa-miR-897b	1.92681	2.231142	hsa-miR-760	1.589355	3.681783	hsa-miR-328	1.615845	0.399809
21	hsa-miR-588	1.883229	3.794837	hsa-miR-767-3p	1.588244	3.18313	hsa-miR-873-3p	1.591385	1.350631
22	hsa-miR-147b	1.836919	3.314639	hsa-miR-136-3p	1.580481	1.698627	hsa-miR-24-1-5p	1.533836	1.848431
23	hsa-miR-432-3p	1.686645	2.456291	hsa-miR-186-3p	1.537191	3.193308	hsa-miR-628-3p	1.511657	0.797577
24	hsa-miR-12-17a	1.682517	0.361323	hsa-miR-1261	1.528848	2.832913	hcmv-miR-UL22A	1.504229	0.171643
25	hsa-miR-1257	1.659332	4.385741	hsa-miR-501-3p	1.506408	2.156761	hsa-miR-145-3p	1.491292	0.34786
26	ebv-miR-BARF115	1.618116	3.437793	hsa-miR-622	1.457674	2.298189	hsa-miR-486-3p	1.478863	0.73637
27	hsa-miR-615-3p	1.596573	1.323549	hsa-miR-622	1.447182	3.630988	hsa-miR-144-3p	1.446647	2.537337
28	hsa-miR-129-5p	1.549384	4.123531	hsa-miR-889	1.429632	2.162672	hsa-miR-622	1.401164	1.470945

FIG. 4b

29	hsa-miR-557	1.531375	1.8639	hsa-miR-421	1.460155	3.294375	hsa-miR-629-5p	1.430795	0.747796
30	hsa-miR-106a-5p	1.511198	2.800277	hsa-miR-379	1.3810	3.272693	hcmv-miR-U1-79-3p	1.313913	0.617332
31	hsa-miR-546-3p	1.495125	0.401323	hcmv-miR-US2a-2-5p	1.366699	2.371271	hsa-miR-1180	1.466532	1.679762
32	hsa-miR-99a-3p	1.446556	3.797903	hsa-miR-155-3p	1.463314	3.480153	hsa-miR-90a-5p	1.492254	2.296727
33	hsb-miR-5.12.1	1.434166	3.765031	hsa-miR-101-5p	1.34934	3.45624	hsa-miR-309a-3p	1.34622	0.963564
34	hsa-miR-348b-5p	1.467936	3.69207	hsa-miR-633	1.340767	3.370136	hsa-miR-377-3p	1.293135	1.877333
35	hsa-miR-637	1.461352	3.710337	hsa-miR-87b-3p	1.400211	3.352852	hsa-miR-664-5p	1.351045	3.271423
36	hsa-miR-1265	1.447976	3.661375	hsa-miR-634	1.298376	2.282223	hsa-miR-1299	1.247684	0.408641
37	hsa-miR-433	1.443536	3.662339	hsa-let-7c-1/16.0	1.231114	1.864706	hsa-miR-153-5p	1.240736	1.993859
38	hsa-miR-769-5p	1.436556	1.632537	hsa-miR-539-5p	1.179739	2.802165	hsa-miR-345-3p	1.22938	1.430402
39	hsa-miR-1258	1.427336	3.504703	hsa-miR-1306-3p	1.157961	0.531152	hsa-miR-139-3p	1.211683	0.841759
40	hsa-miR-196b-3p	1.419123	3.564376	hsa-miR-317-5p	1.137214	2.339218	hsa-miR-542-5p	1.210391	0.201447
41	hsa-miR-1281	1.401192	2.979547	h1c1-miR-N367	1.135116	1.786815	hsa-miR-385-3p	1.207789	0.220736
42	hsa-miR-616-3p	1.399998	3.482946	hsa-miR-123b-2	1.034793	1.569392	hsa-miR-499a-5p	1.148422	2.633578
43	hsa-miR-552	1.391822	3.170110	hsa-miR-9-3p	1.052935	2.182107	hsa-miR-456-5p	1.147674	0.802188
44	hsa-miR-455-3p	1.369372	3.339225	hsa-miR-545-3p	1.050888	1.516526	hsa-miR-123a-3p	1.146593	0.449681
45	hsa-miR-1539	1.360964	2.015753	hsa-miR-516a-5p	1.034263	1.915235	hsa-miR-192-3p	1.129006	0.676563
46	gby-miR-BAR118-3p	1.348596	3.329665	hsa-miR-506a-5p	1.033986	3.03469	hsa-miR-304-3p	1.109898	2.025495
47	hsa-miR-320a	1.329123	1.479986	hsa-miR-209-3p	1.013955	2.201857	hsa-miR-301-5p	1.085334	0.537141
48	hsa-miR-1234	1.30135	1.95475	hsa-miR-610	1.010296	1.25746	hsa-miR-628-3p	1.053405	0.841167
49	hsa-miR-3486-5p	1.287321	3.273812	hsa-miR-601	0.984836	2.134891	hcmv-miR-US25-2	1.04833	0.171843
50	hsa-miR-222-3p	1.28243	1.78216	hsa-miR-1294	0.952948	1.663865	hsa-miR-316a-3p	1.043399	1.488375
51	hsa-miR-33b-3p	1.27533	2.063179	hsa-miR-127-3p	0.937771	2.092267	hsa-miR-101-3p	1.036483	1.703027
52	hsa-miR-425-3p	1.264991	2.043319	hsa-miR-548b-5p	0.937744	1.765748	hsa-miR-376b	1.076811	0.655091
53	hsa-miR-659-3p	1.264417	3.680362	hsa-miR-765	0.934661	2.295659	hsa-miR-377-5p	1.024363	0.534744
54	hsa-miR-377-5p	1.25803	3.555861	hcmv-miR-U1.26	0.93321	1.631815	hsa-miR-583-3p	1.01892	1.065199
55	hsa-miR-191-3p	1.251335	2.134976	hsa-miR-34a-5p	0.865398	1.595825	hsa-miR-10b-3p	1.04405	1.228876
56	hsa-miR-885-3p	1.24318	2.291633	hsa-miR-769-5p	0.848849	1.976229	hsa-miR-191a-5p	0.999732	1.818222
57	hsa-miR-1228	1.236448	2.032915	hsa-miR-113b	0.846931	2.447376	hsa-miR-679-3p	0.99683	1.279337
58	hsa-miR-1221-3p	1.230709	2.033038	hsa-miR-758	0.832596	3.236465	hsa-miR-1531	0.985167	1.212751

FIG. 4c

59	hsa-miR-298	1.240091	3.455639	hsa-miR-1299	0.327438	1.559853	hsa-miR-371	0.91514	3.042029
60	hsa-miR-46-3p	1.229159	2.017379	hsa-miR-582-3p	0.327323	2.016675	hsa-miR-1300_v13.0	0.818165	0.801095
61	hsa-miR-147-5p	1.227825	1.591457	hsa-miR-196-3p	0.792918	1.4346	hsa-miR-1290	0.914126	0.184185
62	hsa-miR-933	1.196817	2.270512	hsa-miR-3765	0.777654	1.875396	hsa-miR-132-3p	0.908233	0.153463
63	hsa-let-7b-3p	1.180332	2.188573	hsa-miR-327a	0.783696	1.633588	hsa-let-7c*_v16.0	0.961921	0.171642
64	hsa-miR-1228-3p	1.164218	1.821928	hsa-miR-147b	0.749093	1.644173	hsa-miR-330-3p	0.898338	0.576045
65	chr-miR-BAR112	1.143034	1.538336	hsa-let-7c-3p	0.747855	2.115797	hsa-miR-9c-3p	0.88624	2.943648
66	hsa-miR-186-5p	1.126554	1.461685	hsa-miR-432-5p	0.741177	2.791788	hsa-miR-182-5p*	0.83614	1.992017
67	hsa-miR-758	1.123279	2.859153	hsa-miR-141-3p	0.718403	0.883999	hsa-miR-337-5p	0.870168	1.676099
68	hsa-miR-1825	1.120504	1.756384	hsa-miR-21-3p	0.698671	0.900777	hsa-miR-28-3p	0.862478	0.215171
69	hsa-miR-602	1.12521	2.541844	hsa-miR-93	0.696189	0.845591	hsa-miR-671-5p	0.862692	4.53168
70	hsa-miR-940	1.124326	1.443883	hsa-miR-502-5p	0.693236	1.957498	hsa-miR-99b-3p	0.859101	1.986796
71	hsa-let-7f1-3p	1.114876	1.615718	hsa-miR-186-3p	0.690655	1.556228	hsa-miR-512-3p	0.827432	3.572267
72	hsa-miR-711-3p	1.110198	2.430542	hsa-miR-222-3p	0.689848	1.486661	hsa-miR-153	0.828221	0.688177
73	hsa-miR-505a-5p	1.109483	1.36493	hsa-miR-99b-5p	0.679127	1.611841	hsa-miR-619	0.821058	0.19935
74	hsa-miR-186-3a	1.107598	3.444947	hsa-let-7b-5p	0.656173	1.517623	hsa-miR-146-3p	0.809418	0.509532
75	hsa-miR-376b	1.101389	1.646874	hsa-miR-131-5p	0.640928	1.974952	hsa-miR-129-5p	0.798113	0.496344
76	hsa-let-7c*_v16.0	1.088142	2.544895	hsa-miR-130b-3p	0.638302	3.269926	hsa-miR-9b-5p	0.786971	0.165697
77	hsa-miR-550a-5p	1.087227	2.096641	hsa-miR-28-3p	0.634616	1.316512	hsa-miR-371a-5p	0.791299	1.296666
78	hsa-miR-337-5p	1.043103	1.872942	hsa-miR-1306_v13.0	0.620962	3.800193	hsa-miR-27-5p	0.786992	0.820266
79	hsa-let-7c	1.013497	1.246551	hsa-miR-200c-3p	0.60822	3.12182	hsa-miR-133a	0.785563	0.819173
80	hsa-miR-563	0.983372	2.336981	hsa-let-7f1-1-3p	0.596555	1.316128	hsa-miR-154-3p	0.785346	1.197068
81	hsa-miR-1280	0.982551	1.109547	hsa-miR-145a-5p	0.586656	1.35728	hsa-miR-151a	0.779927	1.763198
82	hsa-miR-431-5p	0.969685	2.176756	hsa-miR-1825	0.578224	1.536318	hsa-miR-588a	0.776873	0.393503
83	hsa-miR-154-5p	0.958627	1.86412	chr-miR-X12.0*	0.579072	1.922534	hsa-miR-181c-3p	0.776283	2.317203
84	chr-miR-1575-2-5p	0.946268	2.558207	hsa-miR-125a-3p	0.576251	1.086565	hiv1-miR-H1	0.747207	3.436607
85	hsa-miR-550a-3p	0.9307	3.369231	hsa-let-7c	0.569225	1.363879	hsa-miR-941	0.743744	0.365337
86	hsa-miR-673	0.928055	3.507121	chr-miR-BAR13*	0.56029	3.072616	hsa-miR-423-3p	0.743549	0.404747
87	hsa-miR-196b-5p	0.924504	1.510134	hsa-miR-159-5p	0.559834	0.566237	hsa-miR-132-3p	0.73459	0.623896
88	hsa-miR-125a-3p	0.905069	1.230784	hsa-miR-140-5p	0.5586	0.913371	hsa-miR-181c-5p	0.732213	0.72206

FIG. 4d

89	hsa-miR-144-5p	0.858965	1.289333	hsa-miR-142-3p	0.498866	1.011202	hsa-miR-183-5p	0.731948	0.420282
90	hsa-let-7b-5p	0.854819	1.204581	hsa-miR-154-5p	0.546030	1.635098	hsa-miR-133b-5p	0.231749	0.398882
91	miR-1	0.851422	1.241885	hsa-miR-326c	0.545883	0.819150	hsa-miR-654-5p	0.716028	1.572757
92	hsa-miR-375-3p	0.841198	0.301833	hsa-miR-1261	0.542178	1.442687	hcmv-miR-US4	0.712165	1.064355
93	hsa-miR-219-5p	0.840484	1.661813	hsa-miR-330b	0.539466	0.787158	hsa-miR-582-5p	0.706488	0.386261
94	hsa-miR-221-3p	0.833192	1.754222	hmv-miR-K12-13b	0.533235	1.268951	hsa-miR-128-5p	0.697798	0.375333
95	hsa-miR-766-3p	0.821535	1.116148	hsa-miR-1530	0.523958	1.442767	hsa-miR-456-5p	0.694358	0.520792
96	hsa-miR-202-3p	0.817797	2.678342	hsa-miR-130a-3p	0.517193	1.523677	hsa-miR-144-3p	0.659887	2.218069
97	hsa-miR-34b-5p	0.808641	2.757581	hsa-miR-886	0.495317	1.018042	hsa-miR-224-3p	0.689345	2.702026
98	hsa-miR-501-5p	0.800112	2.089136	chr-miR-BA317.2	0.487554	1.751196	hcmv-miR-113b	0.679794	0.697694
99	hsa-miR-31a-5p	0.791693	1.257785	hsa-miR-334-3p	0.478691	0.792039	hsa-miR-148a-3p	0.668692	0.342177
100	hsa-miR-132-5p	0.791534	1.081223	hsa-let-7d-5p	0.481647	1.232212	hsa-miR-181a-2-3p	0.559946	0.902183
1	hsa-miR-19b-1-3p	1.84708	2.119528	hsa-miR-625-5p	-0.31357	0.923	hsa-miR-70b-3p	-0.35267	0.453183
2	hsa-miR-497-3p	-1.83841	3.10774	hsa-miR-1273	-0.52069	1.550267	hsa-miR-502-3p	-0.35289	0.31178
3	3p_v15.0	-1.88618	1.748513	hsa-miR-135d-5p	-0.528637	0.738108	hsa-miR-501a-5p	-0.50953	0.857981
4	hsa-miR-135a-3p	-1.89636	2.868829	hsa-let-7f-5p	-0.52868	0.833112	hsa-miR-23a-3p	-0.38937	1.136294
5	hsa-miR-664-5p	-1.99565	2.580377	hsa-miR-333-3p	-0.54125	1.296131	hsa-miR-940	-0.39939	1.031192
6	hsa-miR-334c-5p	-1.99175	0.60976	hsa-miR-181d	-0.54637	2.265316	hsa-miR-146-5p	-0.39363	0.157652
7	hsa-miR-377c	-1.92647	0.849715	hsa-miR-136-5p	-0.55586	1.319844	hsa-miR-195a-3p	-0.39476	1.086556
8	hsa-miR-561-3p	-1.93845	1.303636	hsa-miR-24-3p	-0.57861	0.798204	hsa-miR-296-5p	-0.39764	0.723714
9	hsa-miR-695-3p	-1.9521	0.442561	hsa-miR-223-5p	-0.5975	1.541955	hsa-miR-180b-3p	-0.412	0.79689
10	hsa-miR-584-3p	-1.96313	0.657635	hsa-miR-131a-2	-0.5991	1.432299	hsa-miR-638	-0.42343	1.131159
11	hsa-miR-531b-3p	-1.97114	0.724837	hsa-miR-192b-3p	-0.61868	2.600231	hsa-miR-190-1-5p	-0.42904	0.856657
12	hsa-miR-23b-3p	-1.98163	0.766977	hsa-miR-548c-5p	-0.62095	1.36812	hsa-miR-494	-0.44861	1.385003
13	hsa-miR-1286	-1.99372	2.635023	hsa-miR-296-5p	-0.63336	1.682331	hsa-miR-299b-5p	-0.4479	1.086596
14	hsa-miR-32-3p	-1.99371	0.301373	hsa-miR-365a-3p	-0.65862	1.223264	hsa-miR-572-5p	-0.46973	0.21579
15	hsa-miR-361-5p	-1.99921	1.10255	hsa-miR-582-5p	-0.66528	3.678997	hsa-miR-148b-5p	-0.46425	0.731505
16	hsa-miR-378_v17.0	-2.01533	1.911758	hsa-miR-245-7p	-0.66889	2.304641	hsa-miR-501-5p	-0.46461	1.618325
17	hsa-miR-98	-2.01351	2.038896	hsa-miR-32-5p	-0.66278	3.82397	hsa-miR-212-3p	-0.4748	0.111358
18	hcmv-miR-1170-3p	-2.03041	2.820373	hsa-miR-23a-3p	-0.6729	1.617962	hsa-miR-32a-3p	-0.4748	0.580199

FIG. 4c

19	hsa-miR-571-3p	4.718371	-2.05435	hsa-miR-132-5p	-0.67487	1.95624	hsa-miR-939	0.48654	0.919918
20	hsa-miR-564	3.694079	-2.10271	hsa-miR-32-3p	-0.69219	3.792233	hsa-miR-1228-3p	-0.49183	0.81666
21	hsa-miR-560-5p	1.62502	-2.06409	hsa-miR-98	-0.71124	1.538173	hsa-miR-15b-3p	-0.51778	0.329568
22	hsa-miR-30b-3p	1.817395	-2.08231	hsa-miR-191b-1-3p	-0.71891	2.361296	hsa-miR-200c-3p	-0.51922	0.171643
23	hsa-miR-390-3p	1.680134	-2.1	hsa-miR-7-5p	-0.71868	1.741647	hsa-miR-79	-0.52246	1.66975
24	hsa-miR-874	3.073925	-2.10135	hsa-miR-624-3p	-0.72806	1.955477	hsa-miR-314-5p	-0.56215	1.968288
25	hsa-miR-192-5p	1.77767	-2.09072	hsa-miR-199b-5p	-0.72227	1.852483	hsa-miR-224-5p	-0.56633	0.154783
26	hsa-miR-542-3p	3.488371	-2.11264	hsa-miR-1226-5p	-0.73938	3.712038	hsa-miR-1308-v15.0	-0.57283	0.411177
27	hsa-miR-185-5p	0.659478	-2.18459	hsa-miR-148b-3p	-0.74215	1.193364	hsa-miR-176b-5p	-0.58327	1.408939
28	hsa-miR-518am-5p	2.973847	-2.19846	hsa-miR-1202	-0.76007	1.540864	hsa-miR-215	-0.59073	1.470189
29	hsa-miR-148b-3p	1.585119	-2.19914	hsa-miR-493-5p	-0.76439	3.949307	hsa-miR-377-3p	-0.60831	0.717534
30	hsa-miR-505-5p	3.121873	-2.15447	hsa-miR-523-v12.0	-0.79733	1.932252	hsa-miR-193b-3p	-0.61263	1.185605
31	hsa-miR-212-3p	3.764003	-2.22976	hsa-miR-30c-3p	-0.80857	1.208657	hsa-miR-1915-3p	-0.61765	0.784323
32	hsa-miR-301-3p	1.570397	-2.24263	hsa-miR-630	-0.81358	1.681724	hsa-miR-376c	-0.6186	0.375231
33	hsa-miR-495	3.605864	-2.23825	hsa-miR-15b-3p	-0.82235	1.66637	hsa-miR-378-v17.0	-0.62737	0.760725
34	hsa-miR-639-5p	3.469389	-2.28114	hsa-miR-196a-5p	-0.85227	3.556877	hsa-miR-379-1-3p	-0.63011	0.644428
35	hsa-miR-132-3p	2.77778	-2.30628	hsa-miR-99b-5p	-0.85636	1.790877	hsa-miR-BART12	-0.63536	0.501831
36	hsa-miR-177-3p	3.37778	-2.36517	hsa-miR-627	-0.86639	3.146168	hsa-miR-591-3p	-0.66202	1.302136
37	hsa-miR-376a-3p	3.809388	-2.32221	hsa-miR-175a-5p	-0.86741	3.096668	hsa-miR-1171	-0.68409	0.789134
38	hsa-miR-126-5p	3.521572	-2.27189	hsa-miR-812-3	-0.86891	1.848839	hsa-miR-32-5p	-0.69416	1.30198
39	hsa-miR-425-3p	1.273586	-2.41455	hsa-miR-584-5p	-0.87538	1.989875	hsa-miR-449a	-0.70011	2.782399
40	hsa-miR-627	3.613617	-2.43302	hsa-miR-1274a-v16.0	-0.88676	1.031872	hsa-miR-141-3p	-0.71079	1.64552
41	hsa-miR-16-2-3p	3.882737	-2.46337	hsa-miR-30a-3p	-0.89216	1.603778	hsa-miR-31-5p	-0.71484	3.501488
42	hsa-miR-572-3p	3.538184	-2.47835	hsa-miR-556a-3p	-0.89444	0.22359	hsa-miR-572	-0.71621	0.843521
43	hsa-miR-301b	3.323783	-2.4864	hsa-miR-624-5p	-1.02335	1.464817	hsa-miR-31-5p	-0.72351	0.602708
44	hsa-miR-598	2.5385	-2.5385	hsa-miR-617a	-1.02636	3.943064	hsa-miR-222-5p	-0.729	0.411936
45	hsa-miR-22-5p	3.064847	-2.5631	hsa-miR-1271-5p	-1.03713	2.160764	hsa-miR-493	-0.74913	3.108315
46	hsa-miR-457a-5p	4.089208	-2.56563	hsa-miR-193a-5p	-1.04098	1.977531	hsa-miR-20b-1-5p	-0.76181	0.159319
47	hsa-miR-125a-5p	3.72498	-2.59139	hsa-miR-301b	-1.0624	2.997112	mi_r	-0.76737	0.98072
48	hsa-miR-152	3.399654	-2.61774	hsa-miR-100-5p	-1.07984	3.273841	hsa-miR-1274b-v16.0	-0.78241	1.940599

FIG. 4f

49	hsa-miR-95	-2.67179	3.533743	hsa-miR-182b_v15.0	-1.08616	3.252938	hsa-miR-410	-0.7851	0.852289
50	hsa-miR-181c-5p	-2.67784	4.097739	hsa-miR-874	-1.16074	3.264894	hsa-miR-31-5p	-0.83732	1.092263
51	hsa-miR-199a-5p	-2.70055	6.744756	hsa-miR-638-5p	-1.22591	2.961516	hsa-miR-886-3p_v15.0	-0.86091	0.707879
52	hsa-miR-395	-2.70478	0.985221	hsa-miR-629-5p	-1.22721	2.438238	hsa-miR-33a-5p	-0.87519	1.288763
53	hsa-miR-663a	-2.70759	3.038807	hsa-miR-671-5p	-1.23133	4.164690	hsa-miR-429-3p	-0.89147	0.984811
54	hsa-miR-181a-3p	-2.72232	4.041121	hsa-miR-170-3p	-1.23666	3.118602	hsa-miR-493-5p	-0.91057	1.296354
55	hsa-miR-510-3p	-2.73069	3.14524	hsa-miR-144-5p	-1.23933	4.941313	hsa-miR-497-5p	-0.91157	1.323686
56	hsa-miR-133-3p	-2.76975	3.48422	hsa-miR-538	-1.23655	2.570294	hsa-miR-1170	-0.94927	2.408907
57	hsa-miR-484	-2.81897	3.548757	hsa-miR-200b-3p	-1.23703	2.490162	hsa-miR-139-5p	-1.01704	2.342109
58	hsa-miR-123b-5p	-2.85685	4.47146	hsa-miR-663a	-1.25057	3.811537	hsa-miR-358	-1.06704	0.495983
59	hsa-miR-335-5p	-2.89269	4.275335	hsa-miR-234-5p	-1.25266	3.660703	hsa-miR-1234	-1.07894	1.120009
60	hsa-miR-92-5p	-2.88953	3.506163	hsa-miR-308-3p	-1.26295	1.971443	hsa-miR-1183	-1.08277	1.498269
61	hsa-miR-128	-2.92329	1.379394	hsa-miR-1181	-1.26244	3.763091	hsa-miR-1229	-1.10048	2.443652
62	hsa-miR-193a-3p	-2.9872	3.878634	hsa-miR-630a-5p	-1.24391	2.831664	hsa-miR-760	-1.16731	1.238299
63	ctbv-miR-RAR113	-3.02225	4.464567	hsa-miR-212-3p	-1.24688	2.345792	hsa-miR-129-2-5p	-1.17664	1.926568
64	hsa-miR-128b	-3.02436	4.400287	hsa-miR-31-3p	-1.25753	2.671285	hsa-miR-181a-3p	-1.21542	0.427486
65	hsa-miR-362-5p	-3.03915	4.647199	hsa-miR-96a-5p	-1.26939	3.647229	hsa-miR-487b	-1.26406	0.742852
66	hsa-miR-150-3p	-3.05205	2.739784	hsa-miR-483-5p	-1.26571	4.149657	hsa-miR-129-1-3p	-1.27715	2.267672
67	hsa-miR-10a-5p	-3.09647	4.416394	hsa-miR-564	-1.28272	3.340222	hsa-miR-1238	-1.30612	1.496262
68	hsa-miR-696-3p	-3.11797	4.587682	hsa-miR-629-3p	-1.29253	1.55338	hsa-miR-21-3p	-1.30923	0.24277
69	hsa-miR-200c-3p	-3.13358	4.053548	hsa-miR-1246	-1.29292	2.311899	hsa-miR-598	-1.32505	0.318863
70	hsa-miR-96-5p	-3.15741	4.786161	hsa-miR-664-5p	-1.26115	2.437999	hsa-miR-182b_v15.0	-1.34032	1.121016
71	hsa-miR-221-5p	-3.16691	4.418635	hsa-miR-410	-1.29316	4.188034	hsa-miR-370-3p	-1.34163	1.393188
72	hsa-miR-7-5p	-3.19972	5.279069	hsa-miR-139-5p	-1.26763	2.815386	hsa-miR-95	-1.34884	1.305956
73	hsa-miR-453-5p	-3.20945	3.591957	ctbv-miR-BAR113	-1.26494	4.672887	hsa-miR-452-3p	-1.3532	1.292454
74	hsa-miR-362-3p	-3.20974	4.134484	hsa-miR-684-3p	-1.26407	2.975777	hsa-miR-382-3p	-1.41183	1.078912
75	hsa-miR-17-3p	-3.21421	4.18144	hsa-miR-505-5p	-1.26846	3.421086	hsa-miR-1225-3p	-1.42623	1.629134
76	hsa-miR-625-5p	-3.22121	1.421968	hsa-miR-362-3p	-1.26059	4.557966	hsa-miR-602	-1.45779	1.496795
77	hsa-miR-194-5p	-3.23449	4.384355	hsa-miR-16-2-3p	-1.26535	3.466504	hsa-miR-550a-5p	-1.46398	1.868986
78	hsa-miR-18a-5p	-3.26651	1.261425	hsa-miR-200c-3p	-1.26613	4.58415	hsa-miR-191-3p	-1.51786	1.699917

FIG. 4g

79	hsa-miR-223-3p	-3.26668	4.721784	hsa-miR-1288	-1.87037	4.321855	hsa-miR-170	-1.53109	1.74882
80	hsa-miR-210	-3.43117	4.073672	hsa-miR-1249	-1.88256	3.415975	hsa-miR-1237	-1.59183	1.656555
81	hsa-miR-144-3p	-3.43247	5.952895	hsa-miR-1201	-1.89669	3.519258	hsa-miR-504	-1.59206	1.579623
82	hsa-miR-424-3p	-3.46198	5.74535	hsa-miR-133a-3p	-1.92692	3.67155	hsa-miR-33b-3p	-1.5973	1.96265
83	hsa-miR-565a-3p	-3.46924	4.771865	hsa-miR-150-3p	-1.93779	3.569692	hsa-miR-475-3p	-1.60025	2.63952
84	hsa-miR-575	-3.49217	5.069059	hsa-miR-532-3p	-2.00081	3.32474	hsa-miR-1506-3p	-1.60775	0.546668
85	hsa-miR-1914-3p	-3.53853	4.91157	hsa-miR-335-5p	-2.01496	4.05042	hsa-miR-1281	-1.60842	1.378963
86	hsa-miR-1305	-3.57207	4.945917	hsa-miR-132-5p	-2.02067	2.835977	hsa-miR-362-3p	-1.60953	0.673554
87	hsa-miR-340-3p	-3.57728	4.630331	hsa-miR-22-5p	-2.11133	3.487385	hsa-miR-1570	-1.6146	1.907587
88	hsa-miR-538-3p	-3.61556	5.722512	hsa-miR-181a-3p	-2.12647	3.535919	hsa-miR-1576	-1.62737	1.99759
89	hsa-miR-1349	-3.64893	3.250472	hsa-miR-377-3p	-2.13639	3.61936	hsa-miR-149-5p	-2.03968	1.971118
90	hsa-miR-532-5p	-3.65228	4.661727	hsa-miR-194-5p	-2.18277	4.314935	hsa-miR-933	-2.04289	2.382864
91	hsa-miR-7-1-3p	-3.66228	4.976572	hsa-miR-191a-3p	-2.19157	5.094969	hsa-miR-1267	-2.05924	2.40811
92	hsa-miR-423-5p	-3.71499	4.891737	hsa-miR-145-5p	-2.2128	2.152312	hsa-miR-502-5p	-2.06665	0.834835
93	hsa-miR-144-5p	-3.79693	5.823154	hsa-miR-158-5p	-2.24025	3.169899	hsa-let-7b-3p	-2.08466	1.720142
94	hsa-miR-148a-3p	-3.79779	2.379934	hsa-miR-1305	-2.32712	4.928916	hsa-miR-127-3p	-2.10825	2.016681
95	hsa-miR-215	-3.83523	4.366242	hsa-miR-674-3p	-2.34452	2.737948	hsa-let-7f1-3p	-2.11879	1.961772
96	hsa-miR-567-5p	-3.92764	5.2731	hsa-miR-134	-2.44355	3.68026	hsa-miR-1825	-2.16438	1.934723
97	hsa-miR-199b-5p	-3.9381	5.037471	hsa-miR-215	-2.46316	4.715775	hsa-miR-563	-2.20872	2.230137
98	hsa-miR-340-3p	-4.15534	5.279681	hsa-miR-495	-2.47228	3.214964	hsa-miR-93b-3p	-2.23093	2.539742
99	hsa-miR-30e-3p	-4.19223	5.222365	hsa-miR-7-1-3p	-2.63328	4.759686	hsa-miR-557	-2.91744	2.560249
100	hsa-miR-301a-3p	-4.54215	4.817598	hsa-miR-423-5p	-2.7936	4.659512	hsa-miR-331	-3.06837	2.057993

FIG. 5a

	Dif. Media Sano – Media Preec IatV*	Media Antes Sano	Media Antes Preec	Dif.	Dif. Media Sano – Media Aborto "Antes de IatV"	Media Antes Sano	Media Antes Aborto	Dif.
1.	hsa-miR-609	3.55648	0.091103	3.465346	NC1_00000215	5.524493024	-0.03373	5.568228
2.	hsa-miR-520d-3p	2.807154	0.091103	2.716051	hsa-miR-557	1.531374545	-2.91744	4.448815
3.	hsa-miR-877-3p	2.482889	-0.16059	2.643281	hsa-miR-1244	3.748555627	-0.20282	3.951379
4.	hsa-miR-658	2.668746	0.147621	2.521125	hsa-miR-876-3p	2.580118356	-1.34163	3.921746
5.	hsa-miR-671-3p	2.494625	0.081406	2.413219	hsa-miR-609	3.556648318	-0.09025	3.646901
6.	hsa-miR-196a-3p	1.511198	-0.85327	2.36447	hsa-miR-1825	1.12520995	-2.20438	3.329593
7.	NC1_00000215	5.534493	3.321342	2.213151	hsa-miR-760	2.115633943	-1.16751	3.283447
8.	hsa-miR-588	1.783329	-0.24944	2.03277	hsa-let-7b-3p	1.180341993	-2.08466	3.265001
9.	hsa-miR-548d-5p	1.287321	-0.62095	1.908269	hsa-miR-149-5p	1.227844976	-2.00968	3.237529
10.	hsa-miR-1244	3.748556	1.861274	1.887282	hsa-let-7f-1-3p	1.110498317	-2.11879	3.229286
11.	hsa-miR-550a-3p	0.9307	-0.89444	1.825137	hsa-miR-933	1.196317413	-2.01289	3.209403
12.	hsa-miR-193a-5p	0.665019	-1.04804	1.713055	hsa-miR-1539	1.350064004	-1.8546	3.204667
13.	hsa-miR-1470	1.733619	0.04275	1.690868	hsa-miR-563	0.983371638	-2.20872	3.192094
14.	hsa-miR-129-2-3p	1.999632	0.326515	1.673117	hsa-miR-129-2-3p	1.999632068	-1.17664	3.176268
15.	ebv-miR-BART15	1.618116	-0.00996	1.628074	hsv1-miR-H16-3p	1.229159283	-1.87237	3.101533
16.	kshv-miR-K12-12*	1.682717	0.091103	1.591615	hsa-miR-1281	1.401101813	-1.69442	3.095523
17.	hsa-miR-1257	1.659302	0.147621	1.511682	hsa-miR-190b	3.083119458	0.025053	3.058066
18.	hsa-miR-129-5p	1.539384	0.051742	1.487641	hsa-miR-432-5p	1.686464728	-1.3532	3.039664
19.	hsa-miR-557	1.531375	0.11115	1.420225	hsa-miR-591	2.980426041	-0.03373	3.014861
20.	hsa-miR-602	1.124336	-0.28154	1.405862	hsa-miR-548m	2.820333742	-0.18162	3.001951
21.	hsa-miR-34b-3p	1.495525	0.091103	1.404422	hsa-miR-97b-3p	0.701754683	-2.23093	2.932681
22.	hsa-miR-563	0.983372	-0.39492	1.378291	hsa-miR-520d-3p	2.807154102	-0.09025	2.897407
23.	hsa-miR-654-3p	-0.98258	-2.34452	1.361945	hsa-miR-33b-3p	1.275329512	-1.5972	2.872527
24.	hsa-miR-99a-3p	1.48656	0.147621	1.33894	hsa-miR-425-3p	1.264991165	-1.60025	2.86524
25.	kshv-miR-K12-1	1.474166	0.147621	1.326545	hsa-miR-593-3p	2.807139874	-0.03373	2.840875

FIG. 5b

1.	hsa-miR-128	-2.92329	-0.13201	-2.79128	hsa-miR-629-5p	-2.281138012	1.430793	-3.71193
2.	hsa-miR-365a-3p	-3.46924	-0.65862	-2.81062	hsa-miR-99b-5p	-1.379151954	2.35087	-3.73002
3.	hsa-miR-181c-5p	-2.67784	0.218005	-2.89585	hsa-miR-7-1-3p	-3.667227573	0.065864	-3.73314
4.	hsa-miR-99a-5p	-3.11797	-0.12451	-2.99346	hsa-miR-125a-5p	-2.591287473	1.146591	-3.73788
5.	hsa-miR-221-5p	-3.1991	-0.2049	-2.9942	hsa-miR-7-5p	-3.199718365	0.599649	-3.79937
6.	hsa-miR-152	-2.61774	0.41265	-3.03039	hsa-miR-365a-3p	-3.469238471	0.344892	-3.81413
7.	hsa-miR-665	-0.56973	2.471473	-3.04121	hsa-miR-424-5p	-3.46197997	0.363093	-3.82507
8.	hsa-miR-338-3p	-3.63586	-0.54126	-3.0946	hsa-miR-340-3p	-3.577283913	0.28484	-3.86212
9.	hsa-miR-210	-3.42117	-0.3216	-3.09957	hsa-miR-423-5p	-3.714991637	0.207289	-3.92228
10.	hsa-miR-532-5p	-3.65228	-0.51087	-3.14142	hsa-miR-483-5p	-3.209448978	0.731046	-3.9405
11.	hsa-miR-340-3p	-3.57728	-0.42253	-3.15475	hsa-miR-96-5p	-3.157413155	0.796971	-3.95438
12.	hsa-miR-199b-5p	-3.9391	-0.72521	-3.21389	hsa-miR-338-3p	-3.635855737	0.370569	-4.00642
13.	hsa-miR-362-5p	-3.03915	0.18562	-3.22477	hsa-miR-32-3p	-1.998712583	2.02635	-4.02506
14.	hsa-miR-136-5p	-1.68987	1.560481	-3.25035	hsa-miR-133b	0.347828087	4.461789	-4.11396
15.	hsa-miR-582-5p	-3.92764	-0.67487	-3.25278	hsa-miR-144-3p	-3.4324734	0.689897	-4.12237
16.	hsa-miR-18a-5p	-3.26451	-0.06607	-3.25844	hsa-miR-450a-5p	-2.56563075	1.637885	-4.20352
17.	hiv1-miR-H1	-1.19437	2.113461	-3.30783	hsa-miR-1249	-3.648934932	0.584227	-4.23316
18.	hsa-miR-575	-3.49217	-0.14572	-3.34645	hsa-miR-340-5p	-4.155558283	0.184575	-4.34011
19.	hsa-miR-95	-2.67179	0.696189	-3.36798	hsa-miR-199b-5p	-3.93910499	0.451691	-4.3902
20.	hsa-miR-30e-3p	-4.19223	-0.80857	-3.38365	hsa-miR-148a-3p	-3.79779434	0.664992	-4.46279
21.	hsa-miR-340-5p	-4.15554	-0.66089	-3.49464	hsa-miR-301a-3p	-4.542152253	-0.05789	-4.48426
22.	hsa-miR-17-3p	-3.21421	0.299228	-3.51344	hsa-miR-30e-3p	-4.192225473	0.303459	-4.49568
23.	hsa-miR-148a-3p	-3.79779	-0.14621	-3.65159	hsa-miR-582-5p	-3.927643047	0.706488	-4.63413
24.	hsa-miR-144-3p	-3.43247	0.242774	-3.67525	hsa-miR-1	-0.804063357	3.989321	-4.79338
25.	hsa-miR-301a-3p	-4.54215	-0.22431	-4.31784	hsa-miR-144-5p	-3.795031715	1.449947	-5.24498