

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 360**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2015 PCT/EP2015/064534**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15197824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2015 E 15731937 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3161148**

54 Título: **Uso de ácidos nucleicos y miARN en un método no invasivo para determinar la calidad del embrión**

30 Prioridad:

27.06.2014 EP 14306040

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

30.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 776 360 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

Uso de ácidos nucleicos y miARN en un método no invasivo para determinar la calidad del embrión

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere en general al campo de la medicina reproductiva. De manera más específica, la presente invención se refiere a métodos para determinar la calidad de un embrión.

10 **Estado de la técnica**

Actualmente, la selección de los embriones con el mayor potencial de implantación durante los procedimientos de tecnología de reproducción asistida (TRA) se basa únicamente en criterios morfológicos. Recientemente, se ha descrito un nuevo método basado en imágenes a intervalos de tiempo para la adquisición de datos morfocinéticos de los embriones para ayudar a dicha selección (Meseguer *et al.*, 2011; Herrero and Meseguer, 2013). Sin embargo, la observación subjetiva de la morfología embrionaria para predecir una gestación exitosa muestra limitaciones (Guerif *et al.*, 2007; Assou *et al.*, 2008; Aydiner *et al.*, 2010; Assou *et al.*, 2010). Por lo tanto, muchos trabajos recientes se han centrado en la identificación de nuevos biomarcadores no invasivos basándose en el análisis del microambiente de los ovocitos para mejorar la precisión de la selección de embriones (Pearson, 2006; Assou *et al.*, 2008; van Montfoort *et al.*, 2008; Assou *et al.*, 2010; Aydiner *et al.*, 2010; Uyar *et al.*, 2013). En algunos estudios, los componentes del fluido folicular (FF), que proceden del plasma o se secretan de las células de la granulosa, se investigaron como posibles biomarcadores (De Placido *et al.*, 2006; Baka y Malamitsi-Puchner, 2006; Yanaihara *et al.*, 2007; Estes *et al.*, 2009; Revelli *et al.*, 2009; Borowiecka *et al.*, 2012; Lédée *et al.*, 2013). De hecho, el FF, que rodea al ovocito, está implicado en la maduración folicular, el crecimiento de los ovocitos y la adquisición gradual de la competencia del desarrollo. Por consiguiente, FF podría representar una fuente confiable de biomarcadores de resultados de ovocitos y embriones que podrían usarse como herramientas de pronóstico/ diagnóstico complementarias en TRA (Mermillod *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2002; Sutton *et al.*, 2003; Krisher, 2004; Angelucci *et al.*, 2006; Baka y Malamitsi-Puchner, 2006).

Los fragmentos de ADN libre circulante (ADNlc) se pueden detectar en el torrente sanguíneo (Mandel y Métais, 1948; Swarup y Rajeswari, 2007) y son el resultado de procesos apoptóticos o necróticos. Se liberan a través de un mecanismo pasivo o activo (Jahr *et al.*, 2001; Stroun *et al.*, 2001). El ADN nuclear y mitocondrial puede liberarse de forma pasiva en la sangre a partir de las células apoptóticas o necróticas (Schwarzenbach *et al.*, 2011) y después, en individuos sanos, los macrófagos los fagocitan, en quienes el nivel basal de ADNlc sigue siendo bajo (Jiang *et al.*, 2003; Pisetsky y Fairhurst, 2007). El ADNlc también puede secretarse activamente por las células (Gahan *et al.*, 2008), lo que lleva a un aumento del nivel circulante de ADNlc en algunos tipos de cáncer y otros trastornos graves. Por esa razón, el ADNlc se utiliza como biomarcador de diagnóstico y/o pronóstico no invasivo para algunos tipos de cáncer y otras patologías graves (Paci *et al.*, 2009; Vlassov *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Kamat *et al.*, 2010; Schwarzenbach *et al.*, 2011; Gahan, 2012; Chen *et al.*, 2013; da Silva Filho *et al.*, 2013). De manera similar, la aparición de pruebas prenatales no invasivas, basándose en la detección de ADNlc fetal en la sangre materna, constituye un enfoque prometedor en obstetricia y ginecología (Wright y Burton, 2009; Liao *et al.*, 2014). Hasta el momento, ningún estudio ha evaluado el contenido de ADNlc en los folículos ováricos, aunque la atresia folicular es el resultado de muchos eventos apoptóticos en las células de la granulosa.

En la presente invención, los inventores se preguntaron si el ADNlc podría detectarse en el FF y si su cuantificación podría usarse para desarrollar una prueba de pronóstico innovadora para determinar la calidad del embrión. Para este objetivo, los inventores cuantificaron ADNlc en el FF de folículos preovulatorios individuales de pacientes sometidos a fertilización *in vitro* convencional (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE, por sus siglas en inglés). Después, los inventores exploraron si el nivel y la integridad de ADNlc estaban relacionados con el tamaño de los folículos y el contenido hormonal, las características clínicas de las pacientes y los resultados de la FIV. Los inventores demuestran que la cuantificación del ADNlc en FF representa un biomarcador innovador y no invasivo para mejorar la selección de embriones en los procedimientos de FIV.

Objeto de la invención:

La invención se define mediante las reivindicaciones.

La presente invención se refiere en general al campo de la medicina reproductiva. De manera más específica, la presente invención se refiere a métodos *in vitro* no invasivos para determinar la calidad de un embrión determinando el nivel de ácidos nucleicos libres circulantes en la extracción de ácidos nucleicos.

Descripción detallada de la invención

Los inventores estudiaron la cuantificación del ADN libre circulante (ADNlc) en muestras individuales de fluido folicular humano (FF) como un nuevo biomarcador predictivo no invasivo para resultados de fertilización *in vitro* (FIV). Se recogieron cientos de muestras individuales de FF de 43 pacientes mujeres sometidas a FIV convencional (n = 26) o

a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) (n = 17) y se cuantificó su nivel de ADNlc. El tamaño del folículo se calculó basándose en el volumen de FF. Cada complejo de ovocitos-cúmulo correspondiente se aisló para procedimientos de FIV o IICE.

5 Las muestras de FF humano de folículos preovulatorios individuales contienen cantidades medibles de ADNlc. El nivel de ADNlc fue significativamente mayor en los folículos pequeños que en los grandes. Además, la concentración de ADNlc se correlacionó de manera significativa y negativa con el tamaño del folículo. Se observó una correlación negativa significativa entre la integridad del ADN y el nivel de 17β-estradiol en muestras de FF en el día de recolección de ovocitos. El nivel de ADNlc en las muestras de FF correspondientes a embriones de gran calidad fue significativamente menor que en las muestras de FF relacionadas con embriones de poca calidad. De manera similar, el nivel de ADNlc también fue significativamente menor en muestras de FF relacionadas con embriones con baja tasa de fragmentación que con alta tasa de fragmentación. Después del ajuste para las variables de confusión, las posibilidades de obtener un embrión de gran calidad alcanzaron el 82 %, si el nivel de ADNlc en las muestras de FF correspondientes era < 4,79 ng/μl.

15 Los inventores demostraron que el nivel de ADNlc en muestras de FF humano se correlacionaba significativamente con la calidad del embrión y presentan un innovador biomarcador no invasivo para mejorar los resultados de la FIV.

20 Los inventores también demostraron que los niveles de miARN en muestras de FF humano se correlacionaba significativamente con la calidad del embrión y presentan un innovador biomarcador no invasivo para mejorar los resultados de la FIV. Los inventores encontraron una correlación significativa y negativa entre el nivel de expresión de let-7b en FF y la tasa de blastulación y potencial de desarrollo embrionario. De hecho, la baja expresión de let-7b en FF se asoció significativamente con la probabilidad de obtener un blastocisto. Además, los niveles de miR-29a en FF predijeron significativamente el resultado clínico de gestación.

25 La presente invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión como se define en la reivindicación 1.

30 La expresión "muestra biológica" se refiere a un fluido folicular individual, muestra de fluido folicular de folículos preovulatorios individuales, sangre, suero, plasma.

35 Como se usa en el presente documento, el término "embrión" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un ovocito fertilizado o cigoto. El término "embrión" también se refiere a las células en todas las etapas de desarrollo desde un ovocito fertilizado o cigoto hasta los 5 o 6 días (etapa de blastocisto). Dicha fertilización puede surgir en condiciones clásicas de fertilización *in vitro* (FIVc) o en un procedimiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE). Ejemplos de embriones que pueden evaluarse mediante los métodos de la invención incluyen embriones de 1 célula (también denominados cigotos), embriones de 2 células, embriones de 3 células, embriones de 4 células, embriones de 5 células, embriones de 6 células, embriones de 8 células, etc. generalmente hasta e incluyendo embriones de 16 células, cualquiera de los cuales puede derivar de cualquier manera conveniente, p.ej., de un ovocito que ha madurado *in vivo* o de un ovocito que ha madurado *in vitro*. Tal como se usa en el presente documento, el término "blastocisto" se refiere a la estructura formada en la embriogénesis temprana de los mamíferos, después de la formación de la mórula. Posee una masa celular interna (MCI), o embrioblasto, que posteriormente forma el embrión, y una capa externa de células, o trofoblasto, que después forma la placenta. El trofoblasto rodea la masa celular interna y una cavidad del blastocisto llena de líquido conocida como blastocele. El blastocisto humano comprende 70-100 células. La formación del blastocisto comienza el día 5/6 después de la fertilización en seres humanos.

45 De acuerdo con la invención, el ovocito puede ser el resultado de un ciclo natural, un ciclo natural modificado o un ciclo estimulado para FIVc o IICE. La expresión "ciclo natural" se refiere al ciclo natural por el cual la hembra o mujer produce un ovocito. La expresión "ciclo natural modificado" se refiere al proceso por el cual, la hembra o mujer produce un ovocito o dos bajo una estimulación ovárica moderada con antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinantes. La expresión "ciclo estimulado" se refiere al proceso por el cual una hembra o una mujer produce uno o más ovocitos bajo estimulación con agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante.

55 La expresión "fertilización *in vitro* clásica" o "FIVc" se refiere a un proceso mediante el cual los ovocitos son fertilizados por espermatozoides fuera del cuerpo, *in vitro*. La FIV es un tratamiento importante en la infertilidad cuando ha fallado la concepción *in vivo*. La expresión "inyección intracitoplasmática de espermatozoides" o "IICE" se refiere a un procedimiento de fertilización *in vitro* en el que se inyecta un único espermatozoide directamente en un ovocito. Este procedimiento se usa más comúnmente para superar los factores de infertilidad masculina, aunque también se puede usar cuando los ovocitos no pueden penetrarse fácilmente por los espermatozoides, y ocasionalmente como un método de fertilización *in vitro*, especialmente el asociado con la donación de esperma.

65 Por "determinar la calidad de un embrión" se entiende que el método de la invención tiene como objetivo determinar si un embrión es competente en el contexto de la fertilización *in vitro*. El método de la invención permite la evaluación de la capacidad de un embrión para desarrollarse con éxito en cualquiera de los dos o en términos de conferir una alta tasa de gestación y/o dar como resultado una persona sana. En consecuencia, el método de la invención permite la

selección del mejor embrión con baja tasa de fragmentación que puede dar lugar a la gestación.

La expresión "embrión competente" se refiere a un embrión con una alta tasa de implantación que conduce a la gestación. La expresión "alta tasa de implantación" significa la posibilidad del embrión cuando se transfiere al útero, de implantarse en el entorno uterino y dar lugar a un feto viable, que a su vez se convierte en una descendencia viable ausente de un procedimiento o evento que termine dicha gestación.

El método de la invención es aplicable preferentemente a mujeres pero puede ser aplicable a otros mamíferos (p. ej., primates, perros, gatos, cerdos, vacas, ratones...).

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una secuencia del ácido nucleico codificante o no codificante. Los ácidos nucleicos incluyen ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Ejemplos de ácido nucleico, por lo tanto, incluyen, pero sin limitación, ADN, ARNm, ARNt, ARNr, ARNmt, miARN, ARNip, ARNpno y ARNpn. De acuerdo con la invención, la expresión "ácido nucleico" también se refiere a los ácidos nucleicos presentes en la muestra de fluido folicular. La expresión "ácido nucleico" también se refiere a los ácidos nucleicos que se originan a partir de los ovocitos o del folículo ovárico que pueden entrar en el fluido folicular y/o la circulación sanguínea.

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

El método de la divulgación comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel del ácido nucleico libre circulante en la extracción de ácido nucleico, ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia, y iii) concluir que el embrión está competente cuando el nivel determinado en la etapa i) es inferior al valor de referencia.

En una realización particular, el valor de referencia es un valor umbral o un valor de corte que puede determinarse experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como se reconocería por un experto en la materia. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de positivo falso y negativo falso). Generalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar utilizando una curva de Característica Operativa del Receptor (ROC) basándose en datos experimentales. Preferentemente, el experto en la materia puede comparar los niveles de ácido nucleico (obtenidos de acuerdo con el método de la invención) con un valor umbral definido. En una realización de la presente invención, el valor umbral deriva de los niveles de ácido nucleico (o proporción, o puntuación) determinados en un fluido folicular derivado de uno o más pacientes sometidos a FIV o IICE. Asimismo, la medición retrospectiva de los niveles de ácido nucleico (o proporción, o puntuación) en el fluido folicular histórico correctamente almacenado de pacientes sometidas a FIV o IICE puede usarse para establecer estos valores umbral.

En una realización particular, el valor de referencia es 4,79 ng/μl.

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

De acuerdo con la presente invención, se miden los niveles de miARN.

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

El método de la invención se define en la reivindicación 1.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión, que comprende una etapa de determinar en la extracción de ácidos nucleicos, el nivel de ácidos nucleicos libres circulantes y let7-b.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión, que comprende una etapa de determinar en la extracción de ácidos nucleicos, el nivel de ácidos nucleicos libres circulantes y miR-29a.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión, que comprende una etapa de determinar en la extracción de ácidos nucleicos, el nivel de ácidos nucleicos libres circulantes, let7-b y miR-29a.

5 El método de la invención comprende además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de al menos un miARN en la extracción de ácidos nucleicos con un valor de referencia, en donde la detección diferencial en el nivel de expresión del miARN entre la extracción de ácidos nucleicos y el valor de referencia es indicativa de la calidad del embrión.

10 El valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión determinado en una muestra biológica tal como fluido folicular asociado con un embrión competente. En consecuencia, un nivel de expresión mayor o igual de miR-29a y un nivel de expresión menor o igual de let7-b que el valor de referencia es indicativo de un embrión competente, y un nivel de expresión menor de miR-29a y un nivel de expresión mayor de let7-b que el valor de referencia es indicativo de un embrión no competente.

15 El valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión determinado en una muestra biológica tal como fluido folicular asociado con un embrión no competente. En consecuencia, un nivel de expresión mayor de miR-29a y un nivel de expresión menor de let7-b que el valor de referencia es indicativo de un embrión competente, y un nivel de expresión menor o igual de miR-29a y un nivel de expresión mayor o igual de let7-b que el valor es indicativo de un embrión no competente.

20 El método de la invención es particularmente adecuado para alcanzar una decisión clínica. Como se usa en el presente documento, la expresión "decisión clínica" se refiere a cualquier decisión a tomar o no una acción que tenga un resultado que afecte la salud o la supervivencia del embrión. En particular, en el contexto de la invención, una decisión clínica se refiere a una decisión de implantar o no el embrión en el útero de la paciente. En particular, el método descrito anteriormente ayudará a los embriólogos a evitar la transferencia en el útero de embriones con escasa posibilidad de dar el resultado de la gestación. El método descrito anteriormente también es particularmente adecuado para mejorar los resultados de la fertilización *in vitro* y evitar gestaciones múltiples seleccionando el embrión competente capaz de conducir a una implantación y una gestación y, por lo tanto, se podrían transferir menos embriones en cada ciclo, lo que da como resultado una menor incidencia de gestaciones múltiples.

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para potenciar el resultado de gestación de una paciente que comprende las etapas que consisten en i) determinar la calidad del embrión mediante el método de acuerdo con la invención, y ii) seleccionar el embrión más competente.

35 En el presente documento, se divulga un método de implantación de un embrión competente en una paciente sometida a fertilización *in vitro*, que comprende las etapas de:

- a) recoger ovocitos de dicha paciente;
- b) generar embriones de dichos ovocitos mediante la fertilización de dichos ovocitos *in vitro*;
- c) determinar la calidad del embrión mediante la realización del método de acuerdo con la invención; y
- d) implantar dicho embrión con una mayor probabilidad de ser competente en dicha paciente.

40 La divulgación también se refiere a un kit para realizar los métodos como se describe anteriormente, en el que dicho kit comprende medios para determinar el nivel del ácido nucleico libre circulante. Generalmente, los kits incluyen cebadores, sondas, macromatrices y micromatrices. El kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de hibridación particular, incluidas matrices en fase sólida, si corresponde y patrones. Alternativamente, el kit puede comprender cebadores de amplificación que pueden estar marcados previamente o pueden contener una purificación por afinidad o un resto de unión. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de amplificación particular.

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

Descripción de las figuras

55 **Figura 1:** Comparación de los niveles de ADN libre circulante en fluido folicular en los tres grupos de tamaño de los folículos. A, se incluyeron todos los folículos individuales (n = 100) (* p = 0,024). B, Solo se incluyeron folículos individuales que contenían un ovocito (n = 76) (* p = 0,007).

60 **Figura 2:** Correlación lineal entre la integridad del ADN y la concentración de E2 en muestras individuales de fluido folicular (r = -0,26; p=0,008).

65 **Figura 3:** A, Contenido de ADN libre circulante en muestras de fluido folicular agrupadas de acuerdo con la calidad en el día 3 del embrión derivado del ovocito correspondiente (grado 1-2 frente a grado 3-4, *p=0,02). B, ADN libre circulante en muestras de fluido folicular agrupadas de acuerdo con la tasa de fragmentación en el día 3 (≤25 % frente a > 25%, * p = 0,02) en el embrión derivado del ovocito correspondiente. C, Contenido de ADN libre circulante en muestras de fluido folicular agrupadas de acuerdo con el número de blastómeros en el día 3 (<6, 6-8 u > 8

células) en el embrión derivado del ovocito correspondiente. La comparación entre los grupos de células 6-8 y > 8 es significativa (* p = 0,04).

Figura 4: Modelo de trabajo que muestra que las posibilidades de obtener un embrión de gran calidad son del 82 % si el fluido folicular correspondiente contiene menos de 4,79 ng/μl de ADN libre circulante. Por el contrario, las posibilidades de obtener un embrión de poca calidad son del 80 % si el fluido folicular correspondiente contiene más de 4,79 ng/μl de ADN libre circulante.

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

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

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

Figura 8: Comparación de los niveles de ADNlc en grupos de fluido folicular de pacientes con reserva ovárica normal (n = 94) y pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés) (n = 17); *p=0,049.

Figura 9: Comparación de la expresión relativa de miARN en grupos de fluido folicular (FF) de mujeres con diferente estado de reserva ovárica (reserva ovárica normal, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y reserva ovárica de baja función (LFOR, por sus siglas en inglés)). **A**, miR-30a en FF; **B**, miR-140 en FF; **C**, let-7b en FF; **D**, miR-191 en FF.

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

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

Figura 12: Modelo esquemático que muestra que el perfil de expresión de miARN en muestras de FF proporciona herramientas poderosas para la detección del trastorno de reserva ovárica y la predicción de resultados de FIV durante la FIV. La expresión de algunos miARN en FF varía de acuerdo con el tratamiento con gonadotropinas. HPhMG, gonadotropina menopáusica humana altamente purificada; r-FSH, hormona foliculo-estimulante; PCOS, síndrome de ovario poliquístico; LFOR, reserva ovárica de baja función.

Ejemplos

EJEMPLO 1:

Materiales y métodos

Características de las pacientes

Este estudio prospectivo incluyó a 43 mujeres sometidas a estimulación ovárica controlada y procedimientos de FIV (n = 26) o IICE (n = 17) en el Departamento de TRA-PGD del CHU de Montpellier, Francia. Se obtuvo el consentimiento

informado por escrito para el uso de muestras de FF en el momento de la recogida de ovocitos y la Junta de Revisión Institucional local aprobó el estudio. Basándose en los criterios de Rotterdam, se excluyeron las pacientes con síndrome de ovario poliquístico (Rotterdam, 2004). Las características de las pacientes se indican en la Tabla I. La edad de las mujeres osciló entre 24 y 40 años (media \pm DE: 33,3 \pm 4,5 años) y su índice de masa corporal (IMC) fue de entre 18 y 31 kg/m² (media \pm DE: 22,2 \pm 3,1 kg/m²). La duración de la infertilidad fue de 3,9 \pm 3,1 años (media \pm DE) y se consideró que el 77 % de las parejas tenían infertilidad primaria.

La infertilidad femenina fue la causa de la consulta en el 58 % de las parejas, mientras que los factores masculinos, la infertilidad mixta o inexplicada se encontraron en el 32 %, 5% y 5 % de las parejas, respectivamente. La reserva ovárica (basándose en el nivel de hormona anti-Mülleriana (AMH, por sus siglas en inglés) y el recuento de folículos antrales (AFC, por sus siglas en inglés)) era normal en el 91 % de las mujeres, excepto en cuatro pacientes con insuficiencia ovárica. El estado hormonal basal se evaluó en cada paciente en el día 3 del ciclo (Tabla I).

Fertilización *in vitro* y recogida de muestras de fluido folicular

Treinta y siete de las 43 pacientes recibieron un tratamiento prolongado con agonistas de GnRH (Decapeptyl; IpsenPharma) y las otras seis pacientes recibieron uno corto. En ambos casos, fue seguido por estimulación ovárica con FSH recombinante (Puregón, MSD). La respuesta ovárica se controló midiendo la concentración sérica de 17 β -estradiol (E2) y mediante una evaluación ecográfica transvaginal del crecimiento folicular y endometrial.

Cuando al menos tres folículos alcanzaron un diámetro de 17 mm o más, se indujo la ovulación mediante una sola inyección de 250 μ g de gonadotropina coriónica humana (Ovitrelle; Merck Serono). La recuperación de los ovocitos se realizó mediante aspiración transvaginal guiada por ecografía 36 horas después de la inyección y cada folículo preovulatorio se aspiró individualmente sin enjuagar.

Se recogieron muestras individuales de FF y se aislaron los complejos cúmulo-ovocito correspondientes para procedimientos convencionales de FIV o IICE. Antes de la microinyección para IICE, la madurez de los ovocitos se evaluó después de la denudación. Los ovocitos se cultivaron individualmente en unas microgotas de 30 μ l de medio de cultivo (Vitrolife) en aceite a 37 °C en CO₂ al 6 % y atmósfera húmeda. La fertilización normal se confirmó por la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares de 18 a 20 horas después de la microinyección o inseminación. La escisión temprana se observó a las 25 o 27 horas después de la microinyección o inseminación, respectivamente. Tres días después de la recuperación de los ovocitos, la calidad del embrión se clasificó de 1 a 4, de acuerdo con los siguientes criterios morfológicos: (a) número de blastómeros, b) regularidad de los blastómeros y (c) tasa de fragmentación (Tabla II). Se consideró un embrión de gran calidad (grado 1 y 2) si se observaban de 6 a 8 blastómeros de tamaño regular con menos del 25 % de fragmentación. Los embriones de gran calidad se transfirieron o congelaron en el día 3, mientras que los embriones de grado 3 y 4 se descartaron.

Preparación de fluido folicular

Para evitar cualquier contaminación sanguínea, solo se incluyeron muestras de FF transparentes, mientras que se excluyeron las muestras de FF manchadas de sangre y turbias. En total, se utilizaron 100 muestras de FF para este trabajo. Se midió el volumen de cada muestra de FF y se calculó el diámetro del folículo correspondiente basándose en el volumen de FF y en el supuesto de que los folículos son esféricos. Por lo tanto, los folículos preovulatorios se clasificaron en tres grupos: pequeños (8-12 mm de diámetro; n = 22), intermedios (13-18 mm de diámetro; n = 59) y grandes (> 18 mm de diámetro; n = 19) (Tabla I, en negrita). Las muestras de FF se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos para eliminar los residuos celulares y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -80 °C.

Determinación de la concentración de E2 en muestras de fluido folicular

La concentración de E2 en muestras de FF se midió por inmunoquimioluminiscencia usando kits comerciales (Cobas e411; Roche Diagnostics).

Extracción y cuantificación de ADN libre circulante por ALU-qPCR

Las muestras de FF se prepararon como se describe por Umetani *et al.*, 2006. Brevemente, se mezclaron 20 μ l de cada muestra de FF con 20 μ l de un tampón que contenía 25 ml/l de Tween 20, 50 mmol/l de Tris y 1 mmol/l de EDTA y después se digirieron con 16 μ g de proteinasa K (PK) (Qiagen) a 50 °C durante 20 minutos seguido de inactivación por calor e insolubilización a 95 °C durante 5 min. Después se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80 °C hasta la cuantificación de ADNlc.

El ADNlc se cuantificó por qPCR para repeticiones ALU humanas usando dos conjuntos de cebadores que generan un amplicón de 115 pb (cebadores ALU115) y un amplicón de 247 pb (cebadores ALU247), respectivamente (Umetani *et al.*, 2006). Para cada ALU-qPCR, se añadió 1 μ l de cada muestra de FF digerida con PK a una mezcla de reacción (volumen final: 10 μ l) que contenía 0,25 μ M de cebadores directo e inverso (ALU115 o ALU247) y 5 μ l de mezcla maestra 2X LightCycler@480 SYBR Green I (Roche Applied Science, Alemania). Las concentraciones de ADNlc en FF se calcularon basándose en una curva patrón preparada con diluciones sucesivas de ADN genómico (Umetani *et*

al., 2006). Se añadió un control negativo (sin plantilla) en cada placa de qPCR. Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado.

Integridad del ADN

5 El ADN liberado de las células necróticas varía en tamaño, mientras que el ADN liberado de las células apoptóticas se trunca uniformemente en fragmentos más cortos de 185 a 200 pb (Giacona *et al.*, 1998). La integridad del ADN se calculó así como la relación Q_{247}/Q_{115} , donde Q_{247} corresponde al nivel de ADNlc obtenido usando los cebadores ALU 247 y Q_{115} a la concentración obtenida con los cebadores ALU 115. Como los sitios de recocido del cebador ALU 115
10 están dentro de los sitios de recocido del cebador ALU 247, la relación de qPCR sería igual a 1, si los fragmentos de ADNlc se generaban solo por necrosis y a 0 si se producían solo por apoptosis.

Análisis estadístico

15 Se realizó un análisis univariante para cada variable. Los datos paramétricos continuos se presentan como media \pm desviación estándar (DE) y las variables categóricas como números y porcentajes. Se utilizó la prueba χ^2 para variables categóricas y la prueba t de Mann-Whitney o Student para variables cuantitativas, de acuerdo con la normalidad de la distribución, evaluada con la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó un análisis multivariante utilizando un modelo de regresión logística en el que incluimos todas las variables asociadas con un valor p inferior a 0,20 en el análisis
20 univariante. A continuación, un procedimiento por etapas permitió obtener el modelo multivariante final. Como una paciente se podía evaluar varias veces (medidas repetidas), se utilizó un modelo de efectos de mezcla lineal para medidas repetidas, lo que permitió tener en cuenta medidas repetidas como variables aleatorias. Se dan coeficientes de regresión con intervalos de confianza (IC) al 95 %. La capacidad del nivel de ADNlc para predecir un *embrión de gran calidad* se determinó construyendo la curva de Característica Operativa del Receptor (ROC) y calculando el área bajo la curva (AUC) con un IC del 95 %. Se calculó la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos negativos y positivos, para el corte óptimo. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa informático R (versión 2.15.2).
25 Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$.

Resultados

Nivel de ADN libre circulante del fluido folicular en relación con el tamaño de los folículos

30 La cuantificación por ALU 115-qPCR del ADNlc total en 100 muestras de FF humanas individuales de folículos preovulatorios mostró que su concentración varió de 0,11 a 15,73 ng/ μ l (media \pm DE: 1,62 \pm 2,08 ng/ μ l; mediana: 1,01 ng/ μ l). El nivel de ADNlc en muestras de FF no se asoció significativamente con las características clínicas de las pacientes (Tabla I). Además, los niveles de ADNlc en folículos pequeños (8-12 mm de diámetro) fueron significativamente más altos que en folículos grandes (> 18 mm) (2,38 \pm 0,72 ng/ μ l frente a 0,95 \pm 0,24 ng/ μ l, respectivamente, $p = 0,024$) (Figura 1A). Este hallazgo se confirmó, incluso cuando solo se consideraron los folículos que contenían un ovocito ($n = 76$) (2,54 \pm 0,78 ng/ μ l frente a 0,71 \pm 0,44 ng/ μ l, respectivamente, $p = 0,007$) (Figura 1B).
35 De manera análoga, el coeficiente de correlación mostró que la concentración de ADNlc en FF se correlacionó de manera significativa y negativa con el tamaño de los folículos ($r = -0,24$; $p = 0,017$) y esta correlación lineal fue más fuerte en los folículos que contienen un ovocito ($r = -0,34$; $p = 0,003$). La concentración media de ADNlc en FF por folículo en pacientes más jóvenes (< 37 años, $n = 31$) y mayores (≥ 37 años, $n = 12$) fue 1,68 \pm 2,25 ng/ μ l y 1,42 \pm 1,42 ng/ μ l, respectivamente. Los niveles de ADNlc y la edad no se relacionaron linealmente. Después de ajustar la edad
40 de las mujeres en un modelo estadístico mixto lineal, los niveles de ADNlc permanecieron significativamente asociados con el tamaño de los folículos ($\beta = -0,15$; $p = 0,022$).

Integridad del ADN y nivel de E2 en el fluido folicular

50 En las muestras individuales de FF humano de los presentes inventores, la relación Q_{247}/Q_{115} media fue de 0,15 (DE: 0,13) con un intervalo de 0 a 0,61, lo que sugiere que el ADNlc se originó principalmente de la apoptosis. La integridad del ADN y el tamaño de los folículos no se correlacionaron significativamente. Al contrario, se encontró una fuerte correlación significativa y negativa entre la integridad del ADN y el nivel intrafolicular de E2 (409,6 \pm 238,4 ng/ml) ($r = -0,26$; $p = 0,008$) (Figura 2), lo que sugiere más necrosis en los folículos con bajo nivel de E2.
55

Concentración de ADN libre circulante en muestras de fluido folicular humano individual y resultados de FIV

60 No hubo diferencias significativas entre la concentración de ADNlc, medida por ALU115 qPCR, en muestras de FF de folículos con y sin ovocito (zona pelúcida vacía) (Tabla III). Entre los 26 ovocitos aislados de pacientes sometidos a IICE, 21 habían alcanzado la madurez meiótica (es decir, estaban en metafase II) y los otros cinco ovocitos estaban bloqueados en metafase I (Tabla III). Por lo tanto, la tasa de madurez de los ovocitos antes de IICE fue de aproximadamente del 81 % [IC 95 % (65.695.9)]. La concentración de ADNlc no fue significativamente diferente en las muestras de FF relacionadas con ovocitos maduros y normalmente fertilizados o con ovocitos inmaduros y ovocitos no fertilizados, respectivamente (Tabla III). Los ciclos de FIV o IICE dieron como resultado 59 cigotos con dos pronúcleos de 69 ovocitos (86% de fertilización). Entre los 49 embriones obtenidos, 37 fueron considerados como embriones de gran calidad (grados 1 y 2) [75,5 %, IC 95 % (63,5-87,5)] y se observó escisión temprana en 13 de los
65

49 embriones [26,5 %, IC 95 % (14,1-38,9)]. El nivel de ADNlc fue significativamente mayor en las muestras de FF relacionadas con los ovocitos que generaron embriones de poca calidad (grados 3 y 4) en comparación con las muestras de FF relacionadas con los embriones de alta (grados 1 y 2) ($3,2 \pm 1,3$ ng/ μ l frente a $1,27 \pm 0,21$ ng/ μ l, respectivamente, $p=0,02$) (Figura 3A y Tabla III). De acuerdo con esta observación, el nivel de ADNlc fue significativamente menor en muestras de FF relacionadas con embriones con baja tasa de fragmentación (≤ 25 %) que con alta tasa de fragmentación (> 25 %) ($1,37 \pm 0,23$ ng/ μ l frente a $3,38 \pm 1,67$ ng/ μ l, respectivamente, $p=0,02$) (Figura 3B y Tabla III). Además, la concentración de ADNlc tendió a ser mayor en las muestras de FF correspondientes a embriones con menos blastómeros (< 6 células en el día 3), lo que sugiere que el desarrollo se retrasó con mayor frecuencia en embriones derivados de ovocitos que maduraron en un ambiente folicular rico en ADNlc (Figura 3C y Tabla III).

Valor predictivo del nivel de ADN libre circulante para determinar la calidad del embrión

El análisis ROC mostró que un nivel de ADNlc total (ALU115 qPCR) inferior a 4,79 ng/ μ l en una muestra de FF se asoció significativamente con posibilidades elevadas de que el ovocito correspondiente produzca un embrión de gran calidad (grados 1 y 2) [Razón de posibilidades bruta (COR, por sus siglas en inglés): 18 (1,8-183,2); $p=0,015$] (Tabla IV). Después del ajuste para las características de varias pacientes, tal como la edad, IMC, el tipo de infertilidad (primaria frente a secundaria) y el tamaño de los folículos, permaneció un nivel bajo de ADNlc en FF de forma independiente y significativamente asociado con mayores posibilidades de obtener un embrión de gran calidad [Razón de posibilidades Ajustada (AOR, por sus siglas en inglés): 19,5 (1,3-303,6); $p=0,034$] (Tabla IV). Además, el área bajo la curva ROC (Tabla IV) que analiza la posible predicción de la concentración de ADNlc de FF para obtener un embrión de gran calidad fue 0,58 (0,36-0,8). La sensibilidad del nivel de ADNlc en FF para la predicción de la calidad del embrión fue muy alta (97 %), así como el valor predictivo positivo (82 %) y negativo (80 %) (Tabla IV y Figura 4).

Análisis

Este estudio demuestra por primera vez la presencia de ADNlc en muestras de FF humano de folículos preovulatorios individuales de pacientes sometidas a FIV. También muestra que el nivel de ADNlc en muestras individuales de FF se correlaciona negativamente con el tamaño de los folículos y se asocia con la calidad del embrión. Los datos de los presentes inventores sugieren que un umbral de concentración de ADNlc en FF de 4,79 ng/ μ l podría usarse para predecir la calidad del embrión en el día 3; de manera específica, un ovocito aislado de un folículo con valores de ADNlc en FF inferiores a este umbral, tiene un 82 % de posibilidades de producir un máximo embrión de gran calidad.

Como el FF deriva de las secreciones de suero y de células de la granulosa (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010), se decidió usar ALU-qPCR, un método desarrollado inicialmente para medir el ADNlc en suero (Umetani *et al.*, 2006), para cuantificar el ADNlc en muestras de FF. Este enfoque permitió la detección y cuantificación confiables de ADNlc en muestras de FF y fue altamente sensible y fácil de realizar. La PCR cuantitativa con los cebadores ALU115 cuantifica el ADNlc total, mientras que la qPCR con los cebadores ALU247 amplifica solo fragmentos grandes, procedentes de necrosis en lugar de apoptosis. Por consiguiente, la relación Q_{247}/Q_{115} representa la proporción de ADNlc generado por necrosis y, por lo tanto, la integridad del ADNlc. Se encontró una fuerte correlación significativa y negativa entre la integridad del ADN y el nivel intrafolicular de E2, lo que sugiere que la producción reducida de E2 podría estar asociada con eventos necróticos en los folículos preovulatorios. Esta observación está de acuerdo con los estudios que proponen un papel para el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α , factor que promueve la necrosis), en la regulación de la esteroidogénesis en los folículos ováricos, particularmente, al disminuir el nivel de E2 en los folículos (Best *et al.*, 1994; Montgomery Rice *et al.*, 1998).

La cantidad de ADNlc en muestras de FF se correlacionó de manera significativa y negativa con el tamaño de los folículos, lo que sugiere una asociación con el estado funcional y dinámico de los folículos preovulatorios. De hecho, en los mamíferos, incluyendo seres humanos, la composición de FF cambia de acuerdo con el tamaño de los folículos (Wen *et al.*, 2006; Nandi *et al.*, 2007; Malizia *et al.*, 2010; Nishigaki *et al.*, 2011). Además, la tasa apoptótica es más elevada en células de la granulosa porcinas y bovinas de pequeños folículos antrales que de folículos medianos y grandes (Yang y Rajamahendran, 2000; Lin y Rui, 2010). Por consiguiente, los altos niveles de ADNlc en los folículos pequeños podrían explicarse por un aumento de los eventos apoptóticos en estos folículos en comparación con los folículos grandes preovulatorios sanos. Asimismo, la integridad media del ADN en FF fue de 0,15 en la cohorte de los presentes inventores, lo que sugiere que aproximadamente el 85 % del ADNlc en FF era de origen apoptótico. Por lo tanto, el ADNlc en las muestras de FF debería ser principalmente la consecuencia de eventos apoptóticos en el folículo y el nivel y el origen del ADNlc en FF podrían reflejar la salud y la madurez del folículo.

La composición de FF influye fuertemente en la calidad de los ovocitos, su competencia de desarrollo y la calidad del embrión posterior (Mermillod *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2002; Sutton *et al.*, 2003; Baka y Malamitsi-Puchner, 2006). Por este motivo, muchos estudios destacaron el FF como una fuente importante de posibles biomarcadores no invasivos para la predicción de la calidad de los embriones y los ovocitos (De Placido *et al.*, 2006; Baka y Malamitsi-Puchner, 2006; Yanaihara *et al.*, 2007; Estes *et al.*, 2009; Revelli *et al.*, 2009; Borowiecka *et al.*, 2012; Lédée *et al.*, 2013). Se observó que el nivel de ADNlc en las muestras de FF estaba fuertemente y significativamente asociado con la calidad de los embriones en el día 3. De hecho, el FF de los ovocitos que produjeron embriones de gran calidad y embriones con baja tasa de fragmentación (≤ 25 %) contenía significativamente menos ADNlc que el FF de los ovocitos

- que generaron embriones de poca calidad y embriones con alta tasa de fragmentación (> 25 %). Asimismo, los embriones de división lenta se relacionaron con los folículos con un alto nivel de ADNlc en FF. Estas observaciones sugieren que los ovocitos que se desarrollan en un entorno rico en ADNlc: (i) podrían haber acumulado "señales negativas" con posibles consecuencias perjudiciales para la salud y el desarrollo del embrión, o (ii) carecen de determinadas "señales positivas" normalmente transmitidas por las células sanas de la granulosa. Estas "señales anómalas" no parecen perturbar la maduración de los ovocitos y la fertilización, porque estos dos procesos se produjeron normalmente incluso en un ambiente rico en ADNlc. Sin embargo, pueden afectar a al menos dos de los tres criterios para la calidad del embrión (enumerados en la Tabla II): la escisión temprana del embrión y la tasa de fragmentación. De hecho, la mayoría de los embriones que mostraron un desarrollo retrasado (< 6 blastómeros en el día 3) y altas tasas de fragmentación (> 25 %) provenían de folículos con altos niveles de ADNlc en FF. De acuerdo con estos resultados, se informó que en el sistema de cultivo well-in-drop *in vitro* de ovocitos/embriones, la apoptosis elevada en las células de la granulosa y el tamaño de folículo pequeño afecta la competencia en el desarrollo de los ovocitos y, por lo tanto, la salud del embrión de cabra y vaca (Han *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007). Además, un estudio reciente encontró una asociación significativa entre el perfil de ADN del medio de cultivo embrionario gastado y la tasa de fragmentación del embrión (Stigliani *et al.*, 2013). De hecho, detectaron ADN mitocondrial y genómico en medio de cultivo embrionario gastado y descubrieron que la concentración mitocondrial de ADNlc era mayor en muestras medianas en las que se cultivaron embriones con escisión de mala calidad en comparación con el medio gastado de embriones de grado superior.
- La presencia de altas concentraciones de ADNlc en FF o en medio de cultivo gastado podría ser la consecuencia, pero también una de las causas de la mala calidad de los embriones. Si se formula la hipótesis de que el ADNlc en FF es tóxico para los ovocitos y transmite "señales negativas" que podrían afectar aún más el desarrollo del embrión, entonces su presencia en FF dañará al ovocito y, en consecuencia, al embrión. El ADNlc también podría ser solo una consecuencia de la elevada apoptosis de las células de la granulosa que no puede establecer el diálogo con el ovocito y suministrar todos los elementos necesarios para su desarrollo normal. Como alternativa, los ovocitos podrían carecer de "señales positivas" de las células circundantes y también sufrir una toxicidad por alto nivel de ADNlc. En cualquier caso, la cuantificación de ADNlc en muestras de FF podría representar un enfoque innovador no invasivo para la selección de embriones además de los criterios morfológicos utilizados actualmente. Por lo tanto, los presentes inventores evalúan el potencial predictivo de los niveles de ADNlc en FF para la evaluación de la calidad de los embriones. Se descubrió que las posibilidades de obtener un embrión de gran calidad eran del 82 % cuando la concentración de ADNlc en FF era < 4,79 ng/μl y las posibilidades de obtener un embrión de poca calidad eran del 80 % cuando la concentración de ADNlc era ≥ 4,79 ng/μl.
- Como el FF es el subproducto de la aspiración de ovocitos por los folículos ováricos, su recogida no es invasiva y la cuantificación de ADNlc es fácil de realizar. Por lo tanto, el uso de ADNlc como biomarcador predictivo de la calidad del embrión podría representar una forma atractiva de desarrollar nuevas pruebas de pronóstico no invasivas para la FIV. Se realizará un estudio más amplio para investigar la relación entre el nivel de ADNlc en las muestras de FF y la tasa de implantación, independientemente de la morfología del embrión.
- La presencia de factores embriotóxicos en el suero de pacientes infértiles con abortos espontáneos repetidos (Ecker *et al.*, 1993; Sargent and Dokras, 1996) motivó investigaciones sobre la cuantificación de ADNlc, circulante en el torrente sanguíneo para pacientes sometidas a procedimientos de FIV (Hart *et al.*, 2005; Czamanski-Cohen *et al.*, 2013; Czamanski-Cohen *et al.*, 2014). Czamanski-Cohen *et al.*, informó que el aumento de ADNlc en plasma se asoció con bajas tasas de gestación en mujeres sometidas a FIV (Czamanski-Cohen *et al.*, 2013). Sugirieron que este alto nivel de ADNlc circulante, probablemente debido a eventos apoptóticos de células maternas, podría crear un ambiente hostil para la concepción. Como existe comunicación entre FF y plasma porque la composición de FF es el resultado de la combinación de secreciones de las células de la granulosa y los componentes del plasma (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010), es concebible que el ADNlc en FF pueda entrar en la circulación sanguínea y constituir un biomarcador medible de la salud ovárica y del resultado embrionario en muestras de plasma o suero durante un procedimiento de FIV. Asimismo, el mismo grupo demostró que el estrés causado por el procedimiento de FIV fue responsable del aumento de ADNlc en la sangre de las pacientes y que las técnicas de relajación ayudaron a reducir significativamente los niveles de ADNlc en la sangre y, por lo tanto, a mejorar el resultado de la FIV (Czamanski-Cohen *et al.*, 2014). Tomados en conjunto, los resultados de los presentes inventores y estos datos publicados anteriormente sugieren que la cuantificación de ADNlc tanto en FF como en suero podría dar una mejor imagen predictiva de la calidad del embrión, y podría usarse de manera rutinaria además de los criterios morfológicos subjetivos. Además, si los estudios adicionales muestran que los niveles elevados de ADNlc contribuyen a la mala calidad de los embriones, podría ser posible prever un enfoque terapéutico basándose en el tratamiento con DNasa para reducir la concentración de ADNlc en sangre y/o FF con el objetivo final de mejorar el resultado de la TRA.

Tabla I: Características de las pacientes, tratamiento hormonal y clasificación del tamaño folicular y asociación con los niveles de ADN libre circulante en el fluido folicular. $\beta \pm EE$, coeficiente de regresión \pm error estándar; DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; FSH, hormona foliculo-estimulante; LH, hormona luteinizante; E2, 17 β -estradiol; AMH, hormona anti-Mülleriana; AFC, recuento de folículos antrales; FIV, fertilización *in vitro*; IICE, inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

5

Variable	Media	n (%)	Mín-Máx	DE	$\beta \pm EE$	valor p
Edad (años)	33,3	-	24-40	4,5	0,02 \pm 0,05	0,69
< 37 años	-	31 (72)	-	-	0,29 \pm 0,52	0,59
\geq 37 años	-	-	-	-	-	-
IMC (kg/m ²)	22.23,9	12 (28)	18-31	3,1	-0,13 \pm 0,09	0,15
Duración de la infertilidad (años)	-	-	1-10	2,3	0,02 \pm 0,15	0,87
Etiología de la infertilidad (%)	-	-	-	-	-	-
Factor masculino	-	14 (32 %)	-	-	-	-
Factor femenino	-	25 (58 %)	-	-	-0,22 \pm 0,52	0,68
Infertilidad mixta	-	2 (5 %)	-	-	-0,37 \pm 1,01	0,72
Infertilidad inexplicable	-	2 (5 %)	-	-	0,70 \pm 1,1	0,53
Infertilidad primaria (%)	-	33 (77)	-	-	-0,73 \pm 0,56	0,19
Infertilidad secundaria (%)	-	10 (23)	-	-	-	-
	-	-	-	-	-0,22 \pm 0,3	0,6
Número de ciclos	1,3	-	1-4	0,7	-	-
Evaluación basal femenina de FSH (UI/l)	7,8	-	3,3-13,7	1,5	-0,03 \pm 0,11	0,8
LH (UI/l)	5,0	-	1,5-8,7	2,2	0,21 \pm 0,14	0,13
Evaluación basal femenina E2 (pg/ml)	49,6	-	16,4-100,1	20,8	-0,002 \pm 0,01	0,88
AMH (ng/ml)	2,8	-	1-9,3	2,2	0,07 \pm 0,14	0,64
AFC	13,1	-	5-26	5,4	0,01 \pm 0,05	0,92
Ovario normal reserva (%)	-	39 (91)	-	-	-0,26 \pm 0,85	0,76
Insuficiencia ovárica (%)	-	4 (9)	-	-	-	-
Protocolo largo	-	37 (86)	-	-	-0,64 \pm 0,83	0,44
Protocolo corto	-	6 (14)	-	-	-	-
Respuesta ovárica	-	-	-	-	-	-
Nivel máximo de E2 (pg/ml)	1.512,4	-	494-3.620	740,9	-0,01 \pm 0,01	0,88
FIV	-	26 (60)	-	-	-0,01 \pm 0,45	0,99
IICE	-	17 (40)	-	-	-	-
N.º de folículos de 8 a \leq 12 mm	0,5	22	0-4	1,0	-	-
N.º de folículos de 13 a \leq 18 mm	1,4	59	0-4	1,2	-	-
N.º de folículos > 18 mm	0,4	19	0-2	0,7	-	-

Tabla II: Clasificación de la calidad de los embriones en el día 3. La calidad del embrión se clasifica de 1 a 4 (1-2: embriones de gran calidad; 3-4: embriones de poca calidad) basándose en los siguientes criterios morfológicos (i) número de blastómeros, (ii) la regularidad de los blastómeros y (iii) la tasa de fragmentación.

Día 3	grado 1	grado 2	grado 3		grado 4
número de blastómeros	6-8 células	6-8 células	6-8 células	<6 células o >8 células	- regulares o irregulares
regularidad de los blastómeros	regulares \leq 10 %	regulares 10-25 %	regulares 26-40 %	regulares o irregulares <40 %	irregulares >40 %
Tasa de fragmentación					

10

Tabla III: Asociación entre los niveles de ADN libre circulante en el fluido folicular y los resultados de la FIV. β

FF asociado con	n/número de FF analizado (%)	ADNlc (ng/ μ l) Media \pm DE [IC 95 %]	$\beta \pm$ EE	valor p*
Zona pelúcida vacía	24/100 (24)	1,94 \pm 0,39 [1,14; 2,74]	-0,5 \pm 0,49	$p = 0,31$
ovocitos	76/100 (76)	1,52 \pm 0,25 [1,03; 2,01]		
ovocitos inmaduros (MI)	5/26 (19)	0,93 \pm 0,28 [0,15; 1,7]	0,53 \pm 0,96	$p = 0,52$
ovocitos maduros (MII)	21/26 (81)	1,31 \pm 0,28 [0,73; 1,9]		
Sin ovocitos fertilizados normales	10/69 (14)	1,0 \pm 0,21 [0,52; 1,48]	0,58 \pm 0,76	$p = 0,45$
ovocito fertilizado normal	59/69 (86)	1,67 \pm 0,31 [1,05; 2,29]		
Sin embrión	51/100 (51)	1,5 \pm 0,21 [1,08; 1,92]	0,16 \pm 0,43	$p = 0,71$
Embrión	49/100 (49)	1,74 \pm 0,37 [1,0; 2,48]		
Sin escisión temprana	36/49 (73)	1,93 \pm 0,48 [0,95; 2,92]	-0,67 \pm 0,84	$p=0,44$
Escisión temprana	13/49 (27)	1,21 \pm 0,3 [0,56; 1,85]		
Sin embrión de gran calidad (grados 3 y 4)	12/49 (24)	3,2 \pm 1,3 [0,33; 6,06]	1,9 \pm 0,81	$p = 0,02$
Embrión de gran calidad (grados 1 y 2)	37/49 (76)	1,27 \pm 0,21 [0,85; 1,69]		
Tasa de fragmentación del embrión (> 25 %)	9/49 (18)	3,38 \pm 1,68 [0,48; 7,24]	2,28 \pm 0,91	$p = 0,02$
Tasa de fragmentación del embrión (\leq 25 %)	40/49 (82)	1,37 \pm 0,23 [0,91; 1,84]		
Embrión con < 6 células	12/49 (24)	2,73 \pm 1,31 [0,15; 5,6]	-0,39 \pm 0,23	$p = 0,11$
Embrión con 6-8 células	29/49 (60)	1,58 \pm 0,29 [0,99; 2,18]		
Embrión con > 8 células	8/49 (16)	0,83 \pm 0,18 [0,4; 1,26]		

\pm EE, coeficiente de regresión \pm error estándar; el FF, fluido folicular, MII, ovocito en metafase II; MI, ovocito en metafase I. La madurez de los ovocitos se evaluó solo para los ciclos de IICE (n = 26). Las muestras de FF asociadas con los ovocitos maduros utilizados para los ciclos de IICE y los ovocitos utilizados para la FIV se incluyeron para la evaluación de la fertilización (n = 69). * El valor p es el resultado de modelos lineales mixtos.

Tabla IV: Predicción de la calidad del embrión utilizando un umbral de valor de ADN libre circulante. * Ajuste por edad, IMC, tipo de infertilidad (primaria frente a secundaria) y tamaño de los folículos. Se, sensibilidad; Sp, especificidad, VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

<i>Probabilidad de obtener un embrión de gran calidad</i>				
ADNlc (ng/ μ l)	OR bruta [IC 95 %]	valor p	OR ajustada [IC 95 %]	valor p
< 4,79 frente a \geq 4,79	18 [1,8-183,2]	p = 0,015	19,5 [1,3-303,6]	p=0,034*
<i>Predicción para obtener un embrión de gran calidad para un umbral [ADNlc] de 4,79 ng/μl</i>				
AuROC [IC 95 %]	Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,58 [0,36-0,8]	97	33	82	80

EJEMPLO 2:

Material y Métodos Pacientes

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

Tabla 1: Nivel de ADNlc en agrupaciones de fluido folicular de acuerdo con las características clínicas de los pacientes.

Variable	Media	n (total=100)	Mín-Máx	DE	ADNlc en FF (ng/μl) Media ± DE [IC 95 %]	valor p
Edad (años)	34,3	-	23-43	4,5	-	-
< 37 años	-	64	-	-	1,9 ± 2,7 [0,1-2,5]	0,19
≥ 37 años	-	36	-	-	1,5 ± 1,0 [1,1-1,8]	NS
IMC (kg/m ²)	23,3	-	17-39	4,2	-	-
18,5 ≤ IMC < 25	-	58	-	-	1,9 ± 2,6 [1,2-2,6]	ref
IMC < 18,5	-	10	-	-	1,2 ± 1,1 [0,4-1,9]	0,54 NS
25 ≤ IMC < 30	-	24	-	-	1,7 ± 1,6 [1,0-2,4]	0,56 NS
IMC ≥ 30	-	8	-	-	1,6 ± 1,5 [0,3-2,8]	0,93 NS
Duración de la infertilidad (años)*	3,5	-	1-9	1,7	-	-
1	-	8	-	-	1,1 ± 1,6 [0-2,4]	ref
2-4	-	68	-	-	1,4 ± 1,3 [1,1-1,7]	0,08 NS
≥ 5	-	23	-	-	2,9 ± 3,8 [1,3-4,5]	0,049
Etiología de la infertilidad						
Factor masculino	-	37	-	-	1,5 ± 1,1 [1,1-1,9]	ref
Factor femenino	-	36	-	-	1,9 ± 2,1 [1,2-2,6]	0,72 NS
Alteraciones tubáricas (%)	-	9 (25)	-	-	1,3 ± 1,6 [0,1-2,5]	0,28 NS
Endometriosis (%)	-	21 (58,3)	-	-	2,1 ± 2,5 [0,9-3,2]	0,67 NS
Disfunción ovulatoria (%)	-	1 (2,8)	-	-	-	-
Trastornos ováricos (%)	-	4 (11,1)	-	-	2,3 ± 1,3 [0,1-4,4]	0,28 NS
Factor uterino (%)	-	1 (2,8)	-	-	-	-
Infertilidad mixta	-	16	-	-	1,7 ± 3,1 [0,1-3,4]	0,08 NS
Infertilidad inexplicable	-	11	-	-	2,0 ± 3,7 [0-4,5]	0,23 NS
Infertilidad primaria	-	61	-	-	2,1 ± 2,7 [1,5-2,8]	0,08
Infertilidad secundaria	-	39	-	-	1,1 ± 0,8 [0,8-1,4]	NS
número de ciclo de FIV/IICE	2,1	-	1-4	1,3	-	-
1	-	39	-	-	1,2 ± 0,9 [0,9-1,5]	0,39
> 1	-	61	-	-	2,1 ± 2,7 [1,4-2,8]	NS
Evaluación basal FSH (UI/l)*	7,4	-	0,1-19	2,4	-	-
Evaluación basal						
< 10	-	87	-	-	1,6 ± 2,0 [1,2-2,1]	0,42 NS
≥ 10	-	12	-	-	2,4 ± 3,7 [0-4,7]	
LH (UI/l)*	5,7	-	1-11,2	1,9	-	-
3-5	-	32	-	-	1,4 ± 1,3 [0,9-1,8]	ref
< 3	-	5	-	-	2,0 ± 1,0 [0,7-3,3]	0,1 NS
		60			1,8 ± 2,6 [1,1-2,4]	0,7 NS

ES 2 776 360 T3

(continuación)

Variable	Media	n (total=100)	Mín-Máx	DE	ADNlc en FF (ng/μl) Media ± DE [IC 95 %]	valor p
E2 (pg/ml)*	40,7	-	4-99	17,8	-	-
≤ 45	-	66	-	-	1,8 ± 2,5 [1,2-2,5]	0,56
> 45	-	32	-	-	1,5 ± 1,6 [1,0-2,1]	NS
AMH (ng/ml)*	2,7	-	0,2-8,6	1,6	-	-
≤ 1	-	5	-	-	4,3 ± 5,0 [0-10,4]	0,06
> 1	13,7	90	3-25	5,7	1,6 ± 2,0 [1,2-2,0]	NS
AFC*	-	24	-	-	2,3 ± 2,6 [1,2-3,4]	0,04
≥ 10	-	63	-	-	1,5 ± 2,2 [1,0-2,1]	
Reserva ovárica normal	-	94	-	-	1,7 ± 2,3 [1,3-2,2]	ref
Insuficiencia ovárica	-	6	-	-	2,1 ± 1,4 [0,6-3,6]	0,29 NS
Protocolo con agonista**	-	48	-	-	1,4 ± 2,0 [0,9-2,0]	0,09
Protocolo con antagonista	-	50	-	-	1,8 ± 1,8 [1,3-2,3]	NS
Tratamiento de estimulación ovárica						
Días de estimulación	10	-	7-14	1,2	-	-
7-10	-	71	-	-	1,5 ± 1,9 [1,0-1,9]	0,008
> 10	-	29	-	-	2,4 ± 2,8 [1,4-3,5]	
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2414,7	-	875-4950	932,5	-	-
< 3000	-	66	-	-	1,5 ± 2,1 [1,0-2,0]	0,01
≥ 3000	-	34	-	-	2,2 ± 2,3 [1,4-3,0]	
Protocolo con agonista						
Días de estimulación	10	-	8-14	1,1	-	-
8-10	-	37	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,4]	0,05 NS
> 10	-	11	-	-	2,7 ± 3,6 [0,3-5,1]	
Protocolo con agonista						
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2324	-	900-4200	797,8	-	-
< 3000	-	34	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,5]	0,049
≥ 3000	-	14	-	-	2,4 ± 3,2 [0,5-4,2]	
Protocolo con antagonista						
Días de estimulación	10	-	7-13	1,2	-	-
7-10	-	33	-	-	1,5 ± 1,6 [1,0-2,1]	0,11
> 10	-	17	-	-	2,2 ± 2,3 [1,0-3,4]	NS
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2475,5	-	875-4950	982,7	-	-
< 3000	-	31	-	-	1,6 ± 2,0 [0,9-2,3]	0,13
≥ 3000	-	19	-	-	2,0 ± 1,6 [1,3-2,8]	NS
Respuesta ovárica hormonal en la ovulación que desencadena el nivel máximo de E2 (pg/ml)	1793,2	-	341-4768	799	-	-
1000-2000	-	56	-	-	1,8 ± 2,1 [1,2-2,3]	ref

(continuación)

Variable	Media	n (total=100)	Mín-Máx	DE	ADNlc en FF (ng/μl) Media ± DE [IC 95 %]	valor p	
Nivel de progesterona (ng/ml)	< 1000	-	12	-	-	2,4 ± 3,5 [0,2-4,6]	0,71 NS
	> 2000	-	32	-	-	1,4 ± 1,8 [0,8-2,1]	0,23 NS
		0,8	-	0,1-1,6	0,3	-	-
Nivel de LH (UI/l)	< 1	-	76	-	-	1,7 ± 2,1 [1,2-2,2]	0,82
	≥ 1	-	24	-	-	1,8 ± 2,6 [0,7-2,9]	NS
		2,0	-	0,1-6,0	1,5	-	-
FIV	< 2	-	38	-	-	1,9 ± 2,0 [1,3-2,6]	0,62
	≥ 2	-	24	-	-	2,3 ± 3,5 [0,8-3,7]	NS
		-	31	-	-	1,7 ± 2,4 [0,8-2,5]	0,44
IICE	-	69	-	-	1,8 ± 2,2 [1,3-2,3]	NS	

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

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

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

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

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

Tabla 2: Nivel de ADNlc en agrupaciones de fluido folicular de acuerdo con protocolos de COS (por sus siglas en inglés) y respuesta ovárica a estimulación.

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

(continuación)

Variable	Media	n (total=100)	Mín-Máx	DE	ADNlc en FF (ng/μl) Media ± DE [IC 95 %]	valor p
Protocolo con agonista						
Días de estimulación	10	-	8-14	1,1		
8-10	-	37	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,4]	0,05
> 10	-	11	-	-	2,7 ± 3,6 [0,3-5,1]	NS
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2324		900-4200	797,8		
< 3000	-	34	-	-	1,1 ± 1,1 [0,7-1,5]	0,049
≥ 3000	-	14	-	-	2,4 ± 3,2 [0,5-4,2]	
Protocolo con antagonista						
Días de estimulación	10	-	7-13	1,2		
7-10	-	33	-	-	1,5 ± 1,6 [1,0-2,1]	0,11
> 10	-	17	-	-	2,2 ± 2,3 [1,0-3,4]	NS
Dosis total de gonadotropinas (UI/l)	2475,5		875-4950	982,7		
< 3000	-	31	-	-	1,6 ± 2,0 [0,9-2,3]	0,13 NS
≥ 3000	-	19	-	-	2,0 ± 1,6 [1,3-2,8]	
Respuesta ovárica hormonal al desencadenar la ovulación						
Nivel máximo de E2 (pg/ml)	1793,2	-	341-4768	799	-	-
1000-2000	-	56	-	-	1,8 ± 2,1 [1,2-2,3]	ref
< 1000	-	12	-	-	2,4 ± 3,5 [0,2-4,6]	0,71 NS
> 2000	-	32	-	-	1,4 ± 1,8 [0,8-2,1]	0,23 NS
Nivel de progesterona (ng/ml)	0,8	-	0,1-1,6	0,3	-	-
< 1	-	76	-	-	1,7 ± 2,1 [1,2-2,2]	0,82 NS
≥ 1	-	24	-	-	1,8 ± 2,6 [0,7-2,9]	
Nivel de LH (UI/l)	2,0	-	0,1-1,6	1,5	-	-
< 2	-	38	-	-	1,9 ± 2,0 [1,3-2,6]	0,62 NS
≥ 2	-	24	-	-	2,3 ± 3,5 [0,8-3,7]	

E2, 17β-estradiol; LH, hormona luteinizante; FIV, fertilización *in vitro*; IICE, inyección intracitoplasmática de espermatozoides. ** excepto dos estimulaciones ováricas moderadas. Valores p: prueba de Mann-Whitney.

La extracción de los ovocitos se realizó mediante aspiración transvaginal guiada por ecografía 36 h después de la administración de hCG y todos los folículos se aspiraron sin lavado. Todas las muestras de FF recolectadas de la misma paciente se agruparon y los complejos cúmulo-ovocito se aislaron para procedimientos convencionales de FIV o IICE.

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

Preparación de fluido folicular

Se agruparon todas las muestras de FF de la misma paciente y se centrifugó un volumen de 15 ml a 3000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0,45 μm para eliminar los residuos celulares y después se almacenaron a -80 °C hasta la cuantificación de ADNlc. Se recogió un total de 117 agrupaciones de FF para este estudio.

Extracción y cuantificación de ADN libre circulante por ALU-qPCR

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

El ADNlc se cuantificó por qPCR, utilizando cebadores ALU 115 (Umetani et al., 2006). Cada reacción de ALU-qPCR incluyó 1 µl de agrupación de FF digerido con PK y una mezcla de reacción que contenía 0,25 µM de cebadores ALU 115 directos e inversos y 5 µl de mezcla maestra 2X LightCycler®480 SYBR Green I (Roche Applied Science, Alemania). La concentración de ADNlc en las agrupaciones de FF se determinó usando una curva patrón obtenida por diluciones sucesivas de ADN genómico (Umetani et al., 2006). Se integró un control negativo (sin plantilla) en cada placa de qPCR y cada agrupación de FF se analizó por cuadruplicado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariante para cada variable. Los datos paramétricos continuos se presentan como media ± desviación estándar (DE) y las variables categóricas como números y porcentajes. La prueba de Mann-Whitney y las correlaciones de Spearman se usaron para comparar los niveles de ADNlc de acuerdo con las variables cuantitativas, basándose en la normalidad de la distribución evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó un análisis multivariante para modelar la probabilidad clínica de gestación. Se ajustó un modelo de regresión logística en el que todas las variables asociadas con un valor p inferior a 0,20 se incluyeron en el análisis univariante. A continuación, un procedimiento por etapas permitió obtener el modelo multivariante final. La capacidad del nivel de ADNlc en FF para predecir el resultado clínico de gestación se determinó construyendo la curva de la Característica Operativa del Receptor (ROC) y calculando el área bajo la curva (AUC) con intervalos de confianza (IC) del 95 %. Se calculó la sensibilidad y especificidad para el corte óptimo. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa informático R (versión 2.15.2). Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$.

Resultados

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

La concentración de ADNlc en las agrupaciones de FF de las 17 pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) fue significativamente más alta que en las agrupaciones de FF de pacientes con reserva ovárica normal ($n = 94$) ($2,9 \pm 3,1$ ng/µl frente a $1,7 \pm 2,3$ ng/µl, $p=0,049$) (Figura 8). En general, los niveles de ADNlc fueron significativamente más altos en las agrupaciones de FF de pacientes con trastornos de la reserva ovárica (incluyendo LFOR y PCOS) que en las agrupaciones de FF de mujeres con reserva ovárica normal ($2,7 \pm 2,7$ ng/µl frente a $1,7 \pm 2,3$ ng/µl, $p=0,03$) (Figura 5A).

Dado el perfil clínico específico de PCOS, los presentes inventores decidieron excluir a estas 17 pacientes del análisis posterior. Además, las concentraciones de ADNlc fueron significativamente más altas en las agrupaciones de FF de pacientes con bajo AFC (<10) que en las muestras de mujeres con AFC normal (≥ 10) ($2,3 \pm 2,6$ ng/µl frente a $1,5 \pm 2,2$ ng/µl, respectivamente, $p=0,04$) (Figura 5B, panel izquierdo y Tabla 1). De manera análoga, el nivel de ADNlc en FF tendió a ser más alto en mujeres con una concentración sérica de AMH muy baja en el día 3 del ciclo menstrual (≤ 1 ng/ml) que en aquellas con AMH > 1 ng/ml ($4,3 \pm 5,0$ ng/µl frente a $1,6 \pm 2,0$ ng/µl, respectivamente, $p=0,06$) (Figura 5B, panel derecho y Tabla 1).

Finalmente, los niveles de ADNlc en FF aumentaron progresivamente con la duración de la infertilidad y fueron significativamente más altos en pacientes que habían tratado de concebir durante más de cinco años en comparación con las mujeres que lo intentaron solo durante un año ($2,9 \pm 3,8$ ng/µl frente a $1,1 \pm 1,6$ ng/µl, $p=0,049$) (Figura 5C y Tabla 1).

Concentración de ADN libre circulante en agrupaciones de fluido folicular de acuerdo con el protocolo de COS y la respuesta ovárica

El nivel de ADNlc en FF no varió significativamente entre las mujeres que recibieron agonistas de GnRH y las tratadas con antagonistas (Tabla 2). Por otro lado, fue significativamente más alto después de una estimulación ovárica prolongada (> 10 días) que después de un tratamiento corto (7-10 días) ($2,4 \pm 2,8$ ng/µl frente a $1,5 \pm 1,9$ ng/µl, $p=0,008$) (Figura 6A y Tabla 2). De manera análoga, el análisis de correlación de Spearman mostró que el nivel de ADNlc en FF estaba correlacionado de manera significativa y positiva con la duración de la estimulación ovárica ($r = 0,2$; $p=0,04$). Además, el nivel de ADNlc fue significativamente más alto en las agrupaciones de FF de mujeres que recibieron una dosis total alta de gonadotropinas (≥ 3000 UI/l) que en las mujeres tratadas con una dosis más baja

(<3000 UI/l) ($2,2 \pm 2,3$ ng/ μ l frente a $1,5 \pm 2,1$ ng/ μ l, $p=0,01$) (Figura 6B y Tabla 2). Se obtuvo un resultado similar cuando solo se consideraron las pacientes que recibieron un protocolo con agonista ($2,4 \pm 3,2$ ng/ μ l frente a $1,1 \pm 1,1$ ng/ μ l, $p=0,049$) (Tabla 2). Además, las agrupaciones de FF de pacientes con un número bajo de ovocitos recuperados (≤ 6) tenían una concentración de ADNlc significativamente mayor que las de mujeres con mayor número de ovocitos recuperados (> 6) ($2,8 \pm 3,5$ ng/ μ l frente a $1,4 \pm 1,5$ ng/ μ l, $p=0,045$) (Figura 6C y Tabla S2).

Concentración de ADN libre circulante en agrupaciones de fluido folicular y resultados embrionarios

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

Considerando cada criterio morfológico de manera individual en el día 3, los niveles de ADNlc tendieron a ser más altos en las agrupaciones de FF relacionadas con embriones con alta tasa de fragmentación (≥ 20 %) que con baja tasa de fragmentación (< 20 %) ($2,6 \pm 3,5$ ng/ μ l frente a $1,4 \pm 1,3$ ng/ μ l, respectivamente, $p=0,18$) (Figura 7D, panel izquierdo y Tabla 3). Además, se calculó la relación entre el número total de blastómeros y el número total de embriones para cada cohorte de embriones para estimar la cinética global del desarrollo. El día 3, los niveles de ADNlc fueron significativamente más altos en las agrupaciones de FF correspondientes a cohortes de embriones con una baja relación de número total de blastómeros/número total de embriones (< 6 ; desarrollo retrasado) que en aquellas con cinética de desarrollo normal (relación entre 6 y 8) ($2,8 \pm 2,7$ ng/ μ l frente a $1,8 \pm 2,8$ ng/ μ l, respectivamente, $p=0,02$) (Figura 7D, panel derecho y Tabla 3).

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

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

(continuación)

Resultado del desarrollo embrionario	Media	DE	n	ADNlc en FF (ng/μl)	valor p
				Media ± DE [CI 95 %]	
≥ 1 grado 1-2	-	-	59	1,4 ± 1,7 [1,0-1,8]	
Embriones de grado 1-2/todos los embriones relación < 0,2	0,29	0,3	-	-	-
relación ≥ 0,2	-	-	39	2,4 ± 3,0 [1,4-3,4]	0,02
relación ≥ 0,2	-	-	52	1,3 ± 1,4 [0,9-1,7]	
% de fragmentación	0,19	0,11	-	-	-
% de fragmentación < 20	-	-	60	1,4 ± 1,3 [1,0-1,7]	0,18 NS
% de fragmentación ≥ 20	-	-	31	2,6 ± 3,4 [1,3-3,9]	
Número total de blastómeros/número total de embriones			-	-	-
relación=6-8	-	-	45	1,8 ± 2,8 [1,0-2,6]	ref
relación < 6	-	-	11	2,8 ± 2,7 [1,0-4,6]	0,02
relación > 8	-	-	35	1,4 ± 1,2 [1,0-1,8]	0,39 NS

DE, desviación estándar. Valores p: prueba de Mann-Whitney.

Valor predictivo del ADN libre circulante en agrupaciones de fluido folicular para el resultado clínico de gestación

- 5 Después del ajuste para el rango de intentos de FIV/IICE y el número de embriones, el nivel de ADNlc en FF se asoció de manera significativa e independiente con el resultado clínico de gestación [Razón de posibilidades ajustada: 0,69 [0,5; 0,96], p=0,03] (Tabla 4). El área bajo la curva ROC, que cuantifica la posible predicción de gestación clínica de la concentración de ADNlc en FF, fue de 0,73 [0,66-0,87] con el 88 % de especificidad y el 60 % de sensibilidad. Por otro lado, el número de embriones de gran calidad (grados 1 y 2) no predijo significativamente el resultado clínico de gestación (p = 0,42), lo que sugiere que en la población de los presentes inventores, el valor predictivo del nivel de ADNlc en FF fue mayor que el número de embriones de gran calidad.

Tabla 4. Modelo logístico multivariante que muestra la predicción de gestación clínica de acuerdo con el nivel de ADNlc en agrupaciones de fluido folicular.

Parámetros	OR bruta [IC 95 %]	valor p	OR ajustada [IC 95 %]*	valor p
Probabilidad de obtener una gestación clínica				
ADNlc en FF (ng/μl)	0,75 [0,55; 1,03]	0,08	0,69 [0,5; 0,96]	0,03
número de rango de FIV/IICE =1 frente a > 1	2,5 [1,0; 6,27]	0,05	3,6 [1,3; 9,8]	0,01
Número de embriones	1,15 [1,0; 1,3]	0,04	1,18 [1,01; 1,37]	0,03

OR, razón de posibilidades; *Ajustada para el rango de intentos de FIV/IICE y el número de embriones.

Análisis

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

La cantidad de ADNlc fue significativamente más alta en las agrupaciones de FF de mujeres con larga duración de infertilidad (más de 5 años). La larga duración de la infertilidad con frecuencia se asocia con un mayor estrés en las parejas infértiles (Chiba H, Mori E, Morioka Y, Kashiwakura M, Nadaoka T, Saito H, et al. Stress of female infertility: relations to length of treatment. Gynecol Obstet Invest 1997;43: 171-7; Lynch CD, Sundaram R, Maisog JM, Sweeney AM, Buck Louis GM. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort studythe LIFE study. Hum Reprod 2014;29: 1067-75). De forma interesante, un estudio reciente indicó que el nivel de ADNlc en sangre era más alto en pacientes sometidas a FIV y que sufrían estrés (Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Levitas E, Lunenfeld E, Douvdevani A, et al. Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. Arch Womens Ment Health 2014;17: 251-3). Por lo tanto, un largo período de estrés, causado por la ausencia de gestación, podría conducir a un aumento de

los eventos apoptóticos en las células foliculares y, en última instancia, a niveles más altos de ADNlc en FF. Además, se ha demostrado que las técnicas de relajación pueden ser beneficiosas durante el proceso de FIV, para reducir los niveles de ADNlc en plasma y mejorar los resultados de gestación (Czamanski-Cohen et al., 2014).

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

De hecho, El nivel de ADNlc en FF fue significativamente mayor después de un protocolo de COS largo (> 10 días) o después de la administración de altas dosis de gonadotropinas (≥ 3000 UI/l). Además, el estado de la reserva ovárica influye fuertemente en la respuesta ovárica a los protocolos de COS (Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20: 370-85; Younis JS, Skournik A, Radin O, Haddad S, Bar-Ami S, Ben-Ami M. Poor oocyte retrieval is a manifestation of low ovarian reserve. *Fertil Steril* 2005;83: 504-7; La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20: 124-40). Por ejemplo, la estimulación ovárica larga o fuerte se recomienda actualmente para mujeres con riesgo de respuesta ovárica deficiente (Ficicioglu C, Cenksoy PO, Yildirim G, Kaspar C. Which cutoff value of serum anti-Mullerian hormone level can predict poor ovarian reserve, poor ovarian response to stimulation and *in vitro* fertilization success? A prospective data analysis. *Gynecol Endocrinol* 2014;30: 372-6; Lan VT, Linh NK, Tuong HM, Wong PC, Howles CM. Anti-Mullerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. *Reprod Biomed Online* 2013;27: 390-9). En consecuencia, pacientes que recibieron estimulación prolongada o dosis altas de gonadotropina se superponen parcialmente con pacientes con niveles altos de ADNlc intrafolicular relacionados con una baja reserva ovárica. Además, un alto nivel de ADNlc en FF después de una estimulación larga o fuerte podría representar un verdadero efecto de los protocolos de COS, con posibles consecuencias perjudiciales en los resultados de FIV/IIICE. Por ejemplo, dosis fuertes de gonadotropina suprafisiológica podrían inducir la apoptosis de las células foliculares (Liu S, Feng HL, Marchesi D, Chen ZJ, Hershlag A. Dose-dependent effects of gonadotropin on oocyte developmental competence and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2011;23: 990-6), lo que sugiere la necesidad de adaptar específicamente los tratamientos de estimulación al perfil de cada paciente. Por el contrario, el contenido de ADNlc en FF no difirió de acuerdo con el tipo de protocolos de COS (con agonista frente a con antagonista). En consonancia, se detectaron niveles de apoptosis similares en células de granulosa expuestas a tratamientos con agonistas o con antagonistas (Lavorato HL, Oliveira JB, Petersen CG, Vagnini L, Mauri AL, Cavagna M, et al. GnRH agonist versus

GnRH antagonist in IVF/ICSI cycles with recombinant LH supplementation: DNA fragmentation and apoptosis in granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;165: 61-5).

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

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

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

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

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

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

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

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

5

Recuperación de ovocitos, fertilización y resultados de escisión temprana	Media	DE	n	ADNlc en FF (ng/μl) [IC 95 %]	Media ± DE	valor p
Ovocitos	9,5	4,7	-	--	-	-
≤ 6	-	-	25	2,8 ± 3,5 [1,4-4,2]	-	-
> 6	-	-	75	1,4 ± 1,5 [1,0-1,7]	-	0,045
Zona pelúcida vacía	0,4	0,8	-	-	-	-
Sin zona pelúcida vacía	-	-	87	1,5 ± 1,8 [1,1-1,9]	-	-
≥ 1 Zona pelúcida vacía	-	-	24	2,4 ± 3,2 [1,2-3,7]	-	0,3 NS
ovocitos maduros (MII)	7,2	4,1	-	-	-	-
< 5	-	-	19	2,4 ± 3,1 [1,0-3,9]	-	-
≥ 5	-	-	50	1,5 ± 1,6 [1,1-2,0]	-	0,25 NS
ovocitos maduros/ovocitos	0,76	0,2	-	-	-	-
relación < 0,75	-	-	26	1,5 ± 1,5 [0,8-2,1]	-	-
relación ≥ 0,75	-	-	43	2,0 ± 2,4 [1,2-2,7]	-	0,45 NS
ovocitos inmaduros (GV, MI)	1,8	1,9	-	-	-	-
< 3	-	-	67	1,9 ± 2,5 [1,3-2,5]	-	-
≥ 3	-	-	33	1,4 ± 1,4 [1,0-1,9]	-	0,97 NS
ovocitos inmaduros/ovocitos	0,18	0,1	-	-	-	-
relación < 0,25	-	-	70	1,9 ± 2,5 [1,3-2,5]	-	0,26 NS

(continuación)

Recuperación de ovocitos, fertilización y resultados de escisión temprana	Media	DE	n	ADNlc en FF (ng/μl) [IC 95 %]	Media ± DE	valor p
relación ≥ 0,25	-	-	30	1,3 ± 1,5 [0,8-1,9]	-	-
Ovocitos atrésicos	0,3	0,8	-	-	-	-
Sin ovocito atrésico	-	-	85	1,7 ± 2,3 [1,2-2,3]	-	-
≥ 1 ovocito atrésico	-	-	15	1,7 ± 1,3 [1,0-2,4]	-	0,44 NS
Ovocitos atrésicos/ovocitos	0,02	0,07	-	-	-	-
relación ≤ 0,1	-	-	88	1,7 ± 2,3 [1,2-2,2]	-	-
relación > 0,1	-	-	12	1,9 ± 1,3 [1,0-2,7]	-	0,19 NS
Fertilización						
% de fertilización con FIV/IICE	0,65	0,3	-	-	-	-
< 0,65	-	-	20	1,9 ± 1,7 [1,2-2,7]	-	-
≥ 0,65	-	-	79	1,7 ± 2,4 [1,2-2,2]	-	0,27 NS
A las 25-27 horas después de la fertilización						
Escisión temprana	1,8	2,6	-	-	-	-
No	-	-	36	1,9 ± 2,7 [1,0-2,9]	-	-
≥ 1	-	-	55	1,7 ± 2,0 [1,1-2,2]	-	0,72 NS
Escisión temprana/2PN	0,41	0,88	-	-	-	-
relación ≤ 0,5	-	-	68	2,0 ± 2,6 [1,4-2,6]	-	-
relación > 0,5	-	-	21	1,0 ± 0,8 [0,7-1,4]	-	0,18 NS
% de fragmentación	0,07	0,09	-	-	-	-
<10 %	-	-	31	1,3 ± 1,3 [0,9-1,8]	-	-
≥ 10 %	-	-	24	2,1 ± 2,6 [1,0-3,2]	-	0,25 NS

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

Tabla S3: Clasificación de la calidad del embrión en el día 2 y día 3 después de la fertilización.

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

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

EJEMPLO 3:

5

Materiales y métodos**Pacientes**

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

y LFOR) se detallan en la Tabla 7.

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

5

Procedimiento de FIV

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

10

Los ovocitos se recuperaron por aspiración transvaginal guiada por ecografía 36 h después de la inyección de hCG. Para cada paciente, se aspiraron todos los folículos sin lavado, se aislaron los complejos cúmulo-ovocito para la FIV o IICE convencional y se recogieron todas las muestras de FF.

15

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

20

25

30

35

Preparación de las muestras de FF

El día de recuperación de ovocitos, se recogieron todas las muestras de FF de una paciente y agruparon (n = 131 agrupaciones). Se centrifugó un volumen de 15 ml de cada agrupación a 3000 g durante 15 min. Después, se eliminaron los sobrenadantes, se filtraron a través de filtros de 0,45 μ m para eliminar los residuos celulares y se almacenaron a -80 °C.

40

Extracción de miARN

El kit de Ácido Nucleico Circulante QIAamp® (ref. 55114; Qiagen) se usó para el aislamiento y la purificación de los miARN circulantes a partir de 3 ml de cada agrupación de FF de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se mezclaron 3 ml de la agrupación de FF, 400 μ l de Proteínasa K de Qiagen y 4,2 ml de tampón ACL mediante agitación con formación de vórtice de pulso y se incubaron a 60 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadieron 9 ml de tampón ACB al lisado y se mezcló por agitación con formación de vórtice de pulso. La mezcla se transfirió después a una mini columna QIAamp mediante presión de vacío para adsorber los miARN en una pequeña membrana de sílice. A continuación, cada membrana se lavó en tres etapas para eliminar los contaminantes residuales. Los microARN circulantes altamente puros se eluyeron dentro de 40 μ l de tampón AVE.

45

Análisis de la expresión de miARN en FF por RT-qPCR

El ADN complementario (ADNc) se generó utilizando el kit de transcripción inversa TaqMan MicroARN y cebadores tallo-lazo específicos de miARN para let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140, miR-191 y miR-320a (ref 4427975, Life Technologies). Los 15 μ l de mezcla de reacción contenían 5 μ l de agrupación de FF, 0,15 μ l de dNTP 100 mM, 1,5 μ l

50

de tampón 10xRT, 1 µl de enzima MultiScribe RT (50U/µl), 0,19 µl de inhibidor de RNasa (20U/µl), 4,16 µl de agua sin nucleasas y 3 µl de cebador Taqman RT. La transcripción inversa se llevó a cabo a 16 °C durante 30 min y después a 42 °C durante 30 min, seguida de una etapa inactivada a 85 °C durante 5 min y una etapa de mantenimiento a 4 °C. La PCR cuantitativa se realizó por duplicado para cada muestra utilizando LightCycler 480® (Roche Applied Science, Alemania); se añadió un control negativo (agua) para cada agrupación de FF. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 10 µl, que consta de 3 µl de ADNc, 5 µl de Mezcla Maestra Taqman Universal PCR (Applied Biosystems) y 2 µl de cebador (Life Technologies). La mezcla se incubó en una placa de 384 pocillos, a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Además, miR-16 se utilizó como control interno, debido a su estabilidad en los fluidos corporales (Kroh *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012), para normalizar los niveles de expresión de los miARN. La expresión relativa de los seis miARN (let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140, miR-191 y miR-320a) en cada agrupación de FF se calculó en relación con la de miR-16 utilizando la ecuación $2^{-\Delta Ct}$, en la que ΔCt se determinó mediante la fórmula: Ct de miARN diana - Ct de miR-16.

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

Análisis de la vía

Se utilizó Pathway Studio® (Elsevier) para identificar los procesos biológicos en los que los miARN detectados en las agrupaciones de FF están implicados en el sistema reproductivo. Las vías clave incluyeron desarrollo folicular, proliferación celular, apoptosis, esteroidogénesis, meiosis e implantación embrionaria. Las interacciones entre algunos miARN y la hormonas esteroides también se integraron en este análisis de las vías.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariante para cada variable. Los datos paramétricos continuos se presentan como la media \pm desviación estándar (DE) y las variables categóricas con números y porcentajes. La prueba de Mann-Whitney, la prueba *t* de Student, la prueba de Anova o Kruskal Wallis se utilizaron para determinar las variables cuantitativas, basándose en la normalidad de la distribución, evaluadas usando la prueba de Shapiro-Wilk. El análisis multivariante se utilizó para investigar la expresión diferencial de miARN relacionada con los trastornos de la reserva ovárica (PCOS y LFOR). Se ajustó un modelo de regresión logística en el que todas las variables asociadas con un valor *p* inferior a 0,20 se incluyeron en el análisis univariante. A continuación, un procedimiento por etapas permitió obtener el modelo multivariante final. La capacidad de los niveles de miARN en FF para predecir trastornos de la reserva ovárica (PCOS y LFOR), blastocisto y resultados clínicos de gestación se evaluó construyendo las curvas de la Característica Operativa del Receptor (ROC) y calculando el área bajo la curva ROC (AUC) con un intervalo de confianza del 95 % (IC). Se calculó la sensibilidad y especificidad del corte óptimo. Las pruebas estadísticas se realizaron usando el programa informático R (versión 2.15.2). Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$.

Resultados

Expresión diferencial de miARN en muestras de FF de mujeres con PCOS en comparación con mujeres con reserva ovárica normal

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

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

La comparación de la expresión de ARNm en agrupaciones de FF de mujeres con LFOR y con reserva ovárica normal mostró que miR30a y miR-191 estaban regulados positivamente ($p = 0,01$ para ambos) en el grupo con LFOR en

comparación con pacientes con reserva ovárica normal (Figura 9A y 9D). Sin embargo, se encontró una asociación significativa y positiva solo entre la expresión de miR-191 en FF y LFOR, usando un modelo de regresión logística [Razón de posibilidades bruta, COR: 1,4 [1,03; 1,93], p=0,03] (Tabla 5). Los valores del AUC del poder de discriminación individual de miR-30a y miR-191 en FF para la predicción de LFOR fueron 0,79 (0,68-0,87) y 0,77 (0,67-0,86) (p < 0,0001, p=0,002) (Tabla 6). La combinación de estos dos miARN mejoró la detección de LFOR y el AUC correspondiente alcanzó 0,84 (0,67-0,86) con un valor de p < 0,0001 (Tabla 6). Además, esta combinación fue muy sensible (85,9 %) y específica (71,4 %) (Tabla 6), lo que sugiere que, en conjunto, miR-30a y miR-191 son nuevos biomarcadores prometedores para la identificación de mujeres con LFOR.

10 **Expresión diferencial de los miARN en FF de acuerdo con el tratamiento con gonadotropinas y la respuesta ovárica.**

La expresión de los seis miARN fue comparable en las agrupaciones de FF de mujeres que recibieron protocolos con agonistas o con antagonistas. Por el contrario, la expresión en FF de miR-29a y miR-140 varió significativamente de acuerdo con el tratamiento con gonadotropinas. De manera específica, la expresión de miR-29a disminuyó significativamente y la expresión de miR-140 aumentó significativamente en las agrupaciones de FF de mujeres tratadas con hMG en comparación con pacientes que fueron estimuladas con r-FSH (p = 0,03; p=0,02, respectivamente) (Figura 10A). Además, sea cual sea el tipo de gonadotropina, miR-140 se reguló positivamente de manera significativa en las agrupaciones de FF de mujeres que recibieron dosis totales más altas de gonadotropinas (≥ 3000 UI/l) en comparación con las tratadas con dosis más bajas (<3000 UI/l) (p = 0,03) (Figura 10B). De manera análoga, el análisis de correlación de Spearman mostró que el nivel de miR-140 en FF se asoció de manera significativa y positiva con la dosis total de gonadotropinas (r = 0,21; p=0,02).

El día de recuperación de ovocitos, el nivel de miR-320a en las agrupaciones de FF se correlacionó de manera significativa y positiva con el número de ovocitos maduros (MII) (r = 0,24; p=0,02). Las agrupaciones de FF de mujeres con un número bajo de ovocitos maduros (≤ 2) contenían niveles de miR-320 en FF significativamente más bajos que las relacionadas con un número de ovocitos maduros superiores a 2 (p = 0,04) (Figura 10C).

30 **Expresión de let-7b en FF y desarrollo de blastocistos**

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

45 **Valor predictivo de miR-29a en FF para determinar resultado clínico de gestación**

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

55 **Funciones biológicas de los miARN candidatos en el sistema reproductivo**

MiR-29a, miR-320a, let-7b y miR-30a, identificados como expresados diferencialmente en agrupaciones de FF, están implicados en varias vías del sistema reproductivo. Se utilizó Pathway Studio® para generar una vista esquemática de los diferentes papeles reguladores de estos miARN en los procesos reproductivos, tal como crecimiento folicular, apoptosis, esteroidogénesis, meiosis e implantación embrionaria (Figura 11). El esquema también integró las interacciones con las hormonas esteroideas (estrógeno y progesterona). Las posibles funciones de estos miARN, su localización en el folículo ovárico y sus dianas principales se resumen en la Tabla 9.

60 **Análisis**

Este estudio investigó los perfiles de expresión de seis miARN circulantes (let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140, miR-191 y miR-320a) en agrupaciones de FF de pacientes que se sometieron a procedimientos de FIV/IICE y se descubrió que se expresan de manera diferencial de acuerdo con el estado de reserva ovárica de las mujeres, los tratamientos

con gonadotropinas y/o los resultados de la FIV (Figura 12). Los datos de los presentes inventores sugieren que estos miARN circulantes podrían representar nuevas herramientas poderosas controlar la FIV, al identificar de manera eficaz a las mujeres con trastornos de la reserva ovárica (PCOS o LFOR) y al predecir los resultados de la FIV, tal como el desarrollo de blastocistos o los resultados clínicos de gestación.

5 Los presentes inventores demostraron, por primera vez, que la expresión de let-7b y miR-140 está significativamente disminuida mientras que miR-30a está regulado positivamente en muestras de FF de pacientes con PCOS. Además, la combinación de estos tres miARN está significativamente asociada con PCOS, con alta especificidad y sensibilidad. Por lo tanto, podrían constituir nuevos biomarcadores específicos para identificar de manera fácil y eficaz a las mujeres con PCOS. Estudios anteriores indicaron que let-7b se expresa en células de granulosa y cúmulos en mamíferos y también en ovarios humanos (Yao *et al.*, 2009; Miles *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Assou *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015). El PCOS se caracteriza por anomalías en el desarrollo folicular, lo que sugiere que el "diálogo" normal entre los ovocitos y las células de la granulosa en los folículos de crecimiento temprano podría verse alterado (Franks *et al.*, 2008). En consecuencia, la disminución significativa de la expresión de let-7b en FF observada en pacientes con PCOS podría reflejar esta foliculogénesis anómala. De hecho, se ha indicado que let-7b podría desempeñar un papel específico en el desarrollo folicular ovárico (Yao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015). De manera específica, let-7b regula la vía de señalización de TGF- β en el ovario de cabra dirigiéndose al receptor I de activina y a los genes Smad2/3 (Zhang *et al.*, 2013). La desregulación de TGF- β contribuye a las anomalías reproductivas en PCOS, tal como la perturbación del desarrollo de los folículos (Raja-Khan *et al.*, 2014). Por consiguiente, la regulación negativa de let-7b en los folículos ováricos podría conducir a la desregulación de la vía de señalización de TGF- β y, en última instancia, contribuir al desarrollo de PCOS. La expresión anómala del receptor de estrógenos (ER, por sus siglas en inglés) también podría contribuir al desarrollo folicular deficiente y la insuficiencia ovulatoria en PCOS (Jakimiuk *et al.*, 2002). MiR-140 desempeña un papel como supresor tumoral y está regulado negativamente en el cáncer de mama a través de la señalización de ER α (Zhang *et al.*, 2012). Estos hallazgos sugieren que las modificaciones de la expresión de ER α observadas en PCOS podrían influir negativamente en la expresión de miR-140 en los folículos ováricos. Finalmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-30a en células de granulosa humana promueve la expresión de BCL2A1, IER3 y ciclina D2 reprimiendo FOXL-2 (Wang *et al.*, 2015). FOXL-2 codifica un factor de transcripción forkhead que es esencial para el desarrollo ovárico (Crisponi *et al.*, 2001). La inactivación condicional de FOXL-2 en ratones da como resultado folículos revertidos por sexo con características de folículos quísticos, incluida la producción elevada de andrógenos por las células de la teca y la transformación morfológica de las células de la granulosa, como en PCOS (Uhlenhaut *et al.*, 2009; Murphy, 2010). Además, el hirsutismo inducido por andrógenos, descrito en pacientes con PCOS, también se observa en mujeres que portan mutaciones en FOXL-2 (Meduri *et al.*, 2010). Basándose en estas observaciones, los presentes inventores formulan la hipótesis de que la sobreexpresión de miR-30 en agrupaciones de FF de mujeres con PCOS podría conducir a la inhibición/regulación negativa de FOXL-2 en los folículos ováricos, promoviendo así el desarrollo de síntomas de PCOS. A diferencia de dos estudios previos (Sang *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014), la expresión de miR-320a en FF no se vio afectada en el grupo de mujeres con PCOS de los presentes inventores. Sin embargo, el nivel de expresión de miR-320a fue significativamente menor en las agrupaciones de FF de mujeres con menos de dos ovocitos maduros (≤ 2) en comparación con las mujeres con más de dos ovocitos maduros. En el ratón, La atenuación génica de miR-320a en los ovocitos disminuyó significativamente la proporción de ovocitos maduros que se convirtieron en embriones (Feng *et al.*, 2015). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que miR-320a es indicativo de la cantidad y calidad de los ovocitos maduros y que su expresión intrafolicular podría estar modulada por la calidad de respuesta ovárica de las pacientes sometidas a FIV.

45 Los presentes inventores encontraron después, que la expresión de miR-30a y miR-191 es significativamente mayor en las agrupaciones de FF de mujeres con LFOR en comparación con las mujeres con el estado de reserva normal. Además, la combinación de estos dos miARN circulantes discriminó significativamente a las mujeres con LFOR, con alta sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, podrían representar nuevos biomarcadores específicos para la identificación de mujeres con LFOR. Los presentes inventores ya analizaron el vínculo entre la sobreexpresión de miR-30a y la regulación negativa de FOXL-2 en las células de la granulosa. (Wang *et al.*, 2015). Además, La reducción/ablación de la expresión de FOXL-2 o las mutaciones de FOXL-2 afectan significativamente el desarrollo de los folículos (Murphy, 2010). De hecho, en ratones, la alteración de FOXL-2 causa insuficiencia ovárica al bloquear el desarrollo de los folículos (Uda *et al.*, 2004). De manera análoga, las mutaciones de FOXL-2 dan como resultado POF (por sus siglas en inglés) e infertilidad en las mujeres por el agotamiento de la reserva de folículos, lo que podría deberse a la alteración del ensamblaje de los folículos o al reclutamiento elevado de los folículos primordiales (Murphy, 2010). Por lo tanto, los presentes inventores formulan la hipótesis de que la sobreexpresión de miR-30 en los folículos ováricos puede causar la represión del gen FOXL-2 en las células foliculares y, en consecuencia, conducir a la reserva ovárica reducida. Además, miR-191 es una diana de ER en el cáncer de mama (Nagpal *et al.*, 2013) y un estudio reciente indicó que algunos miARN relacionados con el riesgo de cáncer de mama también están asociados con el riesgo de insuficiencia ovárica (Rah *et al.*, 2015).

65 La expresión en el FF de algunos miARN también se moduló por el tratamiento con gonadotropinas. MiR-29a se reguló negativamente de manera significativa y miR-140 se sobreexpresó en agrupaciones de FF de mujeres que se estimularon con hMG en comparación con las tratadas con r-FSH. Esto está en consonancia con un estudio anterior que muestra que miR-29a está regulado negativamente de manera significativa por el tratamiento con FSH en células de granulosa de rata cultivadas, influyendo, así, en la producción de progesterona (Yao *et al.*, 2010). Los datos de los

presentes inventores sugieren que los tratamientos con gonadotropinas podrían afectar la expresión de miARN intrafolicular y, en última instancia, la eficacia de la FIV. Los presentes inventores también encontraron que la dosis alta total de gonadotropinas estaba asociada con la regulación positiva de miR-140. Esto probablemente refleja una posible relación dosis-efecto de las gonadotropinas sobre el perfil de expresión de miR-140 en FF. Se requieren estudios adicionales para investigar los mecanismos biológicos implicados en el efecto de las gonadotropinas sobre la expresión intrafolicular de estos miARN.

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

Además, los niveles de miR-29a en FF predijeron significativamente el resultado clínico de gestación con mayor sensibilidad (83,3 %) en comparación con la proporción de embriones de gran calidad en la cohorte de los presentes inventores. MiR-29a se expresa altamente en el útero de rata durante la implantación de embriones y su expresión está regulada por la activación de blastocistos y la decidualización uterina (Xia *et al.*, 2014). De forma interesante, la expresión de miR-29a podría influir en el resultado de gestación al actuar tanto en el lado tanto folicular como endometrial, respaldando la hipótesis de que son necesarios entornos foliculares y endometriales favorables para la concepción.

En conclusión, el estudio de los presentes inventores demuestra que, durante la FIV, el perfil de expresión de miARN en muestras de FF humano proporciona biomarcadores para identificar de manera eficaz y fácil los trastornos de la reserva ovárica y para predecir el desarrollo de blastocistos y los resultados clínicos de gestación. Estos nuevos posibles biomarcadores podrían usarse en la práctica diaria para mejorar las estrategias personalizadas de FIV e identificar nuevas dianas terapéuticas en el manejo de la infertilidad femenina.

Tabla 5: Modelo logístico multivariante que muestra la asociación de ARNm en FF específicos con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y reserva ovárica de baja función (LFOR). OR, razón de posibilidades, FF, fluido folicular.

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

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

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

(continuación)

	Predicción para PCOS				Predicción para LFOR		
Valor predictivo positivo (%)	57,7	51,7	41,9	60	16,3	40	31,3
Valor predictivo negativo (%)	85,1	84,5	81,2	88,6	100	96	97,1
Valor de corte	> 0,49	< 0,92	≤ 93,95	-	> 0,14	> 2,98	-

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

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

(continuación)

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

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

	Total (n=31)			Reserva ovárica normal (n=91)			PCOS (n=30)			LFOR (n=10)		
Resultados de la FIV	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Ovocitos recuperados	7,6	4,5	-	9,0	4,2	-	9,1	4,8	-	4,7	4,5	-
Ovocitos maduros (MII)	6,0	3,7	-	7,8	4,1	-	6,4	3,6	-	3,7	3,4	-
≤ 2	-	-	14	-	-	9	-	-	1	-	-	4
> 2	-	-	85	-	-	59	-	-	24	-	-	2
Tasa de madurez (%)	77	-	-	81	-	-	71	-	-	80	-	-
Tasa de fertilización de FIV/IICE (%)	64	-	-	67	-	-	60	-	-	65	-	-
A las 25-27 horas después de la fertilización												
Escisión temprana	1,3	1,4	-	2,2	2,1	-	1,2	1,6	-	0,5	0,5	-
El día 2												
Embrión	4,1	3,3	-	4,8	3,7	-	4,6	3,3	-	2,8	3,0	-
El día 3												
Embrión de gran calidad	1,2	1,6	-	1,6	1,8	-	1,2	1,7	-	0,8	1,3	-
Tasa de fragmentación total (%)	15	-	-	14	-	-	17	-	-	15	-	-
El día 5												
Tasa de blastulación (Blastocisto/embriones de cultivo prolongado) (%)	31	-	-	46	-	-	38	-	-	8	-	-
Tasa de blastocistos expandidos (blastocisto expandido/blastocistos) (%)	45	-	-	52	-	-	38	-	-	-	-	-
Tasa de gestación clínica por transferencia (%)	27	-	-	38	-	-	29	-	-	14	-	-
Gestación única	-	-	31	-	-	22	-	-	9	-	-	1
Gestación múltiple	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	0

Tabla 9: Los miARN circulantes expresados en el complejo cúmulo-ovocito (COC), en las células de la granulosa (GC, por sus siglas en inglés), en las células del cúmulo (CC) y en el fluido folicular (FF): sus funciones y dianas principales en los folículos ováricos.

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

5

REFERENCIAS:

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

10

Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:1775-85.

15

Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, Rème T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 2008;14:711-9.

Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod* 2010;16:531-8.

20

Aydiner F, Yetkin CE, Seli E. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Curr Mol Med* 2010;10:206-15.

Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online* 2006;12:500-6.

25

Best CL, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Modulation of human granulosa cell steroid production *in vitro* by tumor necrosis factor alpha: implications of white blood cells in culture. *Obstet Gynecol* 1994;84:121-7.

Borowiecka M, Wojsiat J, Polac I, Radwan M, Radwan P, Zbikowska HM. Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med* 2012;58:301-5.

Chen K, Zhang H, Zhang LN, Ju SQ, Qi J, Huang DF, Li F, Wei Q, Zhang J. Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19:3143-9.

30

Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Lunenfeld E, Douvdevani A, Levitas E, Har-Vardi I. Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2013;26:36-41.

Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Levitas E, Lunenfeld E, Douvdevani A, Har-Vardi I. Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. *Arch Womens Ment Health* 2014.

35

da Silva Filho BF, Gurgel AP, Neto MÁ, de Azevedo DA, de Freitas AC, Silva Neto Jda C, Silva LA. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker of colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2013;66:775-8.

De Placido G, Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Alviggi E, Strina I, Fiore E, Wilding M, Pagano T, Matarese G.

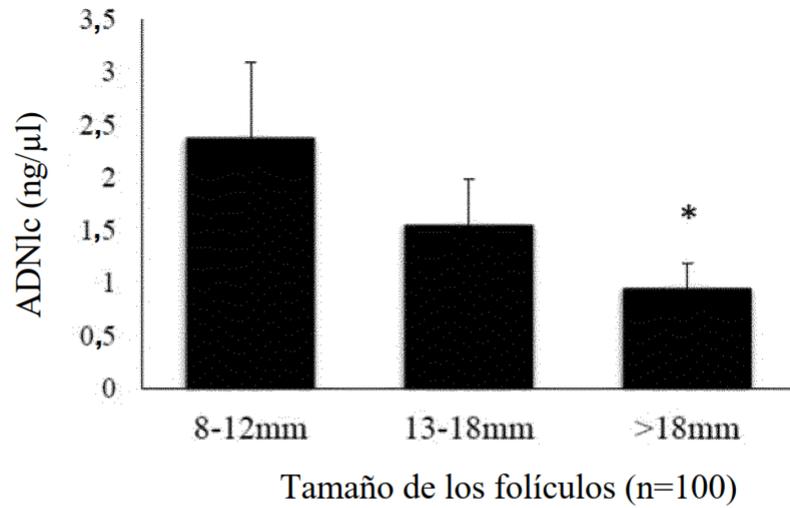
- Intrafollicular leptin concentration as a predictive factor for *in vitro* oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest* 2006;29:719-26.
- Ecker JL, Laufer MR, Hill JA. Measurement of embryotoxic factors is predictive of pregnancy outcome in women with a history of recurrent abortion. *Obstet Gynecol* 1993;81:84-7.
- 5 Estes SJ, Ye B, Qiu W, Cramer D, Hornstein MD, Missmer SA. A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women ≤ 32 years old. *Fertil Steril* 2009;92:1569-78.
- Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S, Tan JH. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 2007;67:1339-50.
- 10 Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:7-17.
- Gahan PB. Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer. *Infect Disord Drug Targets* 2012;12:360-70.
- Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, Chen H, Chen XC, Qin FX, Tan S et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1651-6.
- 15 Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998;17:89-97.
- Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 2007;22:1973-81.
- 20 Han ZB, Lan GC, Wu YG, Han D, Feng WG, Wang JZ, Tan JH. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction* 2006;132:749-58.
- Hart EA, Patton WC, Jacobson JD, King A, Corselli J, Chan PJ. Luteal phase serum cell-free DNA as a marker of failed pregnancy after assisted reproductive technology. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:213-7.
- 25 Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril* 2013;99:1030-4.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-65.
- 30 Jiang N, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells. *Blood* 2003;102:2243-50.
- Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han LY, Godwin A, Karlan BY, Simpson JL, Gershenson DM, Coleman RL et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer* 2010;116:1918-25.
- 35 Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*.2004;82:E14-23.
- Lédée N, Gridelet V, Ravet S, Jouan C, Gaspard O, Wenders F, Thonon F, Hincourt N, Dubois M, Foidart JM et al. Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Hum Reprod* 2013;28:406-13.
- 40 Liao GJ, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation. *Clin Chim Acta* 2014;428:44-50.
- Lin P, Rui R. Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles. *Mol Reprod Dev* 2010;77:670-8.
- Malizia BA, Wook YS, Penzias AS, Usheva A. The human ovarian follicular fluid level of interleukin-8 is associated with follicular size and patient age. *Fertil Steril* 2010;93:537-43.
- 45 Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948;142:241-243.
- Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002;17:1017-22.
- 50 Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:449-60.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-71.
- Montgomery Rice V, Limback SD, Roby KF, Terranova PF. Differential responses of granulosa cells from small and large follicles to follicle stimulating hormone (FSH) during the menstrual cycle and acyclicity: effects of tumour necrosis factor-alpha. *Hum Reprod* 1998;13:1285-91.
- 55 Nandi S, Kumar VG, Manjunatha BM, Gupta PS. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Dev Growth Differ* 2007;49:61-6.
- Nishigaki A, Okada H, Okamoto R, Sugiyama S, Miyazaki K, Yasuda K, Kanzaki H. Concentrations of stromal cell-derived factor-1 and vascular endothelial growth factor in relation to the diameter of human follicles. *Fertil Steril* 2011;95:742-6.
- 60 Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, Ferrari G, Annessi V, Lasagni D, Carbonelli C et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;64:92-7.
- Pearson H. Safer embryo tests could boost IVF pregnancy rates. *Nature* 2006;444:12-3.
- Pisetsky DS, Fairhurst AM. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 2007;40:281-4.
- 65 Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality:

- from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:40.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 2010;82:1021-9.
- 5 Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41-7.
- Sargent IL, Dokras A. Embryotoxicity as a marker for recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:383-7.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-37.
- 10 Schwarzenbach H, Muller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K. Evaluation of cellfree tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol Biosyst* 2011;7:2848-54.
- Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod* 2013;28:2652-60.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov;313(1-2):139-42.
- 15 Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulusoocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 2003;9:35-48.
- Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 2007;581:795-9.
- 20 Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006;52:1062-9.
- Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 2013;99:979-97.
- 25 van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL, Ayoubi TA. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod* 2008;14:157-68.
- Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers. *Curr Mol Med* 2010;10:142-65.
- Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A level reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril* 2006;85:1723-9.
- 30 Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for noninvasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:139-51.
- Yanaihara A, Mitsukawa K, Iwasaki S, Otsuki K, Kawamura T, Okai T. High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril* 2007;87:279-82.
- 35 Yang MY, Rajamahendran R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2000;62:1209-17.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método no invasivo *in vitro* para determinar la calidad de un embrión que comprende las etapas que consisten en i) extraer ácidos nucleicos libres circulantes y miARN de una muestra de fluido folicular, ii) determinar el nivel de los ácidos nucleicos libres circulantes y de al menos uno miARN seleccionado del grupo que consiste en let7-b y miR-29a en la extracción de los ácidos nucleicos, iii) comparar los niveles determinados en la etapa ii) con un valor de referencia, y iv) concluir que el embrión es competente cuando el nivel de ácido nucleico libre circulante es más bajo que el valor de referencia y el nivel de let7-b determinado en la etapa ii) es más bajo que el valor de referencia y/o el nivel de miR-29a determinado en la etapa ii) es más alto que el valor de referencia.
- 10 2. Un método para mejorar el resultado de gestación de una paciente que comprende las etapas que consisten en i) determinar la calidad del embrión mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra individual de fluido folicular, y ii) seleccionar el embrión más competente.

A



B

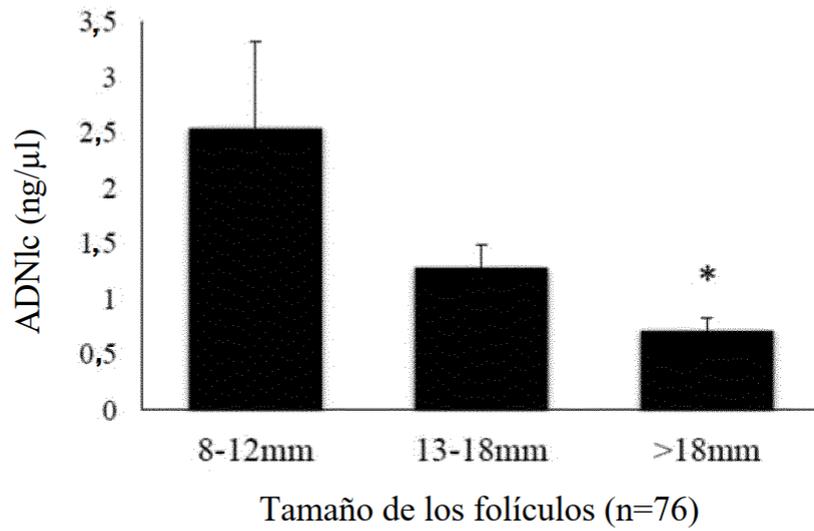


Figura 1

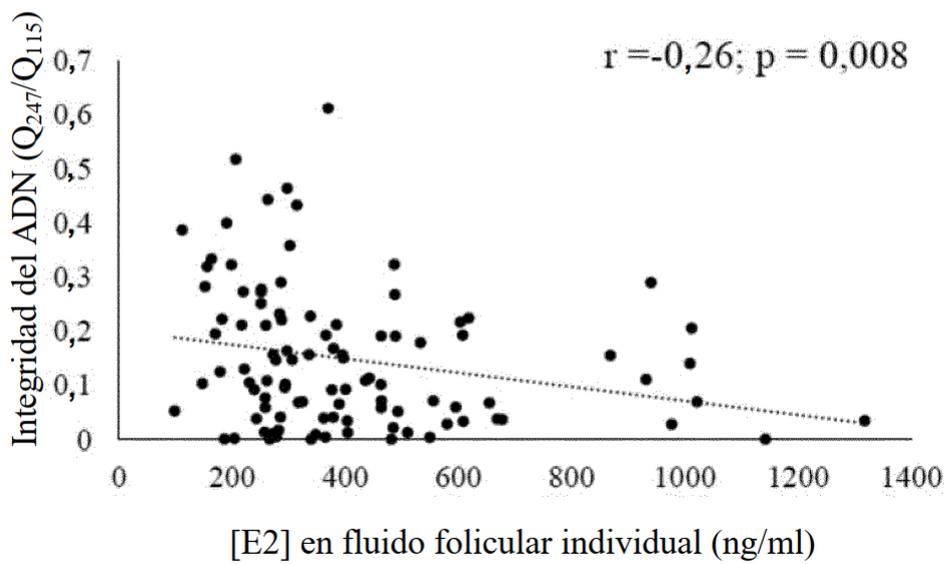
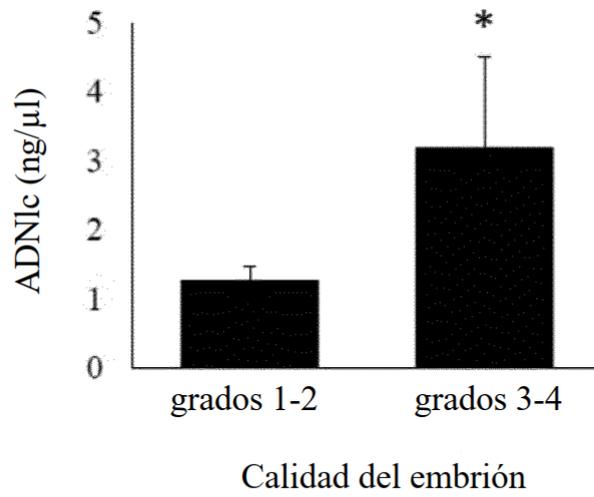
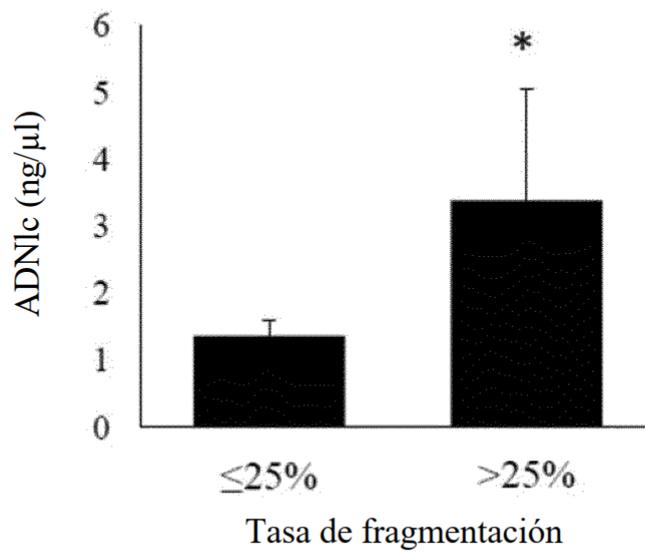


Figura 2

A



B



C

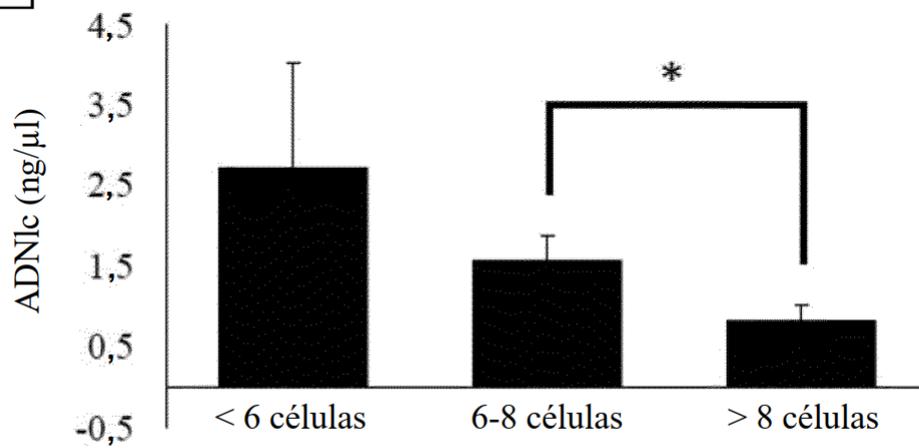


Figura 3

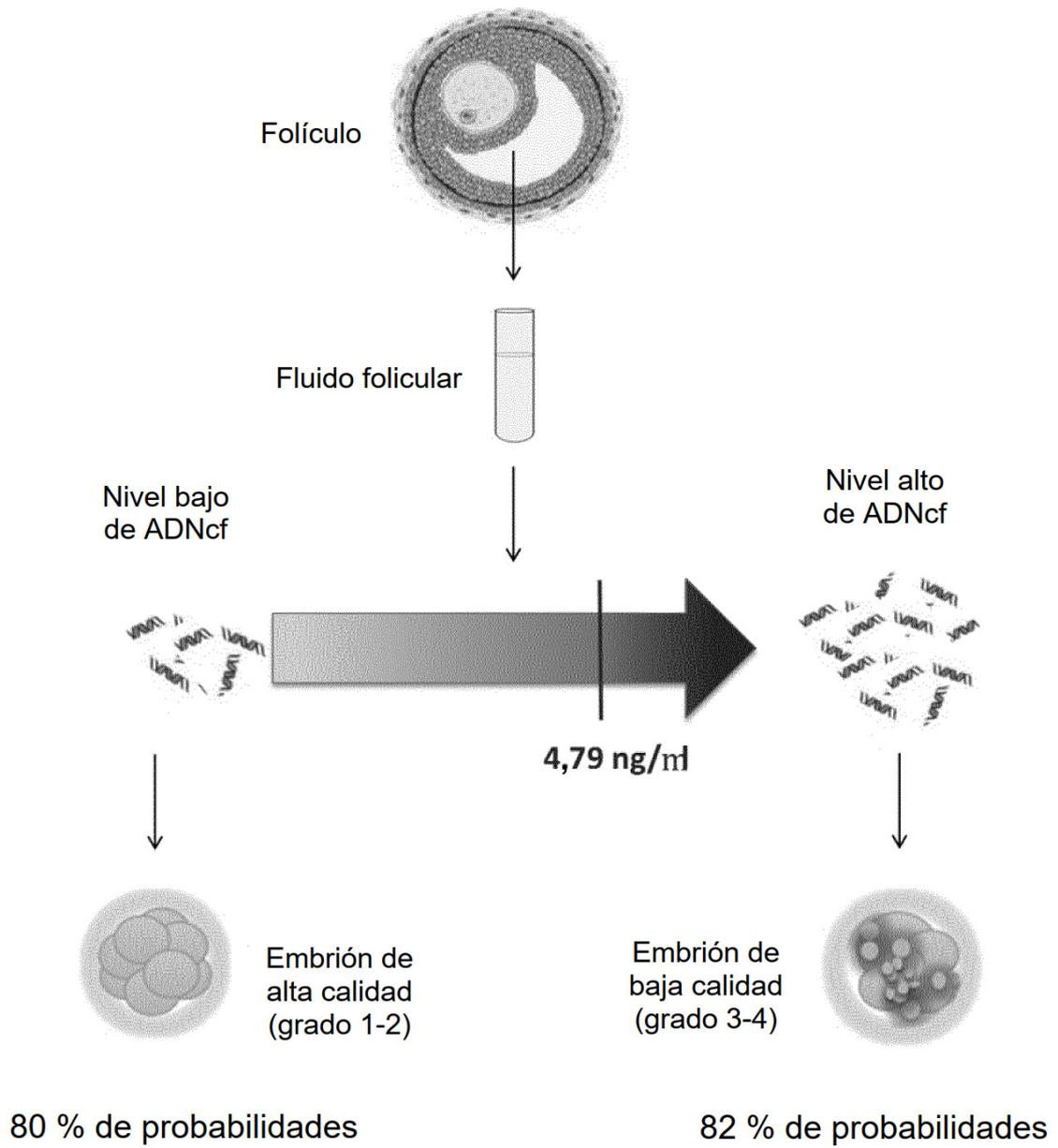


Figura 4

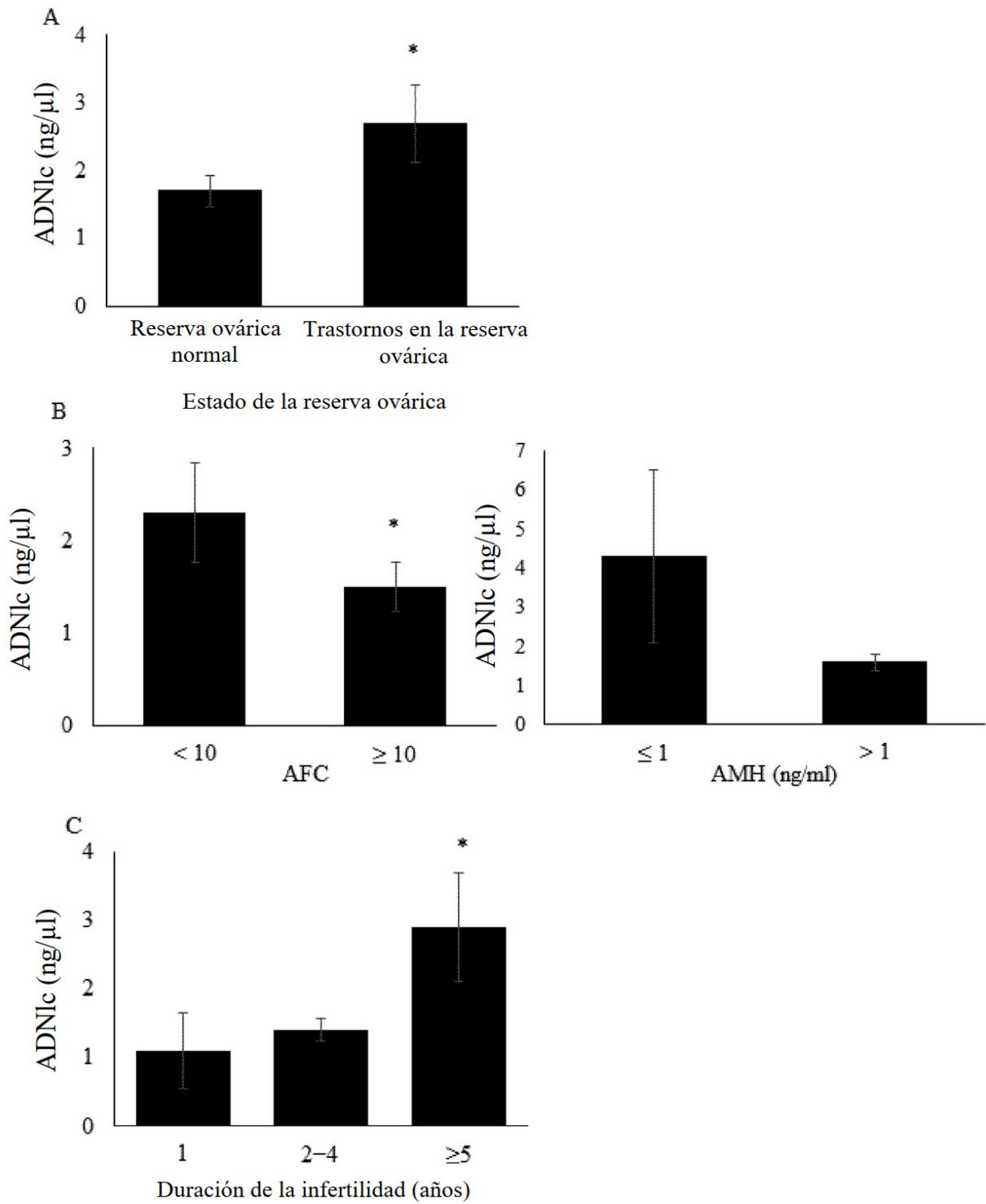


Figura 5

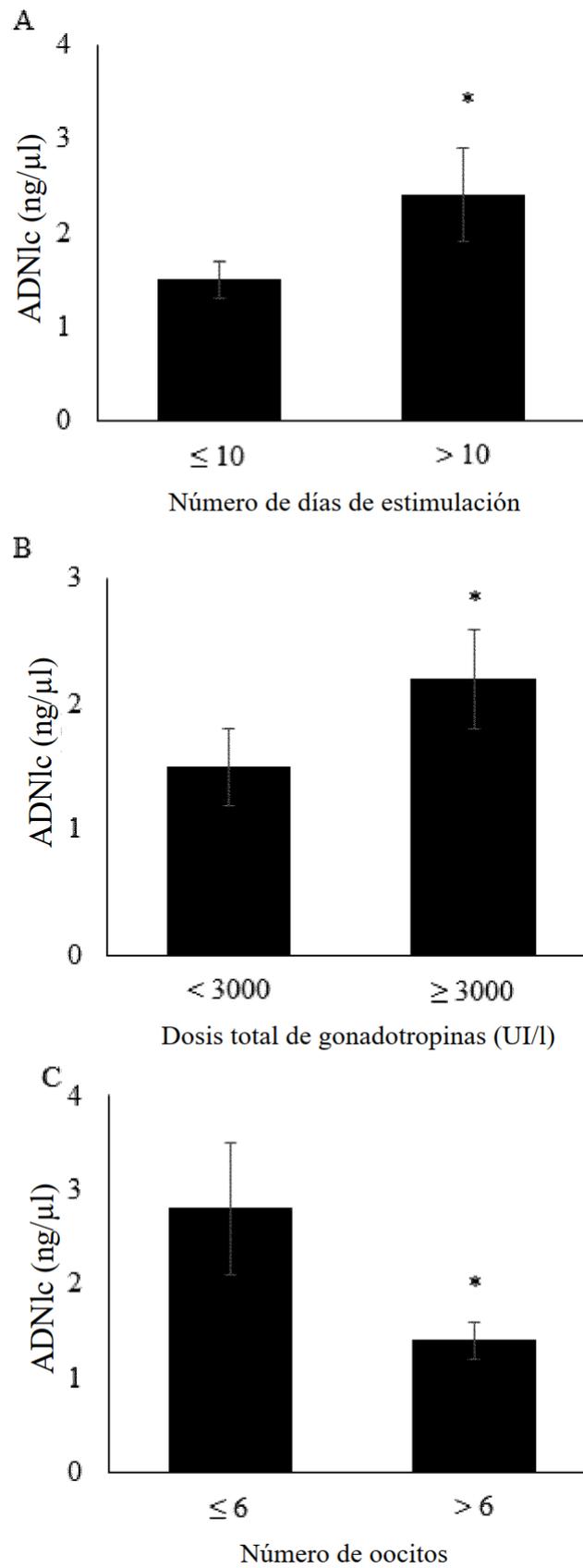


Figura 6

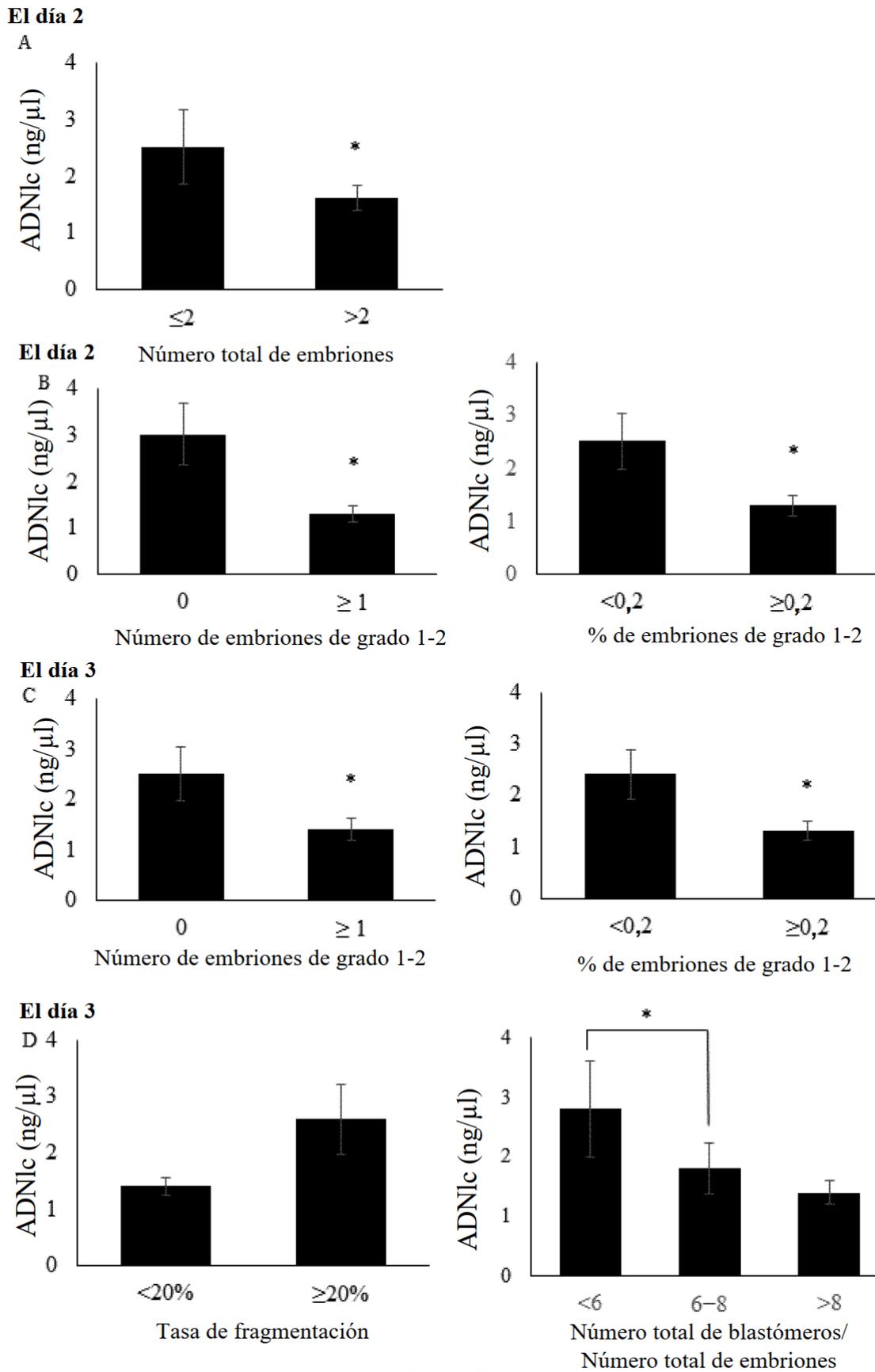
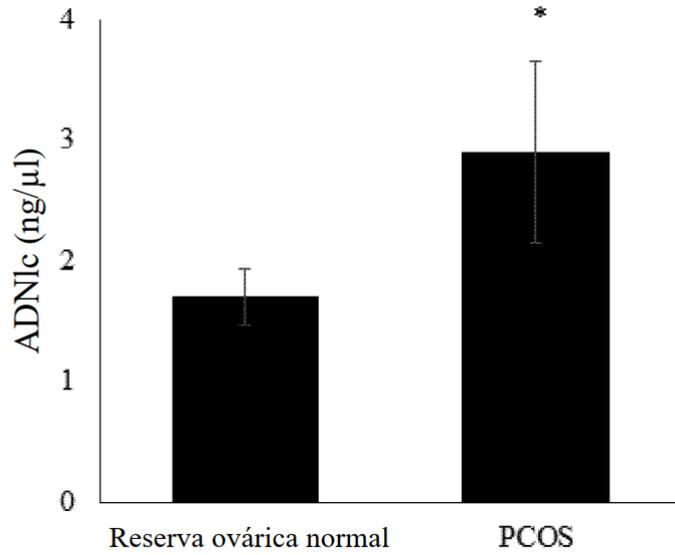
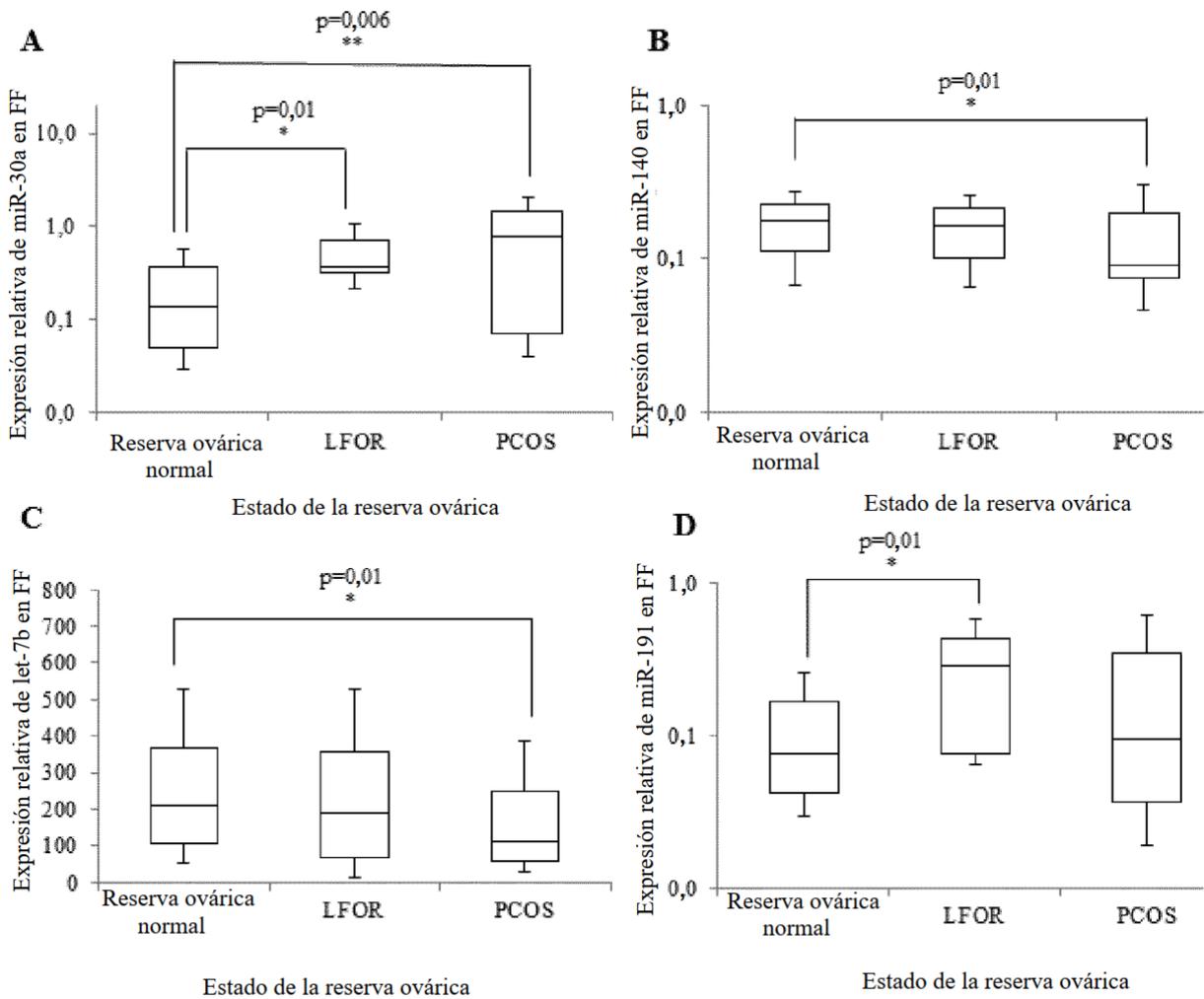


Figura 7



Estado de la reserva ovárica

Figura 8



Estado de la reserva ovárica

Estado de la reserva ovárica

Figura 9

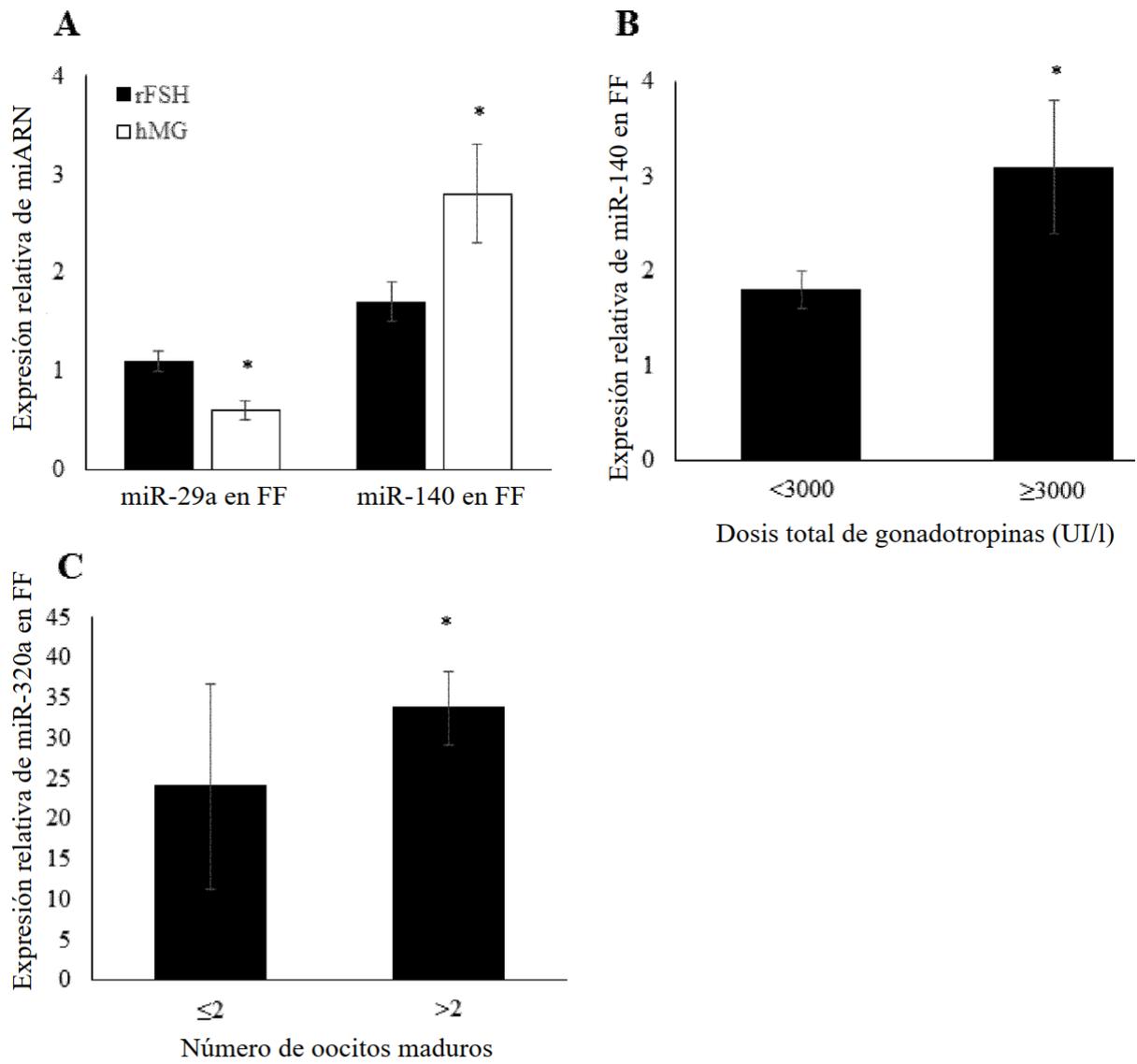


Figura 10

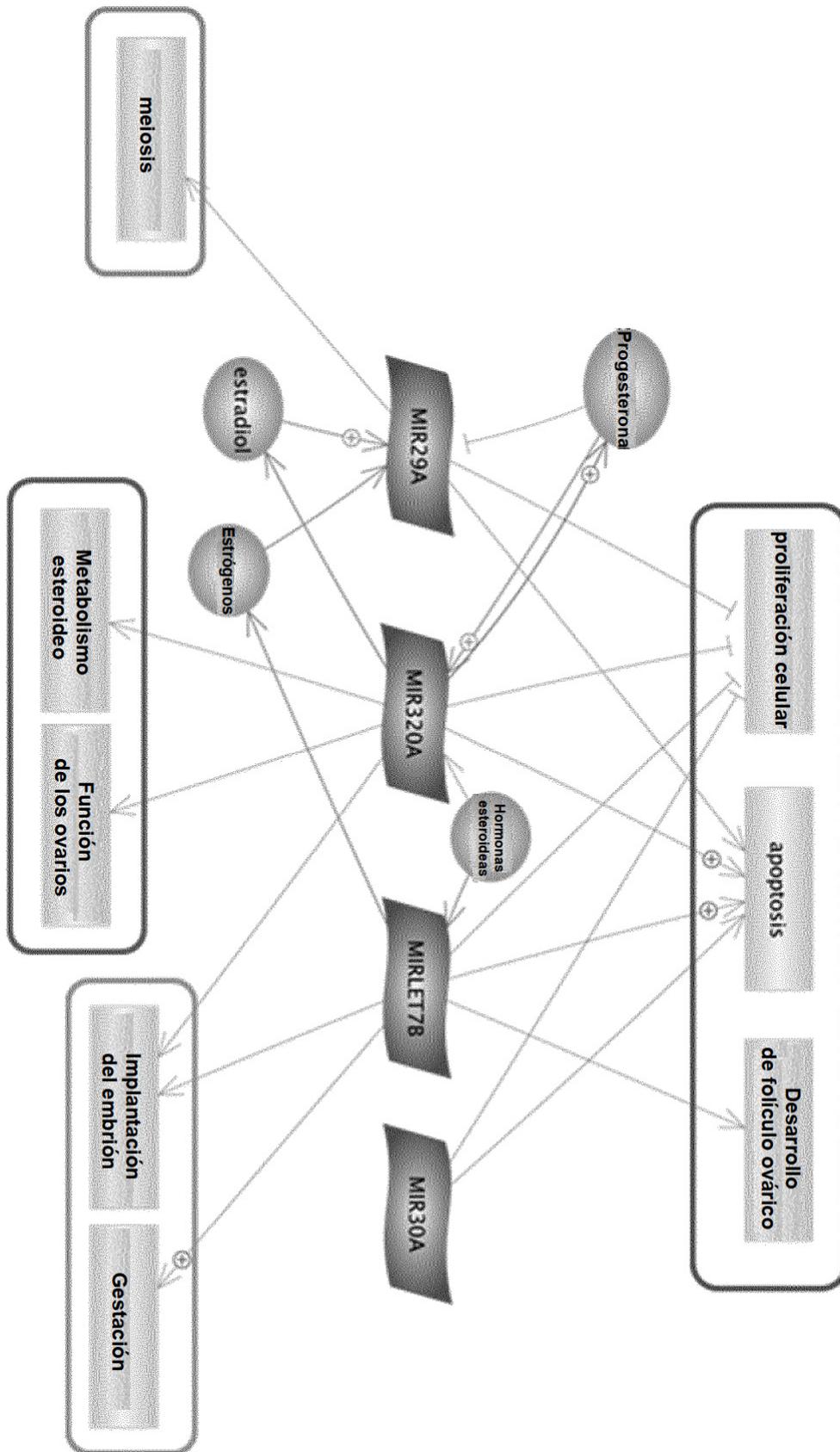


Figura 11

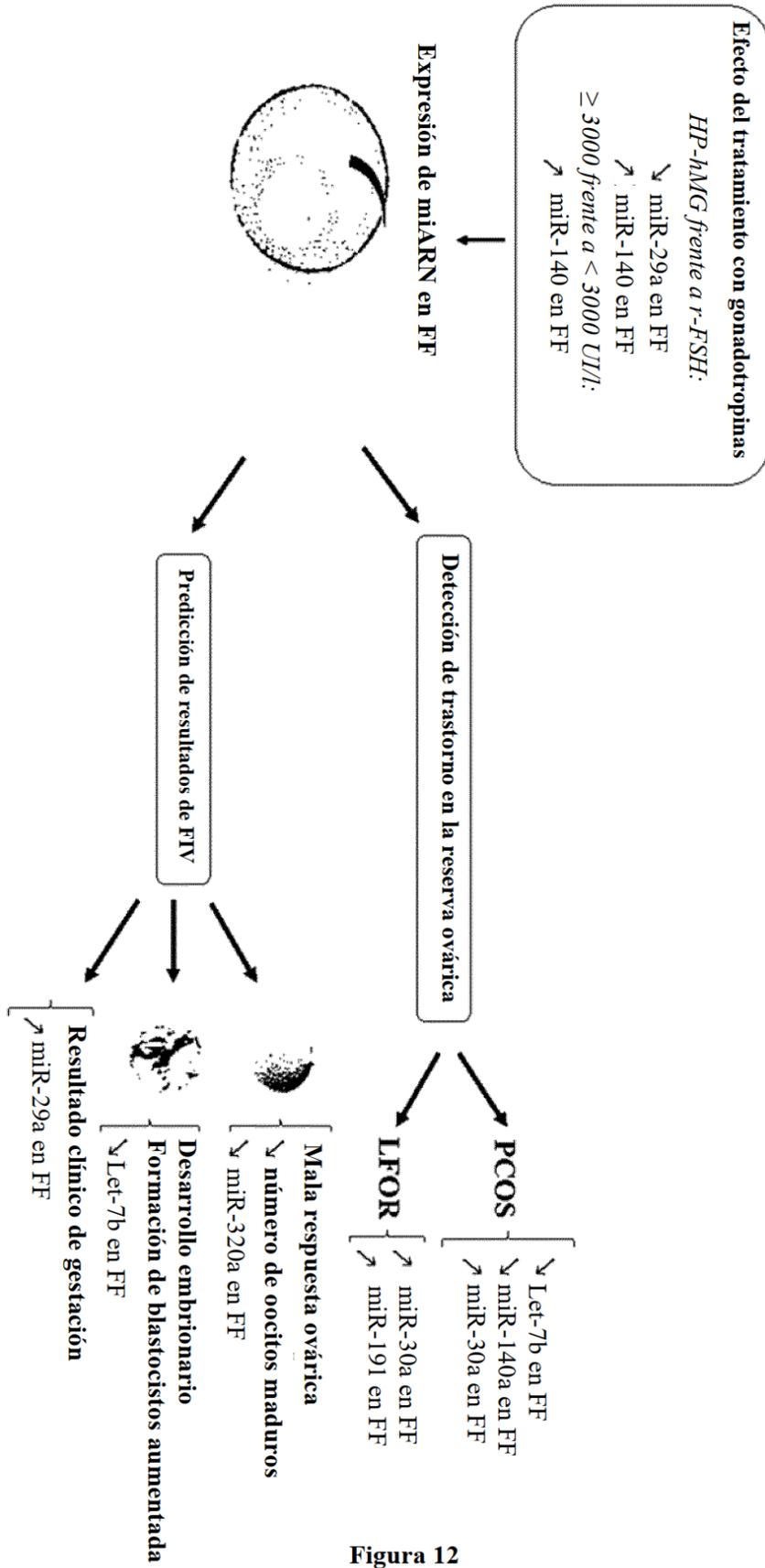


Figura 12