

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 474**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2016 E 20213489 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3839069**

54 Título: **Método para predecir el acortamiento del cuello uterino y el nacimiento prematuro**

30 Prioridad:

06.03.2015 GB 201503792

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2024

73 Titular/es:

**IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED
(100.0%)
Level 1 Faculty Building Imperial
College Exhibition Road
London SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

**COOK, JOANNA;
BENNETT, PHILLIP;
TERZIDOU, VASILIKI y
MACINTYRE, DAVID**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 474 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

Método para predecir el acortamiento del cuello uterino y el nacimiento prematuro

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a microARNs (miARNs) que son útiles para predecir el acortamiento del cuello uterino y el parto prematuro. La invención proporciona métodos para predecir el riesgo de acortamiento del cuello uterino o el parto prematuro (PTL) un sujeto femenino embarazado y métodos para caracterizar a un sujeto femenino embarazado que tiene antecedentes de PTL previo, pérdida a mitad de trimestre o biopsia de cono cervical como que necesita una exploración cervical por ultrasonidos, intervención terapéutica o quirúrgica.

Antecedentes de la invención

15 De 600.000 nacimientos vivos en el Reino Unido por año, aproximadamente 8.000 tendrán un peso al nacer inferior a 1500 g, lo que equivale a una edad gestacional de menos de 32 semanas. De estos bebés prematuros, 1600 morirán y otros 600 desarrollarán parálisis cerebral. El impacto de la discapacidad aumenta drásticamente cuando el parto ocurre cerca de los límites de viabilidad alrededor de las 24 semanas. El estudio EPICURE describió cómo el 25% de los bebés nacidos antes de las 25 semanas que sobreviven para ser dados de alta del hospital desarrollan una discapacidad grave, el 25% una discapacidad leve y menos del 50% tienen un desarrollo normal a los 30 meses de edad¹. Por lo tanto, el impacto económico de brindar atención médica y social a largo plazo a estas familias es significativo.

25 El parto prematuro (PTL) es un síndrome, no un proceso patológico único. Algunas etiologías, por ejemplo el desprendimiento de placenta, son impredecibles e inevitables. El "estrés" materno y/o fetal puede causar parto prematuro por los efectos mediados por el cortisol sobre la CRH placentaria. El embarazo múltiple causa un parto prematuro tanto a través de la CRH placentaria como a través del estiramiento mecánico del útero y el cuello uterino. Pero éstas son, en general, causas de parto prematuro "tardío" con secuelas médicas y económicas menos graves.

30 En el embarazo normal, el inicio de las contracciones está precedido por varias semanas de cambios en el cuello uterino caracterizados por una disminución del colágeno y un aumento del contenido de agua, identificables clínicamente como un borramiento y acortamiento o "maduración" del cuello uterino. La maduración del cuello uterino está mediada por la secreción de prostaglandinas y citocinas en el polo inferior del útero y se asocia a una infiltración de células inflamatorias. El inicio tardío de las contracciones uterinas está mediado por la regulación positiva de un grupo de proteínas asociadas a la contracción (CAPs), tal como los receptores de prostaglandina y oxitocina, y por uniones gap cuya expresión es reprimida por la progesterona. El parto prematuro antes de las 32 semanas se asocia a corioamnionitis e infección bacteriana ascendente, pero estudios recientes han demostrado que la mayoría de los casos de parto prematuro temprano no pueden atribuirse únicamente a la infección ascendente.

45 La incompetencia de cuello uterino clásica (secundaria a una debilidad congénita o adquirida después de una cirugía de cuello uterino destructiva) es una causa de pérdida del embarazo en el segundo trimestre y de parto prematuro temprano, y ahora se acepta que la competencia del cuello uterino es un continuo. En mujeres cuyo cuello uterino es corto o débil, se pueden producir procesos bioquímicos de maduración cervical debido al estiramiento en el polo inferior del útero. Esto conduce a un mayor ablandamiento y acortamiento del cuello uterino y, por lo tanto, a un círculo vicioso. Entonces, las bacterias pueden acceder al útero y, por lo tanto, el parto prematuro final parece estar asociado con la infección, aunque los factores de iniciación iniciales no fueran específicos de la infección. Existe una mala correlación entre la respuesta inflamatoria, que estimula el parto prematuro, y la cantidad de bacterias presentes. En algunas mujeres hay una respuesta inflamatoria exagerada a cantidades triviales de bacterias. Esto conduce de manera similar a la maduración y acortamiento del cuello uterino, lo que permite que más bacterias accedan al útero y, en última instancia, a una forma de parto prematuro clínicamente indistinguible de la asociada con un cuello uterino debilitado. Por lo tanto, es posible que, si se puede identificar a las mujeres en riesgo de parto prematuro temprano, una intervención que desconecte de manera efectiva los procesos bioquímicos que conducen al acortamiento del cuello uterino pueda prevenir o retrasar el inicio del parto prematuro y, por lo tanto, mejorar significativamente el resultado neonatal.

60 Las estrategias actuales para la predicción de PTL son limitadas. El PTL se puede predecir en aquellos casos que se sabe que tienen un mayor riesgo a través de la medición en serie de la longitud del cuello uterino (CL) en una ecografía transvaginal. Las mujeres que han tenido un PTL previo, una pérdida en el segundo trimestre (MTL) o una biopsia de cono de cuello uterino son elegibles para un cribado de CL, aunque la provisión en el Reino Unido no es universal.

65 Las mujeres con acortamiento del cuello uterino tienen un mayor riesgo de parto prematuro espontáneo, pero permanecen asintomáticas hasta que el parto prematuro es inminente. Se dispone de intervenciones tempranas para prolongar el embarazo, pero solo se pueden realizar si los obstetras son conscientes de que se ha producido

un acortamiento del cuello uterino. La ecografía vaginal se puede utilizar para diagnosticar el acortamiento del cuello uterino, pero es costosa e invasiva y, por lo tanto, solo está disponible para un número limitado de mujeres que acuden a centros especializados.

5 Si se observa que la CL es menor de 25 mm, hay dos intervenciones disponibles: cerclaje de cuello uterino y tratamiento con progesterona. El cerclaje actúa no solo para dar soporte a un cuello uterino débil, sino también para retener el tapón mucoso antibacteriano y prevenir una activación de la inflamación mediada por el estiramiento. El tratamiento con progesterona es eficaz y probablemente actúa a través de la inhibición de las proteínas asociadas a la contracción y la expresión del factor nuclear kB.

10 Sin embargo, las pruebas clínicas de vigilancia de la CL son laboriosas, costosas y no se brinda atención e intervención para mujeres sin factores de riesgo preexistentes. Además, usar solo el historial médico previo para evaluar la elegibilidad carece de sensibilidad y > 80% de las mujeres que asisten a un servicio de este tipo no requieren ninguna intervención y dan a luz a término.

15 Se ha sugerido que la medición de rutina de la longitud del cuello uterino a las 18 a 22 semanas, ligada a una terapia con progesterona, debería ofrecerse a toda la población obstétrica¹²⁻¹³. Sin embargo, esto sería potencialmente costoso.

20 Por lo tanto, un panel de biomarcadores, medidos de forma rutinaria en todos los embarazos, que sean capaces de predecir el cambio futuro del cuello uterino o el propio PTL, sería de gran valor para actuar con mayor precisión en las mujeres embarazadas en términos de vigilancia y terapia. Actualmente, solo hay un biomarcador disponible para predecir el PTL; la fibronectina fetal (fFN) en el fluido vaginal o cervical. La fFN no es útil en la predicción a distancia del PTL temprano porque normalmente está presente en las secreciones cervicales hasta las 22 semanas de gestación. Los niveles de líquido amniótico o de citocinas de secreción cervical también predecirán el PTL, pero solo cerca del inicio del parto². Todas las mujeres embarazadas se someten actualmente a análisis de sangre para detectar el grupo Rhesus y las infecciones virales a las 13 semanas de embarazo; éste es un momento ideal para detectar el riesgo de PTL temprano, y lo suficientemente pronto para permitir la inscripción en un programa de vigilancia y la realización de una intervención.

30 La regulación cuidadosa de la expresión génica en el miometrio y las membranas fetales es fundamental para controlar el momento del inicio del parto. Los miARNs son moléculas pequeñas, monocatenarias, de 19-25 nucleótidos que han surgido como importantes reguladores de la expresión génica en casi todos los eucariotas; se cree que un tercio de la proteína que codifica el genoma humano está regulada por miARNs. Los miARNs son ARNs no codificantes y funcionan de manera similar al ARN de pequeña interferencia para regular negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional. La biogénesis de miARN implica una serie de pasos que conducen al silenciamiento de genes. En resumen, los miARNs se transcriben en el núcleo como miARNs primarios más largos, que se escinden para formar miARNs precursores en forma de horquilla. Estos precursores se exportan desde el núcleo y se escinden adicionalmente para formar el miARN maduro que se asocia con el complejo de silenciamiento inducido por ARN para dirigirse a la región 3' no traducida de ARNm específicos e inhibir su traducción a proteína. Los miARNs están presentes en el plasma en un estado libre de células y permanecen estables y fácilmente medibles. En consecuencia, su utilidad potencial como biomarcador de enfermedad o de respuesta al tratamiento ha sido ampliamente reconocida³.

45 Los miARNs se expresan de una manera específica de tejido y, por lo tanto, su expresión diferencial, tanto espacial como en el tiempo, es un área de investigación potencialmente rica. Actualmente, varios grupos están investigando la expresión de miARN en las membranas corioamnióticas, la placenta, el cordón umbilical y el miometrio. La ciclooxigenasa 2 (COX2) (que cataliza la síntesis de prostaglandina, que a su vez modula las contracciones uterinas) se regula a nivel post-transcripcional a través de cambios en miARNs específicos⁴. Además, los estudios de bloqueo de proteínas esenciales para la biogénesis de miARN han demostrado que los miARNs desempeñan un papel esencial en la reproducción. DICER es una endonucleasa de ARNasa III que es esencial para la biogénesis de miARNs y de (si)ARNs pequeños de interferencia, y la pérdida de DICER en las células granulosa ováricas, en el tejido lúteo, en los ovocitos, los oviductos y potencialmente el útero, hace que hembras de ratón sean infértiles⁵. Además, la alteración del gen de Ago 2, otro componente importante de la interferencia del ARN (ARNi) conduce a la muerte del embrión poco después de las implantaciones. Curiosamente, los miARNs placentarios también son liberados a la circulación materna. Permanecen estables y son fácilmente detectables en sangre y, por lo tanto, se ha propuesto que podrían proporcionar nuevos biomarcadores no invasivos para trastornos placentarios como la preeclampsia o la restricción del crecimiento fetal⁷.

60 El conocimiento actual de cómo la expresión de miARN puede regular la expresión del gen del miometrio humano y, por lo tanto, las contracciones, es limitado. Renthal et al encontraron que la familia de miARNs miR-200 está regulada al alza en el miometrio de ratón y humano en el parto a término⁸. ZEB1 y ZEB2 se identificaron como dos dianas de este grupo en estudios funcionales, y se encontró que estaban regulados a la baja coordinadamente en modelos de ratón de PTL. ZEB1 y ZEB2 actúan como represores transcripcionales, que pueden inhibir la expresión de genes asociados a la contracción, el receptor de oxitocina y conexina-43, y bloquear la contractilidad inducida por la oxitocina en células miometriales cultivadas.

Williams et al vincularon el miR-200a con el metabolismo de la progesterona a través de la represión de STAT5b, un represor transcripcional de la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa metabolizadora de P4, en el útero de ratón y de humano⁹. No está claro cómo esto es relevante para los seres humanos, cuando el parto no está asociado con una reducción de la progesterona circulante.

Recientemente, un estudio que examinó la expresión global de miARNs en el tejido de cuello uterino de mujeres después de un parto vaginal a término o un LSCS pre-parto, describió 226 miARNs expresados en el cuello uterino¹⁰. Además, se encontró que miR-223, miR-34b y miR-34c tenían una mayor expresión con el parto. Montenegro et al. examinaron la expresión de miARN en las membranas fetales en cuatro cohortes distintas: NL y L a término, y PTL con o sin corioamnionitis histológica¹⁴. Los autores detectaron 153 y 152 miARNs diferentes en al menos el 50% de las muestras en los grupos de término y prematuro, respectivamente. No encontraron diferencias en los grupos de término NL y término L, pero describieron 13 miARNs con expresión reducida con el avance de la edad gestacional. También encontraron que el miR-223 y el miR-338 habían aumentado su expresión en las membranas de PTL en presencia de inflamación.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir el riesgo de acortamiento del cuello uterino o el parto prematuro (PTL) en un sujeto femenino embarazado, que comprende determinar el nivel de expresión de uno o más de las moléculas de miARN extraídos de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y compararlo con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un riesgo alto o bajo de acortamiento de cuello uterino o PTL y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión se determina y se compara incluyen hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un método para caracterizar a un sujeto femenino embarazado que tiene antecedentes de un PTL previo, pérdida en el segundo trimestre o biopsia de cono cervical, como que necesita una exploración cervical por ultrasonidos, una intervención terapéutica o quirúrgica, que comprende determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y comparar con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto necesita una exploración cervical por ultrasonidos y/o intervención terapéutica y/o una intervención quirúrgica y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión se determina y se compara incluyen hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).

Un tercer aspecto de la invención está dirigido al uso de un sustrato sólido que comprende una sonda específica para la molécula de miARN de SEQ ID NO: 2, y que opcionalmente comprende además una o más sondas adicionales específicas para una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas de las SEQ ID. NOs. 1 y 3-23, en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las sondas están inmovilizadas sobre la superficie del sustrato; y preferentemente, en el que el sustrato sólido comprende sondas específicas para todas las SEQ ID NOs. 1-9.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 se refiere a hsa-let-7a-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-let-7a-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-let-7a-5p para predecir el acortamiento cervical en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,62). Se compara la expresión de hsa-let-7a-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello cervical (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-let-7a-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,69) (D). Se compara la expresión de hsa-let-7a-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-let-7a-5p para predecir el acortamiento del cuello uterino en TPC (AUC=0,78) (F). Tasa de cambio en cada punto temporal de la expresión de hsa-let-7a-5p en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G) La tasa de cambio aumenta con la gestación.

La Figura 2 se refiere a hsa-miR-374a-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-374a-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de

la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-374a-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,81). Se compara la expresión de hsa-miR-374a-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-374a-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,79) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-374a-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-374a-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,78) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-374a-5p en cada punto temporal en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían una longitud de cuello uterino normal (G).

La Figura 3 se refiere a hsa-miR-15b-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-15b-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-15b-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,81). Se compara la expresión de hsa-miR-15b-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-15b-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,79) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-15b-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-15b-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,78) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-15b-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). La expresión relativa de hsa-miR-15b-5p aumenta con el avance de la gestación.

La Figura 4 se refiere a hsa-miR-19b-3p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-19b-3p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-19b-3p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,74). Se compara la expresión de hsa-miR-19b-3p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-19b-3p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,80) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-19b-3p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-19b-3p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,73) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-19b-3p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). La tasa de cambio aumenta con la gestación.

La Figura 5 se refiere a hsa-miR-23a-3p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-23a-3p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-23a-3p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,65). Se compara la expresión de hsa-miR-23a-3p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-23a-3p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,75) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-23a-3p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-23a-3p para predecir el acortamiento de cuello

uterino en TPC (AUC=0,76) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-23a-3p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). La expresión relativa de hsa-miR-23a-3p aumenta con la gestación.

5

La Figura 6 se refiere a hsa-miR-93-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-93-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-93-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,68). Se compara la expresión de hsa-miR-93-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-93-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,78) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-93-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-93-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,70) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-93-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). La expresión relativa de hsa-miR-93-5p aumenta con el avance de la gestación.

10

15

20

25

La Figura 7 se refiere a hsa-miR-150-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-150-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-150-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,73). Se compara la expresión de hsa-miR-150-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-150-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,79) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-150-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-150-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,83) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-150-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). La expresión relativa de hsa-miR-150-5p aumenta con el avance de la gestación.

30

35

40

45

La Figura 8 se refiere a hsa-miR-185-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-185-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-185-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,67). Se compara la expresión de hsa-miR-185-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto de tiempo B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-185-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,79) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-185-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-185-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,83) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-185-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). El aumento de la expresión relativa de hsa-miR-185-5p no se ve alterado con el avance de la gestación.

50

55

60

La Figura 9 se refiere a hsa-miR-191-5p como predictor del acortamiento de cuello uterino. Se compara la expresión de hsa-miR-191-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=18) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de

65

hsa-miR-191-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPA (B) después del análisis de PCR (AUC=0,60). Se compara la expresión de hsa-miR-191-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=21) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=16), medido mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-191-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPB (AUC=0,67) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-191-5p en plasma de mujeres cuyo cuello uterino se acortó hasta <25 mm (n=17) en comparación con aquellas que no mostraron acortamiento de cuello uterino (n=15), medido mediante RT PCR (E) en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-191-5p para predecir el acortamiento de cuello uterino en TPC (AUC=0,73) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-191-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que exhibieron acortamiento de cuello uterino, en comparación con la expresión en mujeres que tenían longitudes de cuello uterino normales (G). La expresión relativa de hsa-miR-191-5p aumenta con el avance de la gestación.

La Figura 10 se refiere a hsa-let-7a-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-let-7a-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-let-7a-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,52) (B). Se compara la expresión de hsa-let-7a-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-let-7a-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,64) (D). Se compara la expresión de hsa-let-7a-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-let-7a-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,078) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-let-7a-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-let-7a-5p aumenta en TPC.

La Figura 11 se refiere a hsa-miR-374a-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-374a-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-374a-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,68) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-374a-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-374a-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,69) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-374a-5p en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-374a-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,072) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-374a-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-374a-5p aumenta en TPC.

La Figura 12 se refiere a hsa-miR-15b-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-15b-5p en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-15b-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,59) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-15b-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-15b-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,64) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-15b-5p en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-15b-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,077) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-15b-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-15b-5p es máxima en TPA y TPC.

La Figura 13 se refiere a hsa-miR-19b-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-19b-5p en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-19b-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,62) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-19b-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto de tiempo B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-19b-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,68) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-19b-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-19b-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,0,67) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-19b-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-19b-5p es máxima en TPA y TPC.

La Figura 14 se refiere a hsa-miR-23a-3p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-23a-3p en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-23a-3p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,61) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-23a-3p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-23a-3p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,81) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-23a-3p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-23a-3p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,70) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-23a-3p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-23a-3p aumenta con el avance de la gestación.

La Figura 15 se refiere a hsa-miR-93-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-93-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-93-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,51) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-93-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-93-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,58) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-93-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-93-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,70) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-93-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-93-5p es máxima en TPC.

La Figura 16 se refiere a hsa-miR-150-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-150-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-150-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,59) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-150-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-150-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,67) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-150-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-150-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,82) (F).

Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-150-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-150-5p aumenta con el avance de la gestación.

5 La Figura 17 se refiere a hsa-miR-185-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-185-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-185-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,60) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-185-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-185-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,59) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-185-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-185-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,73) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-185-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-185-5p es máxima en TPC.

La Figura 18 se refiere a hsa-miR-191-5p como predictor del parto prematuro. Se compara la expresión de hsa-miR-191-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=8) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR) en el punto temporal A (12-14⁺⁶ semanas de gestación) (TPA) (A). Curva de característica operada por el receptor (ROC) que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-191-5p para predecir el parto prematuro en TPA después del análisis de PCR (AUC=0,59) (B). Se compara la expresión de hsa-miR-191-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=10) con las que dieron a luz a término (n=27), medida mediante RT PCR en el punto temporal B (15-17⁺⁶ semanas de gestación) (TPB) (C). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-191-5p para predecir el parto prematuro en TPB (AUC=0,66) (D). Se compara la expresión de hsa-miR-191-5p en plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación (n=7) con las que dieron a luz a término (n=25), medida mediante RT PCR en el punto temporal C (19-21⁺⁶ semanas de gestación) (TPC) (E). Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad de hsa-miR-191-5p para predecir el parto prematuro en TPC (AUC=0,67) (F). Tasa de cambio de la expresión de hsa-miR-185-5p en cada punto temporal, en el plasma de mujeres que dieron a luz antes de las 34 semanas de gestación, en comparación con la expresión en mujeres que dieron a luz a término (G). La expresión relativa de hsa-miR-185-5p es mayor en los tres puntos temporales, en mujeres que llegan a tener un parto prematuro.

La Figura 19 muestra una curva característica del operador del receptor que describe la capacidad del hsa-miR-150-5p en plasma para predecir el acortamiento de cuello uterino a las 12-14⁺⁶ semanas de gestación (AUC=0,86).

La Figura 20 muestra una curva característica del operador del receptor que describe la capacidad combinada de hsa-miR-150-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-185-5p y hsa-miR-374a-5p en plasma para predecir el acortamiento de cuello uterino a las 12-14⁺⁶ semanas de gestación (AUC=0,87).

La Figura 21 muestra una curva característica del operador del receptor que describe la capacidad combinada de los nueve microARN plasmáticos para predecir el acortamiento de cuello uterino a las 12-14⁺⁶ semanas de gestación (AUC=0,90).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de un grupo de moléculas de miARN que están presentes en la circulación materna y cuya concentración en la circulación predice un posterior acortamiento del cuello uterino. Para cada una de las moléculas de miARN identificadas en la presente memoria descriptiva, la concentración de miARN en la circulación materna se ve alterada en mujeres cuyo cuello uterino se acorta posteriormente. De forma ventajosa, los niveles de expresión de estos miARNs se pueden medir en muestras de sangre que se pueden obtener de la mujer en las primeras etapas del embarazo (desde la semana 12 de gestación en adelante), lo que proporciona un medio mínimamente invasivo para la detección/predicción temprana del acortamiento de cuello uterino, que puede conducir a un parto prematuro.

Por lo tanto, el primer aspecto de la invención proporciona un método para predecir el riesgo de acortamiento de cuello uterino en un sujeto femenino embarazado, que comprende determinar el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y compararlo con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN en

comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un riesgo alto o bajo de acortamiento de cuello uterino o PTL y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión se determina y se compara incluye hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).

5 En una realización, el método comprende además determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas del grupo que comprende: hsa-let-7a-5p (SEQ ID NO. 1); hsa-miR-15b-5p (SEQ ID NO. 3); hsa-miR-19b-3b (SEQ ID NO. 4); hsa-miR-23a-3p (SEQ ID NO. 5); hsa-miR-93-5p (SEQ ID NO. 6); hsa-miR-150-5p (SEQ ID NO. 7); hsa-miR-185-5p (SEQ ID NO. 8); hsa-miR-191-5p (SEQ ID NO. 9); hsa-miR-106b-5p (SEQ ID NO. 10); hsa-miR-22-3p (SEQ ID NO. 11); hsa-miR-26b-5p (SEQ ID NO. 12); hsa-let-7i-5p (SEQ ID NO. 13); hsa-miR-4454 (SEQ ID NO. 14); hsa-miR-144-ep (SEQ ID NO. 15); hsa-miR-223-3p (SEQ ID NO. 16); hsa-miR-92a-3p (SEQ ID NO. 17); hsa-let-7b-5p (SEQ ID NO. 18); hsa-miR-188-5p (SEQ ID NO. 19); hsa-miR-16-5p (SEQ ID NO. 20); hsa-let-7g-5p (SEQ ID NO. 21); hsa-miR-148b-3p (SEQ ID NO. 22); y hsa-miR-122-5p (SEQ ID NO. 23).

15 Si la molécula de miARN que se detecta usando el método de acuerdo con este aspecto de la invención es una molécula cuya sobreexpresión está asociada a un mayor riesgo de acortamiento de cuello uterino (esto incluye cada uno de los miARN identificados en la Tabla 1), entonces un nivel de expresión elevado de dicho miARN en la muestra de la paciente en comparación con el valor de control es indicativo de un alto riesgo de acortamiento de cuello uterino en dicha paciente.

20 Si la molécula de miARN que se detecta mediante el método de acuerdo con este aspecto de la invención es una molécula cuya subexpresión está asociada a un mayor riesgo de acortamiento de cuello uterino, entonces un nivel de expresión de dicho miARN en la muestra de la paciente que es menor que el valor de control es indicativo de un alto riesgo de acortamiento de cuello uterino en dicha paciente.

25 La dirección del cambio de la diferencia en la expresión en comparación con el valor de control (es decir, expresión elevada o disminuida) que es indicativo de un alto riesgo de acortamiento de cuello uterino para cada uno de los miARN de la invención se indica en la columna final de las Tablas 1 y 2.

30 Para todos los miARNs enumerados en la Tabla 1, y para todos los miARNs enumerados en la Tabla 2, excepto el hsa-miR-188-5p, un nivel de expresión elevado de la molécula de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un alto riesgo de acortamiento de cuello uterino.

35 Para el miARN hsa-miR-188-5p (Tabla 2), una disminución en el nivel de expresión de la molécula de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un alto riesgo de acortamiento de cuello uterino.

40 Si, como resultado de la realización del método de la invención, se identifica que la paciente tiene un alto riesgo de acortamiento del cuello uterino, se podrían ofrecer más pruebas de diagnóstico o monitorización, tal como la exploración por ultrasonidos de la longitud del cuello uterino. Si se observa que el cuello uterino es corto, la paciente puede ser tratada con intervenciones terapéuticas.

45 Las intervenciones terapéuticas adecuadas incluyen la administración de uno o más de: antagonistas del receptor de oxitocina, antagonistas del receptor de prostaglandina, agonistas del receptor beta-adrenérgico, donadores de óxido de nitrógeno, sulfato de magnesio, inhibidores de la prostaglandina sintasa, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), moléculas pequeñas y otros fármacos antiinflamatorios, bloqueadores de los canales de calcio, progesterona, caproato de 17-a-hidroxi progesterona y análogos de progesterona. La paciente puede ser tratada adicional o alternativamente con una intervención quirúrgica tal como el cerclaje cervical.

50 Si no hay diferencia en el nivel de expresión de dicha molécula de miARN en la muestra de la paciente en comparación con el valor de control, ni cambio en el nivel de expresión de dicha molécula de miARN en comparación con el valor de control en sentido opuesto al que es indicativo de riesgo de acortamiento de cuello uterino para dicho miARN, esto indica que el sujeto tiene un riesgo bajo de acortamiento de cuello uterino. Si se identifica que el sujeto tiene un riesgo bajo de acortamiento de cuello uterino, es poco probable que se requieran más pruebas de diagnóstico y/o intervenciones terapéuticas o quirúrgicas, tal como las descritas en la presente memoria descriptiva.

60 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "acortamiento del cuello uterino" (también denominado "maduración cervical") se refiere al cambio (es decir, la reducción) en la longitud del cuello uterino que se produce durante el embarazo. El acortamiento del cuello uterino a una longitud de alrededor de 25 mm o menos es una causa de pérdida del embarazo y de parto prematuro temprano, y, a pesar del tratamiento preventivo, alrededor del 50% de las mujeres cuyo cuello uterino se acorta tendrá un parto prematuro.

65 El grupo de marcadores de miARN identificado por los inventores de la presente también puede usarse para determinar el riesgo de que un sujeto embarazado sufra un parto prematuro (PTL).

Como tal, la invención también proporciona un método para predecir el riesgo de PTL en un sujeto embarazado,

5 que comprende determinar el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y compararlo con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un riesgo alto o bajo de acortamiento del cuello uterino o PTL, y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión es determinado y comparado incluye hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).

10 En una realización, el método comprende además determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas del grupo que comprende: hsa-let-7a-5p (SEQ ID NO. 1); hsa-miR-15b-5p (SEQ ID NO. 3); hsa-miR-19b-3b (SEQ ID NO. 4); hsa-miR-23a-3p (SEQ ID NO. 5); hsa-miR-93-5p (SEQ ID NO. 6); hsa-miR-150-5p (SEQ ID NO. 7); hsa-miR-185-5p (SEQ ID NO. 8); hsa-miR-191-5p (SEQ ID NO. 9); hsa-miR-106b-5p (SEQ ID NO. 10); hsa-miR-22-3p (SEQ ID NO. 11); hsa-miR-26b-5p (SEQ ID NO. 12); hsa-let-7i-5p (SEQ ID NO. 13); hsa-miR-4454 (SEQ ID NO. 14); hsa-miR-144-ep (SEQ ID NO. 15); hsa-miR-223-3p (SEQ ID NO. 16); hsa-miR-92a-3p (SEQ ID NO. 17); hsa-let-7b-5p (SEQ ID NO. 18); hsa-miR-188-5p (SEQ ID NO. 19); hsa-miR-16-5p (SEQ ID NO. 20); hsa-let-7g-5p (SEQ ID NO. 21); hsa-miR-148b-3p (SEQ ID NO. 22); y hsa-miR-122-5p (SEQ ID NO. 23).

20 Si la molécula de miARN que se detecta mediante el método de acuerdo con este aspecto de la invención es una molécula cuya sobreexpresión está asociada con un mayor riesgo de PTL, entonces un nivel de expresión de dicho miARN en la muestra de la paciente que sea elevado en comparación con el valor de control es indicativo de un riesgo alto de PTL en dicha paciente.

25 Si la molécula de miARN que se detecta mediante el método de acuerdo con este aspecto de la invención es una molécula cuya subexpresión está asociada con un mayor riesgo de PTL, entonces un nivel de expresión de dicho miARN en la muestra de la paciente que sea menor que el valor de control es indicativo de un riesgo alto de PTL en dicha paciente.

30 Si, como resultado de la realización del método de la invención, se identifica que la paciente tiene un riesgo alto de PTL, entonces se pueden realizar más pruebas de diagnóstico o seguimiento y/o se puede tratar a la paciente con intervenciones terapéuticas, cuyo objetivo es prevenir un parto prematuro. Las intervenciones terapéuticas adecuadas incluyen la administración de uno o más de: antagonistas del receptor de oxitocina, antagonistas del receptor de prostaglandina, agonistas del receptor beta-adrenérgico, donadores de óxido de nitrógeno, sulfato de magnesio, inhibidores de la prostaglandina sintasa, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), moléculas pequeñas y otros fármacos antiinflamatorios, bloqueadores de los canales de calcio, progesterona, caproato de 17-a-hidroxiprogesterona y análogos de progesterona. La paciente puede ser tratada adicional o alternativamente con una intervención quirúrgica, tal como un cerclaje cervical.

40 La dirección del cambio de la diferencia en la expresión en comparación con el valor de control que es indicativo de alto riesgo de PTL para cada uno de los miARNs de la invención se indica en la columna final de las Tablas 1 y 2.

45 Para todos los miARNs enumerados en la Tabla 1, y todos los miARNs enumerados en la Tabla 2, excepto el hsa-miR-188-5p, un nivel de expresión elevado de la molécula de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un riesgo alto de PTL.

50 Para el miARN hsa-miR-188-5p (Tabla 2), una disminución en el nivel de expresión de la molécula de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un alto riesgo de PTL.

55 Si no hay diferencia en el nivel de expresión de dicha molécula de miARN en la muestra de la paciente con respecto al valor de control, ni diferencia en el nivel de expresión de dicha molécula de miARN con respecto al valor de control en sentido opuesto al que es indicativo de riesgo de PTL para dicho miARN, esto indica que el sujeto tiene un riesgo bajo de PTL. Si, como resultado de la realización del método de la invención, se identifica que el sujeto tiene un riesgo bajo de PTL, es poco probable que se requieran más pruebas de diagnóstico o seguimiento y/o intervenciones terapéuticas.

60 El término "parto prematuro (PTL)" se refiere a la condición en la que el parto comienza tres o más semanas antes del período completo de gestación de aproximadamente 40 semanas (es decir, el parto comienza a las 37 semanas de gestación o menos). El PTL puede provocar un parto pretérmino (o prematuro).

65 El término "riesgo alto" se refiere a un nivel de riesgo de acortamiento del cuello uterino o de PTL por el que es apropiado realizar más pruebas de diagnóstico, una monitorización de la paciente o una intervención terapéutica. El término "riesgo bajo" se refiere a un nivel de riesgo de acortamiento del cuello uterino o de PTL por el que es poco probable que sean necesarias más pruebas de diagnóstico, una monitorización de la paciente o una intervención terapéutica o quirúrgica.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "intervención terapéutica" se refiere al tratamiento de una paciente mediante la administración de uno o más fármacos. El término "intervención quirúrgica" se refiere

a realizar un procedimiento quirúrgico en la paciente.

Los métodos del primer aspecto de la invención se pueden aplicar a una población obstétrica general de bajo riesgo, con el fin de identificar el riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL en mujeres que no tienen antecedentes médicos que indiquen que están en riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL, y que de otro modo no serían sometidas a vigilancia ni recibirían ninguna intervención terapéutica o quirúrgica para prevenir el acortamiento del cuello uterino y/o el PTL.

Alternativamente, los métodos de la invención se pueden aplicar a una población obstétrica de alto riesgo, que comprende mujeres embarazadas que tienen un historial médico personal significativo que incluye uno o más de: PTL previo, pérdida en el segundo trimestre o biopsia de cono cervical, lo que indicaría que tienen riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL.

A todas las mujeres que demuestran acortamiento del cuello uterino se les ofrece algún tipo de tratamiento preventivo (generalmente cerclaje cervical o terapia con medicamentos tales como la progesterona), por lo que el mismo grupo de marcadores de miARN que han sido identificados por los inventores de la presente también es útil para predecir la necesidad de intervención terapéutica. Esto es particularmente útil en el contexto de diferenciar entre sujetos embarazados que tienen antecedentes de PTL previo, pérdida en el segundo trimestre o biopsia de cono cervical y que necesitan una ecografía cervical, un cerclaje cervical y/o una terapia con progesterona, y aquellas que tienen antecedentes que las ponen en riesgo de PTL pero que no requieren tal tratamiento o intervención.

La identificación de pacientes en poblaciones de alto riesgo de parto prematuro cuyo cuello uterino no se verá acortado permite eliminarlas de la vigilancia de alta intensidad de la longitud del cuello uterino. Esto es ventajoso desde la perspectiva de la paciente, porque no está sujeta a visitas de detección ecográficas innecesarias, y también desde la perspectiva de los proveedores de servicios de salud pública, ya que los recursos se pueden utilizar de una manera más eficiente y dirigida.

Por lo tanto, el segundo aspecto de la invención proporciona un método para caracterizar un sujeto embarazado, que tiene antecedentes de PTL previo, pérdida en el segundo trimestre o biopsia de cono cervical, como que necesita una exploración cervical por ultrasonidos y una intervención potencialmente terapéutica o quirúrgica, que comprende determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y comparar con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de la una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto necesita una exploración cervical por ultrasonidos y/o intervención terapéutica y/o intervención quirúrgica, y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión se determina y se compara incluye el hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).

En una realización, el método comprende además determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas del grupo que comprende: hsa-let-7a-5p (SEQ ID NO. 1); hsa-miR-15b-5p (SEQ ID NO. 3); hsa-miR-19b-3b (SEQ ID NO. 4); hsa-miR-23a-3p (SEQ ID NO. 5); hsa-miR-93-5p (SEQ ID NO. 6); hsa-miR-150-5p (SEQ ID NO. 7); hsa-miR-185-5p (SEQ ID NO. 8); hsa-miR-191-5p (SEQ ID NO. 9); hsa-miR-106b-5p (SEQ ID NO. 10); hsa-miR-22-3p (SEQ ID NO. 11); hsa-miR-26b-5p (SEQ ID NO. 12); hsa-let-7i-5p (SEQ ID NO. 13); hsa-miR-4454 (SEQ ID NO. 14); hsa-miR-144-ep (SEQ ID NO. 15); hsa-miR-223-3p (SEQ ID NO. 16); hsa-miR-92a-3p (SEQ ID NO. 17); hsa-let-7b-5p (SEQ ID NO. 18); hsa-miR-188-5p (SEQ ID NO. 19); hsa-miR-16-5p (SEQ ID NO. 20); hsa-let-7g-5p (SEQ ID NO. 21); hsa-miR-148b-3p (SEQ ID NO. 22); y hsa-miR-122-5p (SEQ ID NO. 23).

Si la molécula de miARN que se detecta usando el método de acuerdo con este aspecto de la invención es una molécula cuya sobreexpresión está asociada con un mayor riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL, entonces un nivel de expresión de dicho miARN en la muestra de la paciente que es elevado en comparación con el valor de control es indicativo de la necesidad de una exploración cervical por ultrasonidos, una intervención terapéutica y/o quirúrgica.

Si la molécula de miARN que se detecta utilizando el método de acuerdo con este aspecto de la invención es una molécula cuya expresión insuficiente está asociada con un mayor riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL, entonces un nivel de expresión de dicho miARN en la muestra del paciente que es menor que el valor de control indica la necesidad de una exploración cervical por ultrasonidos, una intervención terapéutica y/o quirúrgica.

Si, como resultado de la realización del método de la invención, se identifica que la paciente necesita una exploración cervical por ultrasonidos, una intervención terapéutica y/o quirúrgica, entonces se puede administrar dicha exploración y/o terapia y/o cirugía. Las intervenciones terapéuticas adecuadas incluyen la administración de uno o más de: antagonistas del receptor de oxitocina, antagonistas del receptor de prostaglandina, agonistas del receptor beta-adrenérgico, donadores de óxido de nitrógeno, sulfato de magnesio, inhibidores de la prostaglandina sintasa, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), moléculas pequeñas y otros fármacos antiinflamatorios, bloqueadores de los canales de calcio, progesterona, caproato de 17-a-hidroxiprogesterona y

análogos de progesterona. La intervención quirúrgica adecuada incluye cerclaje cervical.

5 La dirección del cambio de la diferencia en la expresión en comparación con el valor de control que es indicativo de alto riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL para cada uno de los miARN de la invención se indica en la columna final de las Tablas 1 y 2.

10 Para todos los miARNs enumerados en la Tabla 1, y todos los miARNs enumerados en la Tabla 2, excepto para hsa-miR-188-5p, un nivel elevado de expresión de la molécula de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un alto riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL.

15 Para el miARN hsa-miR-188-5p (Tabla 2), una disminución en el nivel de expresión de la molécula de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un alto riesgo de acortamiento del cuello uterino y/o de PTL.

20 Si no hay diferencia en el nivel de expresión de dicha molécula de miARN en la muestra de la paciente con respecto al valor de control, ni diferencia en el nivel de expresión de dicha molécula de miARN con respecto al valor de control en sentido opuesto al que es indicativo de riesgo de acortamiento del cuello uterino o de PTL para dicho miARN, esto indica que el sujeto no necesita una exploración cervical por ultrasonidos, una intervención terapéutica y/o quirúrgica. En este caso, no se requieren más exámenes de detección y/o terapia y/o cirugía y, sobre la base de este resultado, un médico puede decidir que el embarazo de la paciente puede continuar sin ninguna intervención terapéutica o quirúrgica o control de la longitud del cuello uterino.

25 Resultará evidente para el especialista en la materia que los métodos de la invención descritos en la presente memoria descriptiva se pueden utilizar junto con otros métodos para cribar en términos de PTL y determinar la longitud cervical que son bien conocidos en la técnica.

30 Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva y se refieren a cualquier animal hembra (por ejemplo, mamífero), incluidos, pero no limitados a, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores y similares. Preferentemente, el sujeto o paciente es un ser humano del sexo femenino.

Los términos "microARN", "miARN" y "miR" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva y se refieren a pequeñas moléculas de ARN no codificantes.

35 Los métodos de la invención descritos en la presente memoria descriptiva se llevan a cabo ex vivo. Para evitar dudas, el término "ex vivo" tiene su significado habitual en la técnica, refiriéndose a métodos que se llevan a cabo en o sobre una muestra biológica en un entorno artificial fuera del cuerpo de la paciente de la que se ha obtenido la muestra biológica.

40 Todas las referencias en la presente memoria descriptiva a una "muestra biológica" se refieren preferentemente a una muestra de sangre. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "muestra de sangre" incluye sangre completa y componentes sanguíneos, incluidos plasma y suero. En realizaciones preferentes, una o más moléculas de miARN se extraen del componente de plasma de una muestra de sangre completa o del componente de suero de una muestra de sangre completa.

45 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "plasma" se refiere a la porción fluida de la sangre, excluyendo las células sanguíneas y las plaquetas, pero que incluye proteínas disueltas, glucosa, factores de coagulación, electrolitos y hormonas. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "suero" se refiere a plasma sanguíneo sin factores de coagulación.

50 El experto en la técnica estará familiarizado con las técnicas convencionales de flebotomía que son adecuadas para obtener una muestra de sangre de un sujeto. El experto en la técnica también estará familiarizado con las técnicas de rutina para obtener plasma y/o suero a partir de una muestra de sangre completa, p.ej., usando centrifugación.

55 En una realización preferente de cada uno de los aspectos primero y segundo de la invención, los métodos se llevan a cabo utilizando muestras biológicas obtenidas entre las 12 y las 24 semanas de gestación, preferentemente entre las 12 y las 16 semanas de gestación (también denominado en la presente memoria descriptiva como "punto temporal A"), y/o entre las 16 y 18 semanas de gestación (también denominado en la presente memoria descriptiva "punto temporal B"), y/o entre las 18 y 24 semanas de gestación (también denominado en la presente memoria descriptiva como "punto temporal C").

60 Como comprenderá fácilmente el especialista en la materia, las referencias a los períodos gestacionales aquí utilizados emplean la notación estándar de "número de semanas +6", para indicar un número de semanas de gestación más hasta 6 días.

65 En una realización preferente de cada uno de los aspectos primero y segundo de la invención, se determina el

nivel de expresión de los nueve miARNs de la Tabla 1. En tales realizaciones, se compara el nivel de expresión combinado de las moléculas de miARN con el valor de control.

5 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva en relación con el primer y segundo aspectos de la invención, el término "valor de control" se refiere a un nivel de expresión de línea base de la(s) molécula(s) de miARN correspondientes en una muestra de control correspondiente. La muestra de control correspondiente puede obtenerse de una cohorte de sujetos femeninos embarazados que alcanzaron el término completo (>37 semanas de gestación) sin acortamiento del cuello uterino.

10 Si se determina el nivel de expresión de dos o más moléculas de miARN en los métodos de la invención, el valor de control correspondiente es el nivel de expresión inicial combinado de los miARNs correspondientes en una muestra de control.

15 Preferentemente, para cada uno de los métodos de la invención, el valor de corte para determinar si el nivel de expresión de una molécula de miARN dada es "diferente" (elevado o reducido) en comparación con un valor de control, es de 2 veces el nivel de expresión inicial para el miARN. Por lo tanto, si se determina el nivel de expresión de un miARN dado (p.ej., Hsa-let-7a-5p) y se encuentra que el valor de expresión es al menos 2 veces mayor que el nivel de expresión de línea base para hsa-let-7a-5p en una muestra de control, entonces se puede concluir que la expresión de hsa-let-7a-5p es elevada en la muestra del sujeto y se puede hacer una predicción del riesgo, de acuerdo con los métodos de la invención.

20 El término "nivel de expresión" se usa de forma amplia para incluir un perfil de expresión genómico, p.ej., un perfil de expresión de miARN. El nivel de expresión de una o más moléculas de miARN en la muestra de la paciente y/o en la muestra de control se puede determinar usando cualquier medio conveniente para determinar un nivel de una secuencia de ácido nucleico, p.ej., hibridación cuantitativa de ácido nucleico de miARN, miARN marcado y/o técnicas de amplificación de ácido nucleico que se usan de forma rutinaria en la técnica y con las que el especialista en la materia estará familiarizado.

25 Las técnicas preferidas para determinar el nivel de expresión de miARN incluyen:

- 30
- PCR en tiempo real (RT-PCR): esta técnica es adecuada para análisis a gran escala o múltiples y, por lo tanto, es útil para el cribado de grandes poblaciones;
 - Micromatriz: matriz 2D en un sustrato sólido;
 - Plataformas de secuenciación de próxima generación (p.ej., RNAseq): las ventajas de la secuenciación de próxima generación son que tiene un alto rendimiento, es rápida y tiene un bajo costo por base; e
 - Hibridación in situ.
- 35

40 Los inventores de la presente han identificado los miARNs enumerados en la Tabla 1 y la Tabla 2 como útiles en el contexto de la presente invención. En realizaciones preferentes de la invención, el uno o más miARNs se seleccionan del grupo de miARNs presentados en la Tabla 1. En realizaciones particularmente preferidas, se determina el nivel de expresión de los nueve miARNs de la Tabla 1.

Tabla 1

miARN	Secuencia de nucleótidos	N.º de acceso	Dirección de la diferencia en la expresión en comparación con el control
hsa-let-7a-5p	ugagguaguagguuguauaguu (SEQ ID NO. 1)	MIMAT0000062	Aumenta
hsa-miR-374a-5p	uuauaaucacaccugauagug (SEQ ID NO. 2)	MIMAT0000727	Aumenta
hsa-miR-15b-5p	uagcagcacaucaugguuuaca (SEQ ID NO. 3)	MIMAT0000417	Aumenta
hsa-miR-19b-3p	ugugcaaaucgaugcaaaacuga (SEQ ID NO. 4)	MIMAT0000074	Aumenta
hsa-miR-23a-3p	aucacauugccagggauuucc (SEQ ID NO. 5)	MIMAT0000078	Aumenta

hsa-miR-93-5p	caaagugcuguuuccgucagguag (SEQ ID NO. 6)	MIMAT0000093	Aumenta
hsa-miR-150-5p	ucucccaacccuuguaccagug (SEQ ID NO. 7)	MIMAT0000451	Aumenta
hsa-miR-185-5p	uggagagaaaggcaguuccuga (SEQ ID NO. 8)	MIMAT0000455	Aumenta
hsa-miR-191-5p	caacggaaucccaaaagcagcug (SEQ ID NO. 9)	MIMAT0000440	Aumenta

Tabla 2

miARN	Secuencia de nucleótidos	N.º de acceso	Dirección de la diferencia en la expresión en comparación con el control
hsa-miR-106b-5p	uaaagugcugacagugcagau (SEQ ID NO. 10)	MIMAT0000680	Aumenta
hsa-miR-22-3p	aagcugccaguugaagaacugu (SEQ ID NO. 11)	MIMAT0000077	Aumenta
hsa-miR-26b-5p	uucaaguaauucaggauaggu (SEQ ID NO. 12)	MIMAT0000083	Aumenta
hsa-let-7i-5p	ugagguaguaguuuugucguuu (SEQ ID NO. 13)	MIMAT0000415	Aumenta
hsa-miR-4454	ggauccgagucacggcacca (SEQ ID NO. 14)	MIMAT0018976	Aumenta
hsa-miR-144-3p	uacaguauagaugauguacu (SEQ ID NO. 15)	MIMAT0000436	Aumenta
hsa-miR-223-3p	ugucaguuuugucaaaauaccca (SEQ ID NO. 16)	MIMAT0000280	Aumenta
hsa-miR-92a-3p	uaaugcacuugucccgccugu (SEQ ID NO. 17)	MIMAT0000092	Aumenta
hsa-let-7b-5p	ugagguaguagguuugugguuu (SEQ ID NO. 18)	MIMAT0000063	Aumenta
hsa-miR-188-5p	caucccuugcaugguggaggg (SEQ ID NO. 19)	MIMAT0000457	Disminuye
hsa-miR-16-5p	uagcagcacguaaauuuggcg (SEQ ID NO. 20)	MIMAT0000069	Aumenta
hsa-let-7g-5p	ugagguaguaguuuuguacaguu (SEQ ID NO. 21)	MIMAT0000414	Aumenta
hsa-miR-148b-3p	ucagugcaucacagaacuuugu (SEQ ID NO. 22)	MIMAT0000759	Aumenta

hsa-miR-122-5p	uggagugugacaaugguguuug (SEQ ID NO. 23)	MIMAT0000421	Aumenta
----------------	---	--------------	---------

La Tabla 3 es un subconjunto de los miARNs enumerados en la Tabla 2. En una realización de la invención, el uno o más miARNs pueden seleccionarse del grupo de miARNs presentado en la Tabla 3.

5

Tabla 3

miARN	Secuencia de nucleótidos	N.º de acceso	Dirección de la diferencia en la expresión en comparación con el control
hsa-miR-106b-5p	uaaagugcugacagucagau (SEQ ID NO. 10)	MIMAT0000680	Aumenta
hsa-miR-22-3p	aagcugccaguugaagaacugu (SEQ ID NO. 11)	MIMAT0000077	Aumenta
hsa-miR-26b-5p	uucaaguaauucaggauaggu (SEQ ID NO. 12)	MIMAT0000083	Aumenta
hsa-let-7i-5p	ugagguaguuguugucuguu (SEQ ID NO. 13)	MIMAT0000415	Aumenta
hsa-miR-4454	ggauccgagucacggcacca (SEQ ID NO. 14)	MIMAT0018976	Aumenta
hsa-miR-144-3p	uacaguauagaugauguacu (SEQ ID NO. 15)	MIMAT0000436	Aumenta
hsa-miR-223-3p	ugucaguuuuguaaaacccca (SEQ ID NO. 16)	MIMAT0000280	Aumenta
hsa-let-7b-5p	ugagguaguagguugugugguu (SEQ ID NO. 18)	MIMAT0000063	Aumenta
hsa-miR-188-5p	caucccuugcaugguggaggg (SEQ ID NO. 19)	MIMAT0000457	Disminuye
hsa-miR-16-5p	uagcagcacguaaauauuggcg (SEQ ID NO. 20)	MIMAT0000069	Aumenta
hsa-miR-148b-3p	ucagugcaucacagaacuuugu (SEQ ID NO. 22)	MIMAT0000759	Aumenta
hsa-miR-122-5p	uggagugugacaaugguguuug (SEQ ID NO. 23)	MIMAT0000421	Aumenta

Para evitar dudas, "hsa-" se refiere a homo sapiens y es una abreviatura estándar para diferenciar los miARNs de los de otras especies. Los sufijos "3p" y "5p" denotan 3 primos o 5 primos, respectivamente. Estos sufijos se utilizan para distinguir dos miARNs que se originan en brazos opuestos del mismo pre-miARN. "let-7" se refiere al gen letal-7, que es un precursor de miARN.

10

Todos los miARNs se identifican aquí usando nomenclatura estándar. La información de la secuencia para cada uno de los miARNs enumerados en las Tablas 1 y 2 se puede encontrar en la base de datos de miRBase mantenida por la Universidad de Manchester (<http://mirbase.org/search.shtml>).

15

Los datos mostrados en las Figuras 1-9 demuestran la capacidad de cada uno de los nueve miARNs individuales enumerados en la Tabla 1 para predecir el acortamiento del cuello uterino. Los datos mostrados en las Figuras 10-

19 demuestran la utilidad de los mismos nueve miARNs enumerados en la Tabla 1 para predecir el nacimiento prematuro.

Estos datos están respaldados por un estudio adicional realizado por los inventores, en el que se determinó el nivel de expresión de los nueve miARN específicos de la Tabla 1 en plasma de una segunda población de mujeres embarazadas a las 12-14⁺⁶ semanas de gestación (n=87). Los datos generados en este estudio de seguimiento, que se muestran a continuación en la Tabla 4, y en las Figuras 19-21, replican los hallazgos iniciales de expresión aumentada de miARN específico libre de células en el plasma de mujeres que exhibieron un acortamiento del cuello uterino posterior. La Tabla 4 muestra la expresión de miARNs plasmáticos específicos a las 12-14⁺⁶ semanas de gestación en mujeres que pasaron a tener acortamiento del cuello uterino (n=18) en comparación con mujeres sin acortamiento del cuello uterino (n=69). Se observa una expresión significativamente mayor de los nueve microARNs en el plasma de mujeres que pasaron a tener acortamiento del cuello uterino (longitud cervical <25 mm) en comparación con mujeres con una longitud cervical normal.

Tabla 4

MicroARN	Tasa de cambio media en la expresión	Rango intercuartil	Valor P	Área bajo la curva característica del operador del receptor*
hsa-miR-93-5p	3,1	0,8-3,9	0,0001	0,76
hsa-miR-191-5p	3,7	1,6-4,7	0,0001	0,79
hsa-let-7a-5p	2,2	0,9-2,4	0,0054	0,72
hsa-miR-374a-5p	4,2	1,5-5,1	<0,0001	0,82
hsa-miR-150-5p	5,8	2,7-7,6	<0,0001	0,86
hsa-miR-15b-5p	3,7	1,3-3,9	<0,0001	0,79
hsa-miR-185-5p	3,6	1,1-4,2	<0,0001	0,80
hsa-miR-19b-3p	3,1	0,8-3,9	<0,0001	0,82
hsa-miR-23a-3p	5,1	1,5-6,7	<0,0001	0,66

* Las curvas características del operador del receptor se calcularon utilizando datos de la población de descubrimiento original combinados con la segunda cohorte de validación (n=119).

La replicación de los hallazgos anteriores en una población independiente de mujeres apoya la hipótesis de los inventores de que miARN específicos pueden actuar como biomarcadores disponibles periféricamente de un futuro acortamiento del cuello uterino y del consiguiente parto prematuro. Los inventores encontraron que la combinación de datos de los nueve microARNs dio como resultado el poder predictivo de mayor potencia (véase la Figura 21).

Dado que los marcadores de miARN enumerados en la Tabla 1 y la Tabla 2 son útiles para predecir el acortamiento del cuello uterino, también pueden usarse para predecir el momento del inicio del parto a término, que se asocia con el acortamiento del cuello uterino. Por lo tanto, los marcadores de miARN enumerados en la Tabla 1 y la Tabla 2 tienen utilidad para las mujeres que han llegado a término, así como en las etapas prematuras del embarazo.

Por lo tanto, también se describe en la presente memoria descriptiva un método para predecir el momento del inicio del parto en un sujeto embarazado que está a término (>37 semanas de gestación), que comprende determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN identificadas en la Tabla 1 o la Tabla 2 extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y compararlo con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica el momento del inicio del parto.

Si la molécula de miARN que se detecta mediante este método es una molécula cuya sobreexpresión está asociada con el acortamiento del cuello interino, entonces un nivel de expresión de dicho miARN en la muestra de la paciente que sea mayor que el valor de control es indicativo del inicio del parto en dicha paciente.

En un caso preferente, se determina el nivel de expresión de una combinación de dos o más de las moléculas de miARN identificadas en la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 3, y preferentemente una combinación de tres o cuatro de las moléculas de miARN identificadas en la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 3. El nivel de expresión combinado de las dos, tres o cuatro o más moléculas de miARN se puede comparar con el valor de control.

Se puede determinar el nivel de expresión de una combinación de los nueve miARNs identificados en la Tabla 1.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "valor de control" se refiere al nivel de expresión de la(s) respectiva(s) molécula(s) de miARN en una muestra de control correspondiente obtenida de una cohorte de sujetos femeninos embarazados que no logran ponerse de parto espontáneamente a las 42 semanas de

gestación.

Si se determina el nivel de expresión de dos o más moléculas de miARN en el método de la invención, el valor de control correspondiente es el nivel de expresión inicial combinado de los miARNs correspondientes en una muestra de control.

Preferentemente, tal como se ha descrito anteriormente, el valor de corte para determinar si el nivel de expresión de una molécula de miARN dada es "diferente" (se eleva o se reduce) en comparación con un valor de control es 3 veces el nivel de expresión de línea base correspondiente al miARN.

En otros aspectos de la invención, las moléculas de miARN identificadas en las Tablas 1 y/o 2 y/o 3 pueden usarse para determinar la respuesta probable de una paciente a los agentes usados para la inducción del parto a cualquier edad gestacional. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, prostaglandinas y oxitocina.

Además, las moléculas de miARN identificadas en las Tablas 1 y/o 2 y/o 3 también pueden usarse para determinar el riesgo de cesárea asociado a la inducción del parto, en una paciente de cualquier edad gestacional.

Los presentes inventores han identificado que las diferencias en los niveles de expresión de miARN en comparación con un valor de control, que puede predecir el acortamiento del cuello uterino prematuro, también son predictivas de una fácil inducción del parto a término. Las mujeres que van a retrasarse (es decir, dar a luz a >40 semanas de gestación) tendrán un cuello uterino más largo (y los niveles asociados de marcadores de miARN descritos en la presente memoria descriptiva) y es probable que tengan un mayor riesgo de fallar en la inducción y un mayor riesgo de necesidad de sección de cesárea.

El tercer aspecto de la invención proporciona el uso de un sustrato sólido, tal como un biochip, que comprende una sonda específica para la molécula de miARN de SEQ ID NO: 2, y que opcionalmente comprende además una o más sondas adicionales específicas para una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas de las SEQ ID NOs. 1 y 3-23, en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las sondas están inmovilizadas sobre la superficie del sustrato; y preferentemente, en el que el sustrato sólido comprende sondas específicas para todas las SEQ ID NOs. 1-9.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido capaz de unirse a un ácido nucleico diana (es decir, una molécula de miARN) de secuencia complementaria. Las sondas pueden unirse a dianas que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo del rigor de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse directamente o indirectamente, tal como con biotina a la que se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina.

Las sondas pueden ser capaces de hibridarse con una secuencia de miARN diana en condiciones rigurosas de hibridación. Las sondas se pueden unir en ubicaciones definidas espacialmente en el sustrato. El sustrato sólido puede ser un material que puede modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de las sondas y ser susceptible para al menos un método de detección. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos, polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice, carbono y metales. El sustrato puede permitir la detección óptica sin fluorescencia apreciable.

El sustrato puede ser plano, aunque también se pueden usar otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, las sondas se pueden colocar en la superficie interior de un tubo.

El material de soporte y la sonda se pueden derivatizar con un grupo funcional químico, de tal modo que la sonda se puede unir usando el grupo funcional directa o indirectamente mediante un ligando. Alternativamente, la sonda puede unirse al soporte sólido de forma no covalente, por ejemplo, usando oligonucleótidos biotinilados. Alternativamente, la sonda se puede sintetizar en la superficie del soporte sólido usando técnicas tales como la fotopolimerización y la fotolitografía.

Preferentemente, el material de soporte comprende secuencias de oligonucleótidos específicas para cada una de las una o más moléculas de miARN. El material de soporte se puede utilizar en un método de acuerdo con la invención.

La invención será descrita adicionalmente con referencia al siguiente ejemplo no limitativo.

Ejemplo

Materiales y métodos

Recolección de muestras y diseño del estudio:

Tras la aprobación ética, se recolectaron muestras de sangre completa de mujeres embarazadas que asistían a las clínicas dedicadas a la vigilancia de la prematuridad en los hospitales St. Mary's y Queen Charlotte's y Chelsea de Londres. Se extrajo sangre en tres momentos diferentes durante el embarazo; 12+0 - 14+6 (punto temporal A), 15+0 - 17+6 (punto temporal B) y 19+0 - 21+6 (punto temporal C), y se almacenaron. Se obtuvieron aproximadamente 3 ml de sangre completa. Las muestras se colocaron en hielo inmediatamente y se centrifugaron a 1300 g durante 10 minutos a 4°C dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección. El plasma aislado se almacenó en alícuotas de 1000 µl en microtubos libres de ARNasa natural a -80°C. Se descartaron las muestras que demostraban hemólisis macroscópica. Después del parto, las muestras se asignaron a cohortes fenotípicas dependiendo de si las mujeres presentaron acortamiento del cuello uterino y parto prematuro (n=25), acortamiento del cuello uterino y parto a término (n=31), o no acortamiento del cuello uterino y parto a término (n=48). (El parto prematuro no precedido por un acortamiento del cuello uterino es muy raro en esta población).

Extracción de ARN

Las alícuotas de plasma se descongelaron en hielo. Para minimizar la contaminación celular y plaquetaria, las muestras se centrifugaron adicionalmente a 800 g durante 10 min a 4°C. Los 750 µl superiores se retiraron para su procesamiento posterior y se descartó el plasma restante. El ARN se extrajo usando el "Mini kit de purificación de ARN exosómico y circulante de plasma/suero (formato de suspensión)" (Norgen Biotek, Ontario, Canadá) según las instrucciones del fabricante. Además, se añadió al plasma 5000 attomoles de cel-254 sintética (secuencia UGCAAUCUUUCGCGACUGUAGG (SEQ ID NO. 24), Integrated DNA Technologies BVBA, Lovaina, Bélgica) después de la adición de tampones de lisis y desnaturalizantes para permitir la normalización posterior de cualquier variación técnica en el proceso de extracción. El ARN eluido se purificó y se concentró adicionalmente usando columnas Amicon Ultra YM-3 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

Clasificación con nCounter™

El ARN se envió externamente para la elaboración su clasificación en perfiles utilizando la casete de miARN de plasma nCounter™ (Nanostring, Seattle, EE.UU.). Esta técnica permite evaluar directamente los niveles de expresión del miARN diana, sin reacciones enzimáticas, a través de dos sondas específicas de secuencia¹¹. El ARNm individual se captura con una sonda de captura específica de la secuencia diana de miARN que luego se usa en un procedimiento de purificación por afinidad posterior a la hibridación. La segunda secuencia específica de miARN diana y la sonda codificada marcada con fluorescencia se usa luego en la detección con el complejo de 3 componentes separado en una superficie mediante un campo eléctrico aplicado, seguido de formación de imágenes microscópicas.

Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El ARN se transcribió de forma inversa a ADNc después de la adición de 0,625 µl de miARN sintético UniSp6 (10⁸ copias/µl) (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) para permitir la normalización posterior de cualquier variación técnica de la reacción. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizó utilizando paneles personalizados de "selección y mezcla" que contenían cebadores LNA™, según las instrucciones del fabricante (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca).

Análisis de los datos

nCounter™

La señal de fondo se definió como dos desviaciones estándar por encima de la media de las sondas de control negativo y se sustrajo de los recuentos de moléculas de miARN en bruto. Los recuentos de expresión se normalizaron a la expresión media de los 100 miARNs expresados superiores. Las sondas de miARN sin expresión por encima del fondo en más de la mitad de las muestras de cualquier grupo clínico se eliminaron del análisis adicional. Las muestras con una expresión muy alta de miARNs derivados de plaquetas hsa-miR-16 y hsa-miR-25 y hsa-miR-93 se eliminaron del análisis (n=2). Se comparó la expresión entre grupos clínicos utilizando el software nSolver v2.0 (Nanostring, Seattle, EE.UU.) y se consideró que los miARNs que se expresaban diferencialmente con una tasa de descubrimiento falso <0,05 eran discriminatorios.

RT-PCR

Los valores de umbral de ciclo (Ct) para cada miARN se calcularon utilizando el software stepone v2.3 (Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido). La mediana de los valores de Ct se normalizó en primer lugar a un calibrador interplaca y luego a los controles enriquecidos con extracción y transcripción inversa. Se evaluó la normalidad de las distribuciones utilizando el test ómnibus de D'Agostino y Pearson y los grupos clínicos se compararon utilizando el test de t de Student para datos no apareados o el test de Mann-Whitney según fuera apropiado; se consideró significativo un valor p <0,05. La tasa de cambio se calculó usando 2^{-DG} donde DG = Ct medio del grupo experimental - Ct medio del grupo normal.

Referencias

5 1. Wood, N.S., Marlow, N., Costeloe, K., Gibson, A.T. y Wilkinson, A.R. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *The New England journal of medicine* 343, 378-384 (2000).

2. Holst, R.M., et al. Prediction of spontaneous preterm delivery in women with preterm labor: analysis of multiple proteins in amniotic and cervical fluids. *Obstetrics and gynecology* 114, 268-277 (2009).

10 3. Mitchell, P.S., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10513-10518 (2008).

4. Harper, K.A. y Tyson-Capper, A.J. Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochemical Society transactions* 36, 543-545 (2008).

15 5. Luense, L.J., Carletti, M.Z. y Christenson, L.K. Role of Dicer in female fertility. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20, 265-272 (2009).

6. Morita, S., et al. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89, 687-696 (2007).

20 7. Mouillet, J.F., et al. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta* 31, 781-784 (2010).

8. Renthal, N.E., et al. miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20828-20833 (2010).

25 9. Williams, K.C., Renthal, N.E., Condon, J.C., Gerard, R.D. y Mendelson, C.R. MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 7529-7534 (2012).

30 10. Hassan, S.S., et al. MicroRNA expression profiling of the human uterine cervix after term labor and delivery. *American journal of obstetrics and gynecology* 202, 80 e81-88 (2010).

35 11. Geiss, G.K., et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature biotechnology* 26, 317-325 (2008).

40 12. Campbell, S. Universal cervical-length screening and vaginal progesterone prevents early preterm births, reduces neonatal morbidity and is cost saving: doing nothing is no longer an option. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 38, 1-9 (2011).

45 13. Romero, R., et al. A blueprint for the prevention of preterm birth: vaginal progesterone in women with a short cervix. *Journal of perinatal medicine* 41, 27-44 (2013).

14. Montenegro, D., et al. Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes. *Am. J Obstet Gynecol.* 2007 Sep; 197(3): 289.e1-289.e6.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el riesgo de acortamiento del cuello uterino o de parto prematuro (PTL) en un sujeto femenino embarazado, que comprende determinar el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y comparar con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto tiene un riesgo alto o bajo de acortamiento del cuello uterino o de PTL, y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión se determina y se compara incluye hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).
2. Un método para caracterizar un sujeto femenino embarazado que tiene antecedentes de PTL, pérdida en el segundo trimestre o biopsia de cono cervical previos, como que necesita una exploración cervical por ultrasonidos, una intervención terapéutica o quirúrgica, que comprende determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN extraídas de una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y comparar con un valor de control, en el que una diferencia en el nivel de expresión de la una o más de las moléculas de miARN en comparación con el valor de control indica que el sujeto necesita una exploración cervical por ultrasonidos y/o una intervención terapéutica y/o una intervención quirúrgica y en el que la una o más moléculas de miARN cuyo nivel de expresión se determina y se compara incluye hsa-miR-374a-5p (SEQ ID NO. 2).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además determinar el nivel de expresión de una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas del grupo que comprende: hsa-let-7a-5p (SEQ ID NO. 1); hsa-miR-15b-5p (SEQ ID NO. 3); hsa-miR-19b-3b (SEQ ID NO. 4); hsa-miR-23a-3p (SEQ ID NO. 5); hsa-miR-93-5p (SEQ ID NO. 6); hsa-miR-150-5p (SEQ ID NO. 7); hsa-miR-185-5p (SEQ ID NO. 8); hsa-miR-191-5p (SEQ ID NO. 9); hsa-miR-106b-5p (SEQ ID NO. 10); hsa-miR-22-3p (SEQ ID NO. 11); hsa-miR-26b-5p (SEQ ID NO. 12); hsa-let-7i-5p (SEQ ID NO. 13); hsa-miR-4454 (SEQ ID NO. 14); hsa-miR-144-ep (SEQ ID NO. 15); hsa-miR-223-3p (SEQ ID NO. 16); hsa-miR-92a-3p (SEQ ID NO. 17); hsa-let-7b-5p (SEQ ID NO. 18); hsa-miR-188-5p (SEQ ID NO. 19); hsa-miR-16-5p (SEQ ID NO. 20); hsa-let-7g-5p (SEQ ID NO. 21); hsa-miR-148b-3p (SEQ ID NO. 22); y hsa-miR-122-5p (SEQ ID NO. 23).
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, o la reivindicación 3 cuando depende de la reivindicación 2, en el que la intervención terapéutica se selecciona de uno o más de antagonistas del receptor de oxitocina, antagonistas del receptor de prostaglandina, agonistas del receptor beta-adrenérgico, donadores de óxido de nitrógeno, sulfato de magnesio, inhibidores de la prostaglandina sintasa, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), fármacos antiinflamatorios de molécula pequeña y otros, bloqueadores del canal de calcio, progesterona, caproato de 17-a-hidroxiprogesterona, y análogos de progesterona.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre completa, preferentemente en el que se extraen una o más moléculas de miARN del componente plasmático de la muestra de sangre completa o del componente sérico de la muestra de sangre completa.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina el nivel de expresión de una combinación de dos o más de las moléculas de miARN que comprenden las SEQ ID NOs. 1-23, y en el que el nivel de expresión combinado de las dos o más moléculas de miARN se compara con el valor de control.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se determina el nivel de expresión de una combinación de dos, tres o cuatro de las moléculas de miARN que comprenden las SEQ ID NOs. 1-23, y en el que el nivel de expresión combinado de las dos, tres o cuatro moléculas de miARN se compara con el valor de control.
8. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que se determina el nivel de expresión de las nueve moléculas de miARN que comprenden las SEQ ID NOs. 1-9, preferentemente, en el que el nivel de expresión combinado de las nueve moléculas de miARN se compara con el valor de control.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el valor de control es el nivel de expresión de la(s) correspondiente(s) molécula(s) de miARN en una muestra correspondiente de sujetos femeninos embarazados que alcanzaron el término completo sin acortamiento del cuello uterino.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método se lleva a cabo entre las 12 y las 24 semanas de gestación; preferentemente en el que el método se lleva a cabo entre las 12 y las 16 semanas de gestación, y/o entre las 16 y las 18 semanas de gestación, y/o entre las 18 y 24 semanas de gestación.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de expresión

de la una o más moléculas de miARN se determina usando hibridación de ácidos nucleicos y/o amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente el nivel de expresión de la una o más moléculas de miRNA se determina usando PCR en tiempo real, micromatriz, plataformas de secuenciación de próxima generación o hibridación in situ.

5

- 12.** Uso de un sustrato sólido que comprende una sonda específica para la molécula de miARN de SEQ ID NO: 7, y que opcionalmente comprende una o más sondas adicionales específicas para una o más moléculas de miARN adicionales seleccionadas de las SEQ ID NOs. 1 y 3-23, en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las sondas están inmovilizadas sobre la superficie del sustrato; y
- 10
preferentemente, en el que el sustrato sólido comprende sondas específicas para todas las SEQ ID NOs. 1-9.

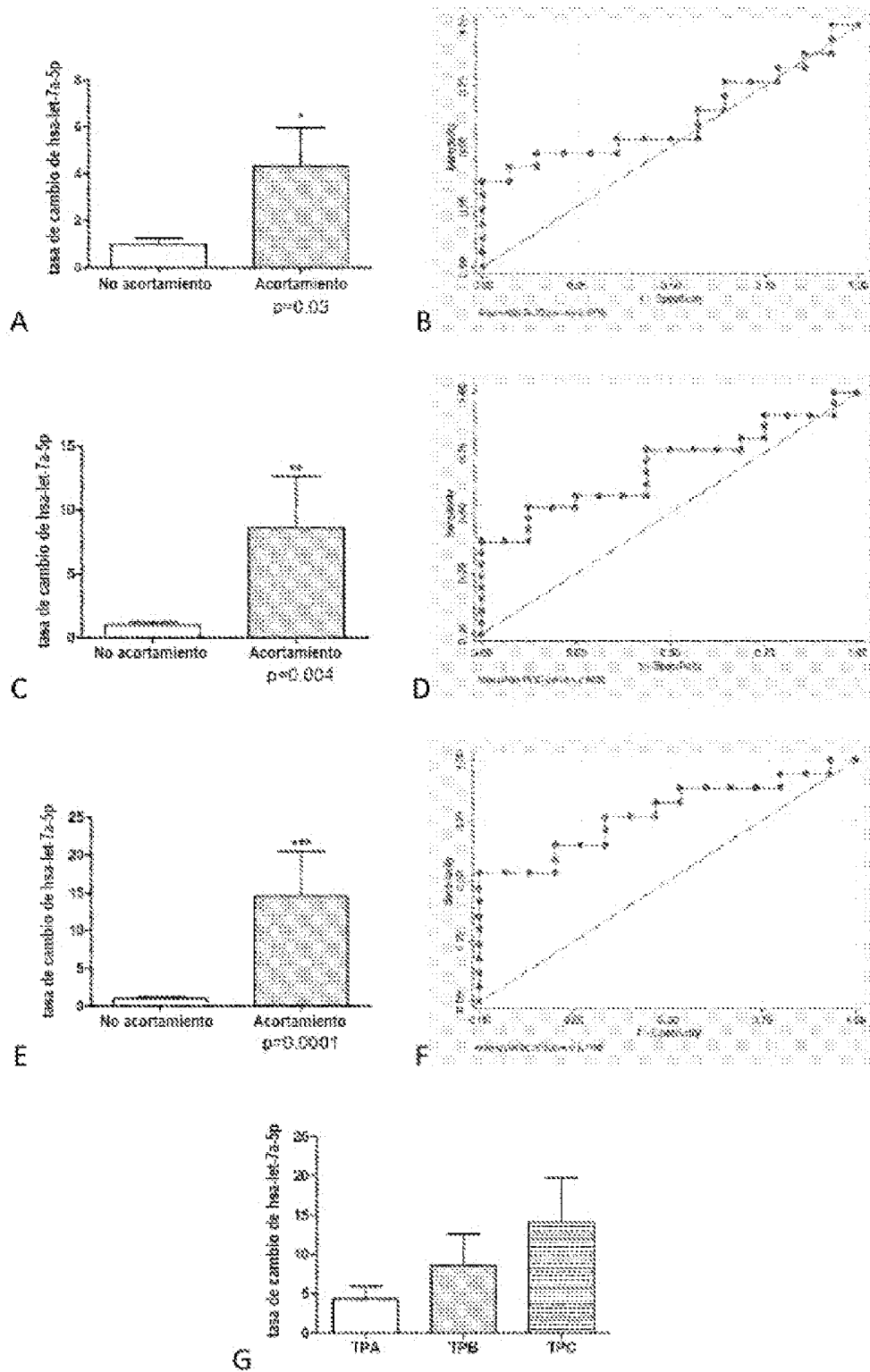


Figura 1

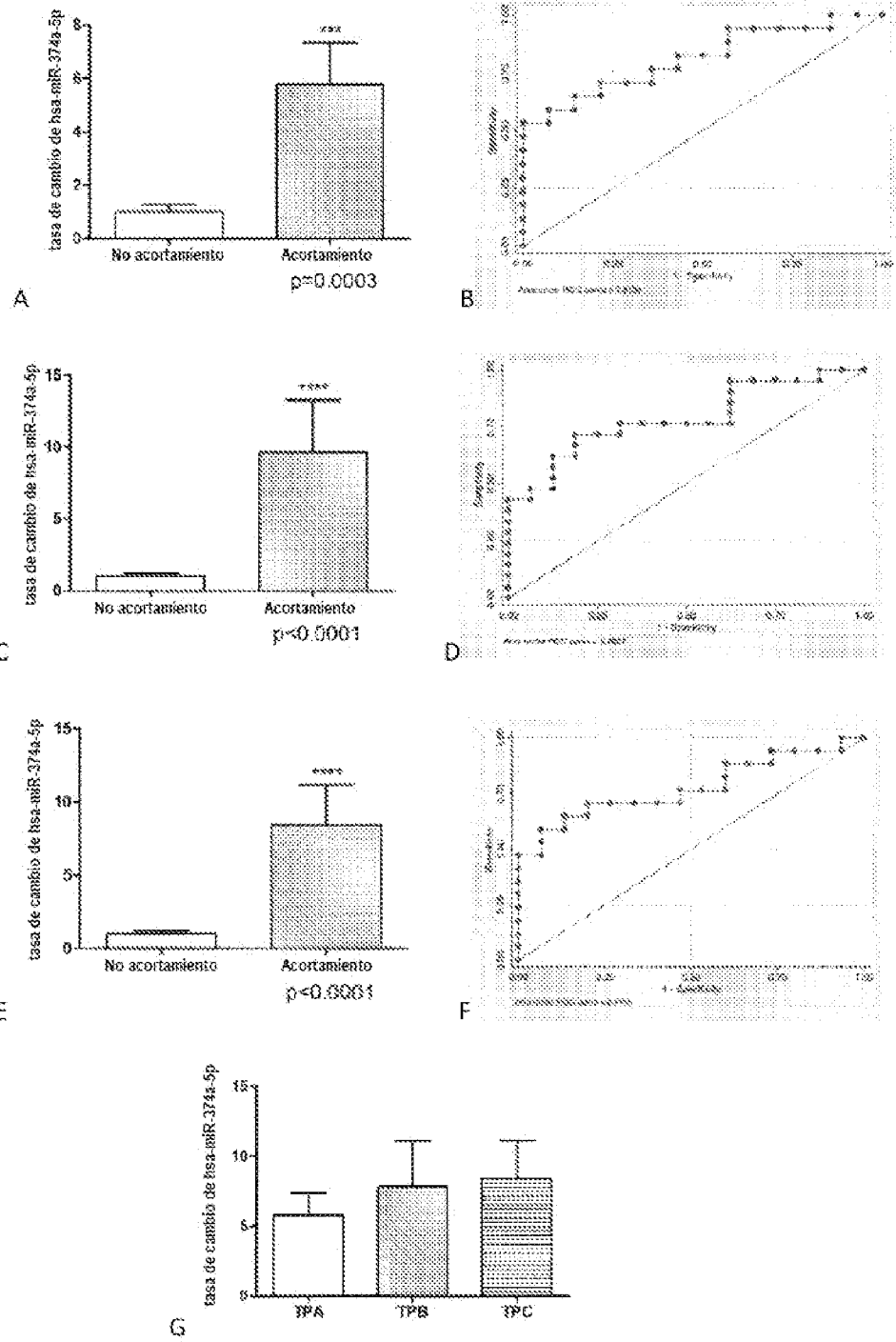


Figura 2

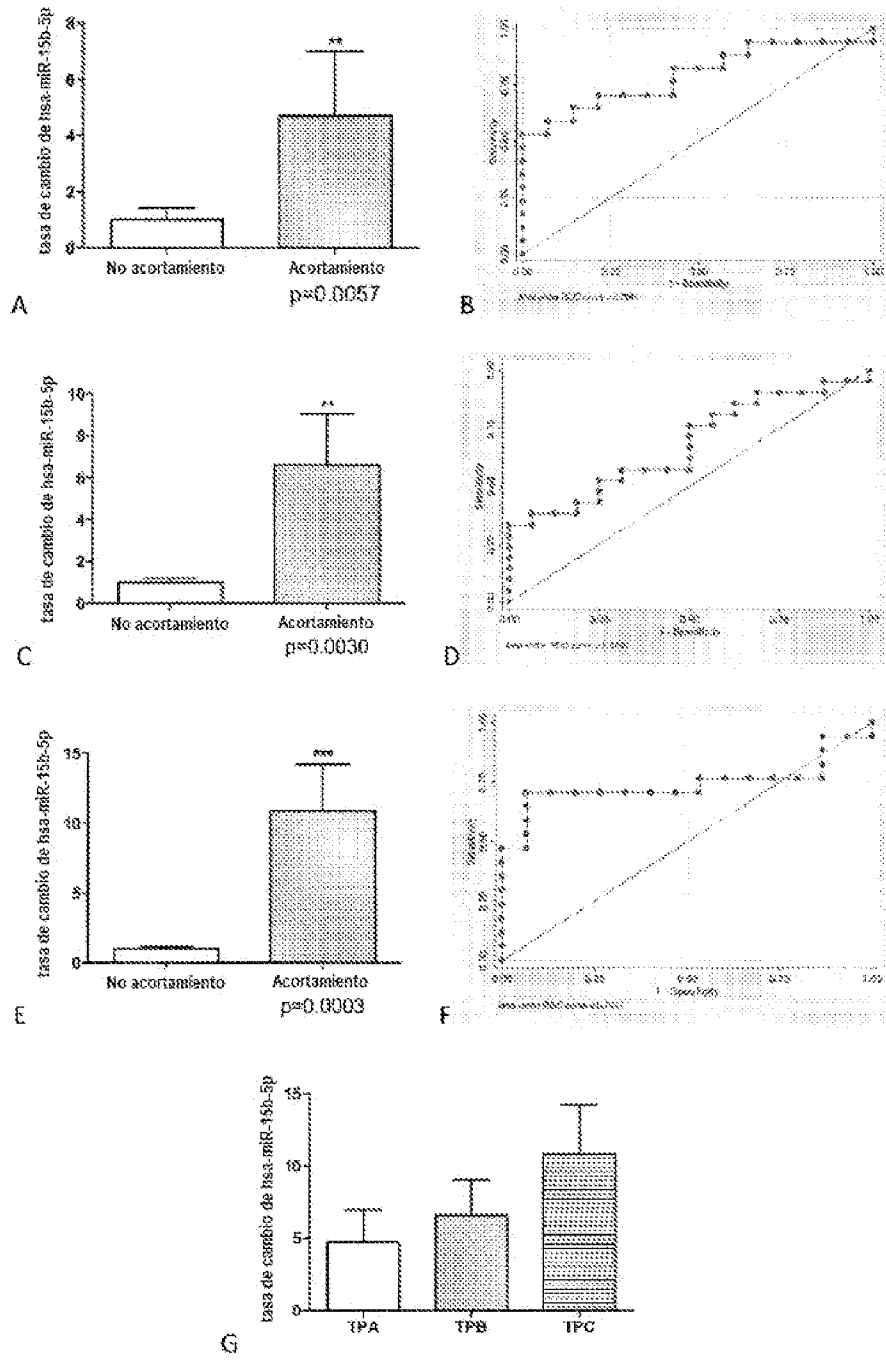


Figura 3

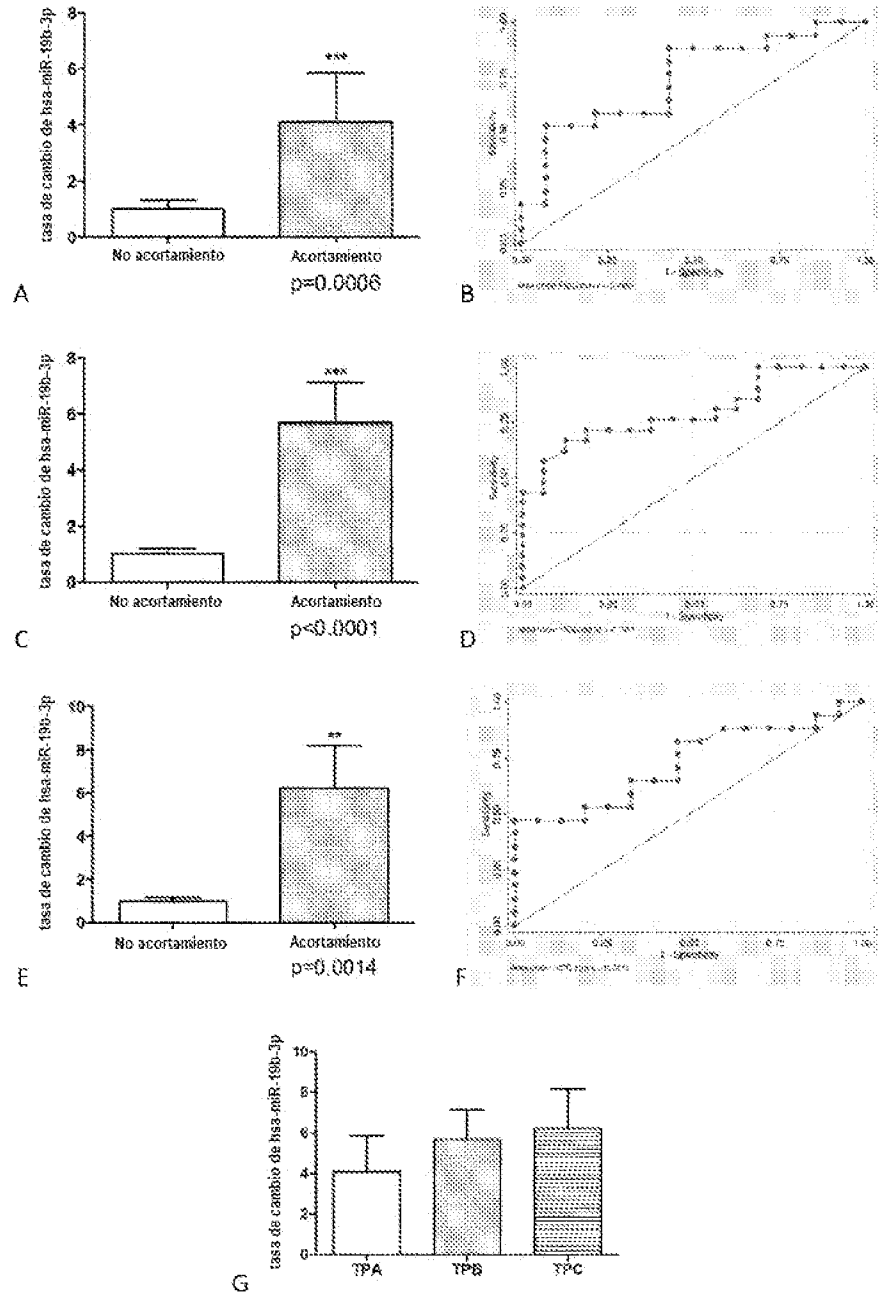


Figura 4

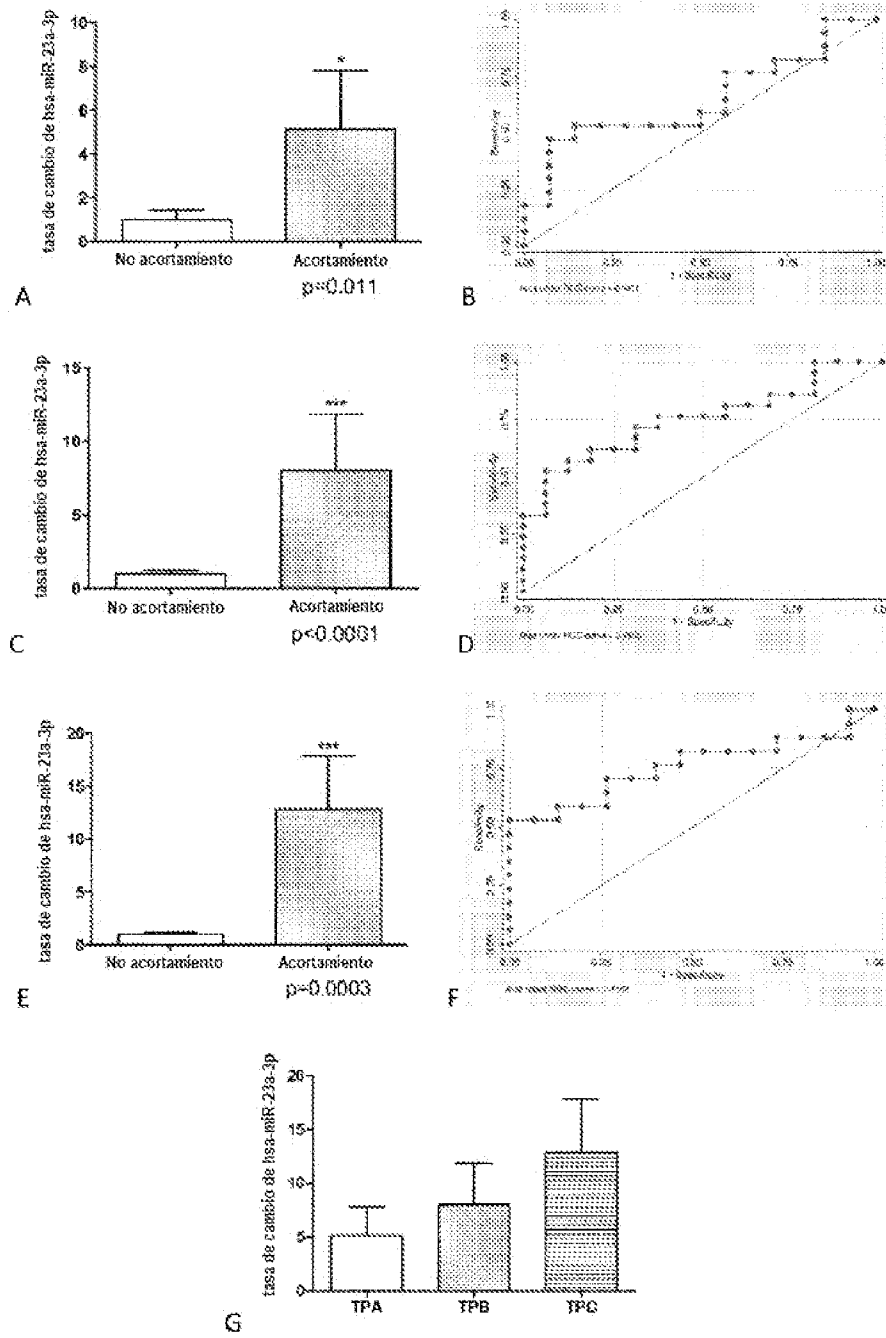


Figura 5

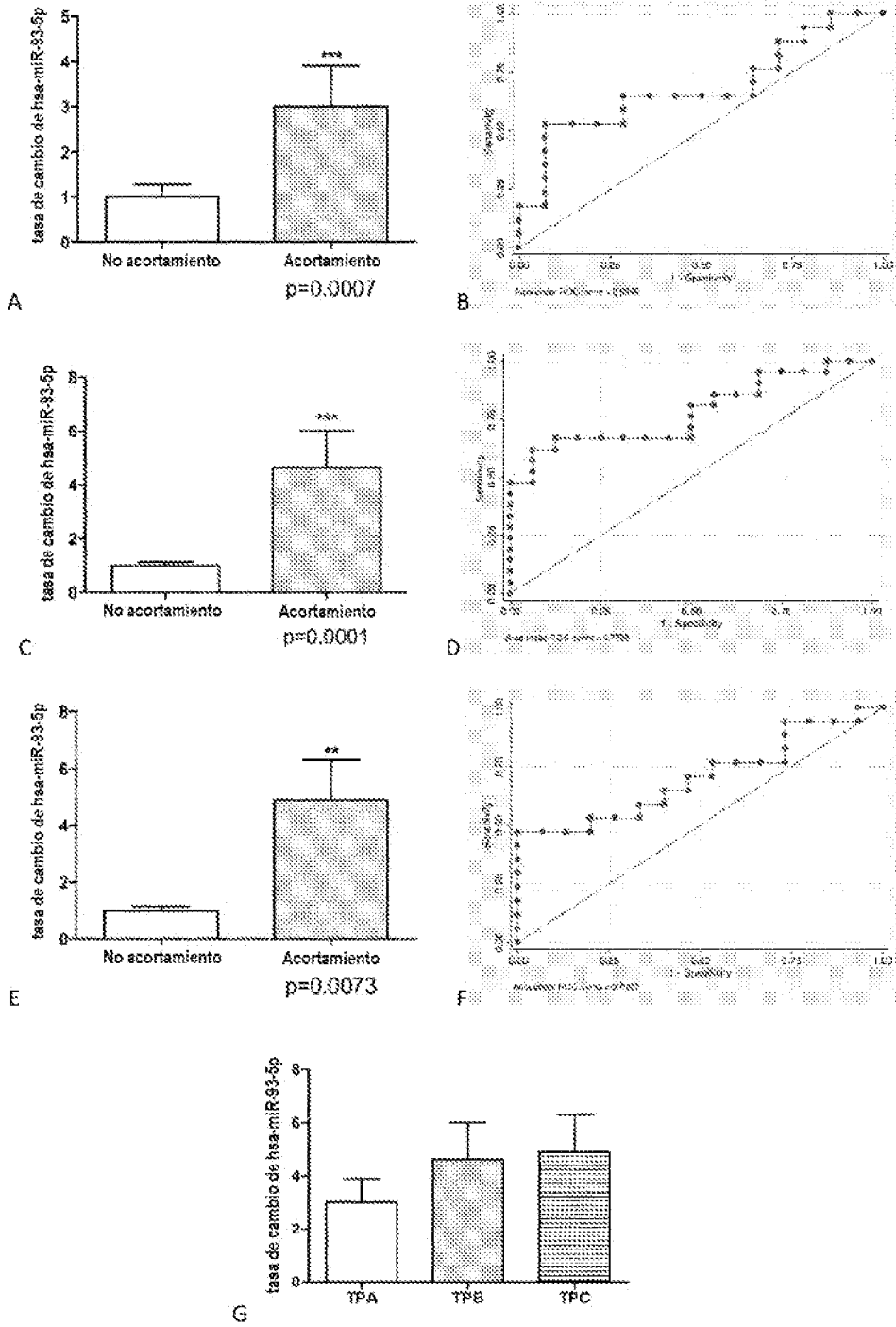


Figura 6

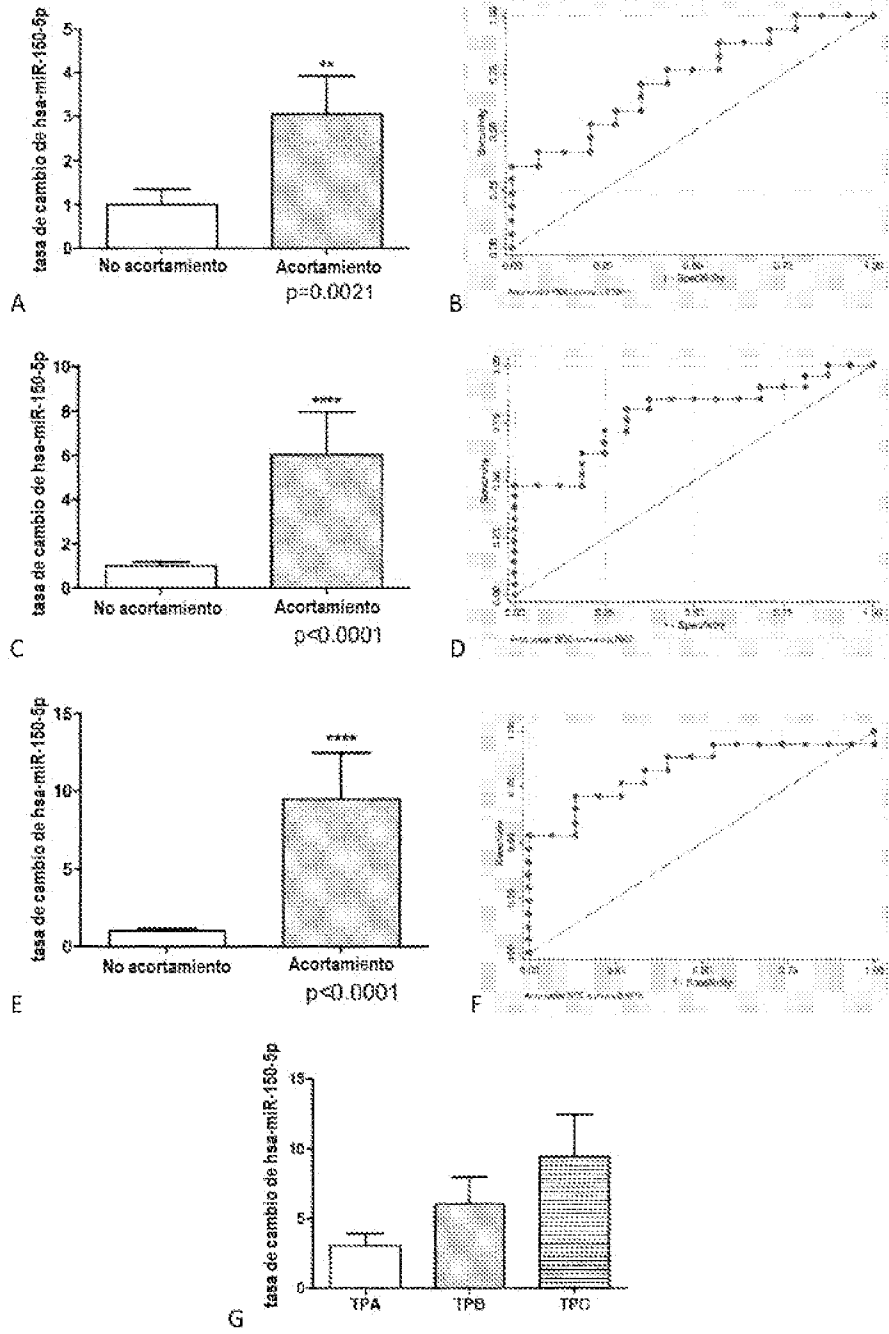


Figura 7

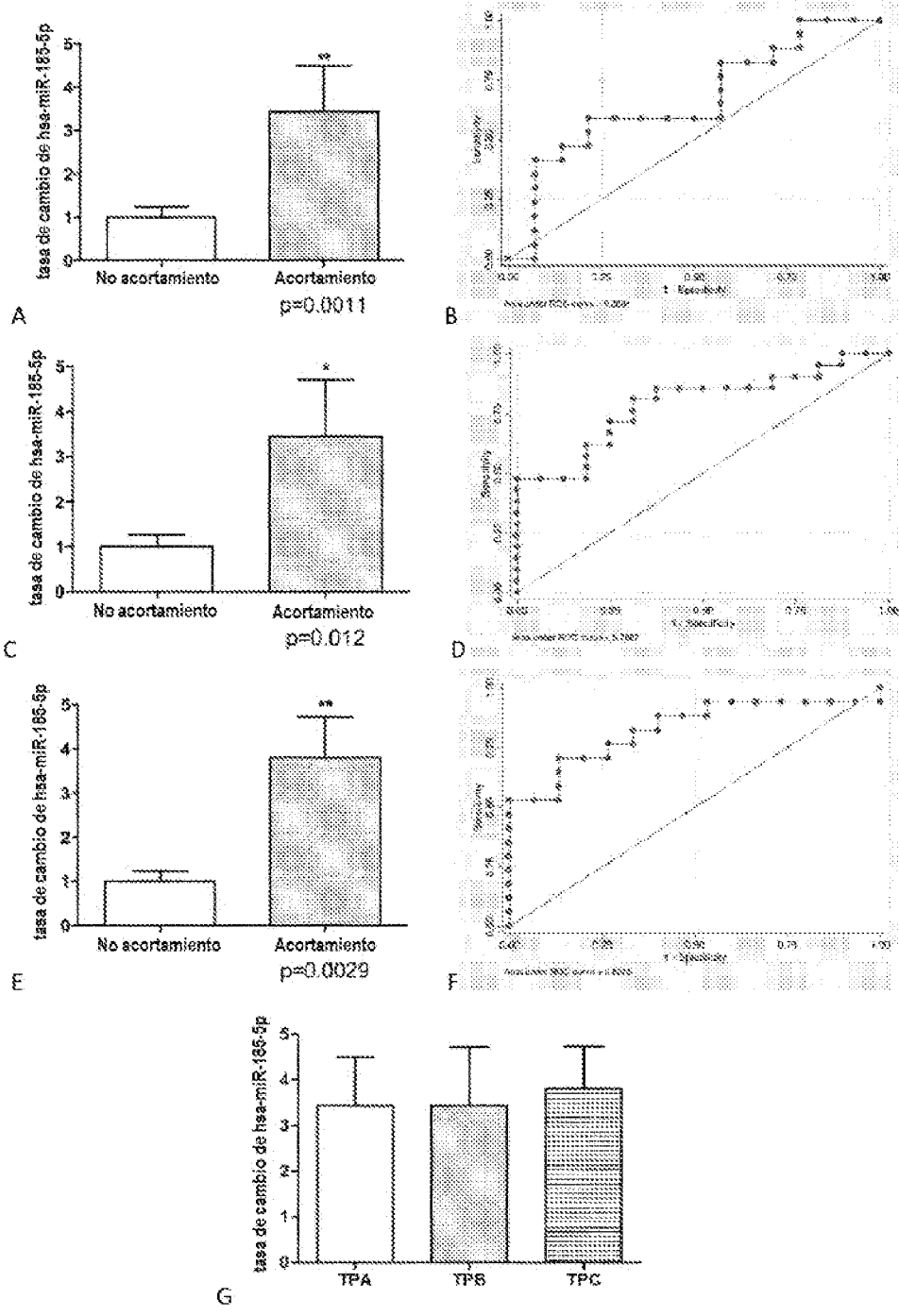


Figura 8

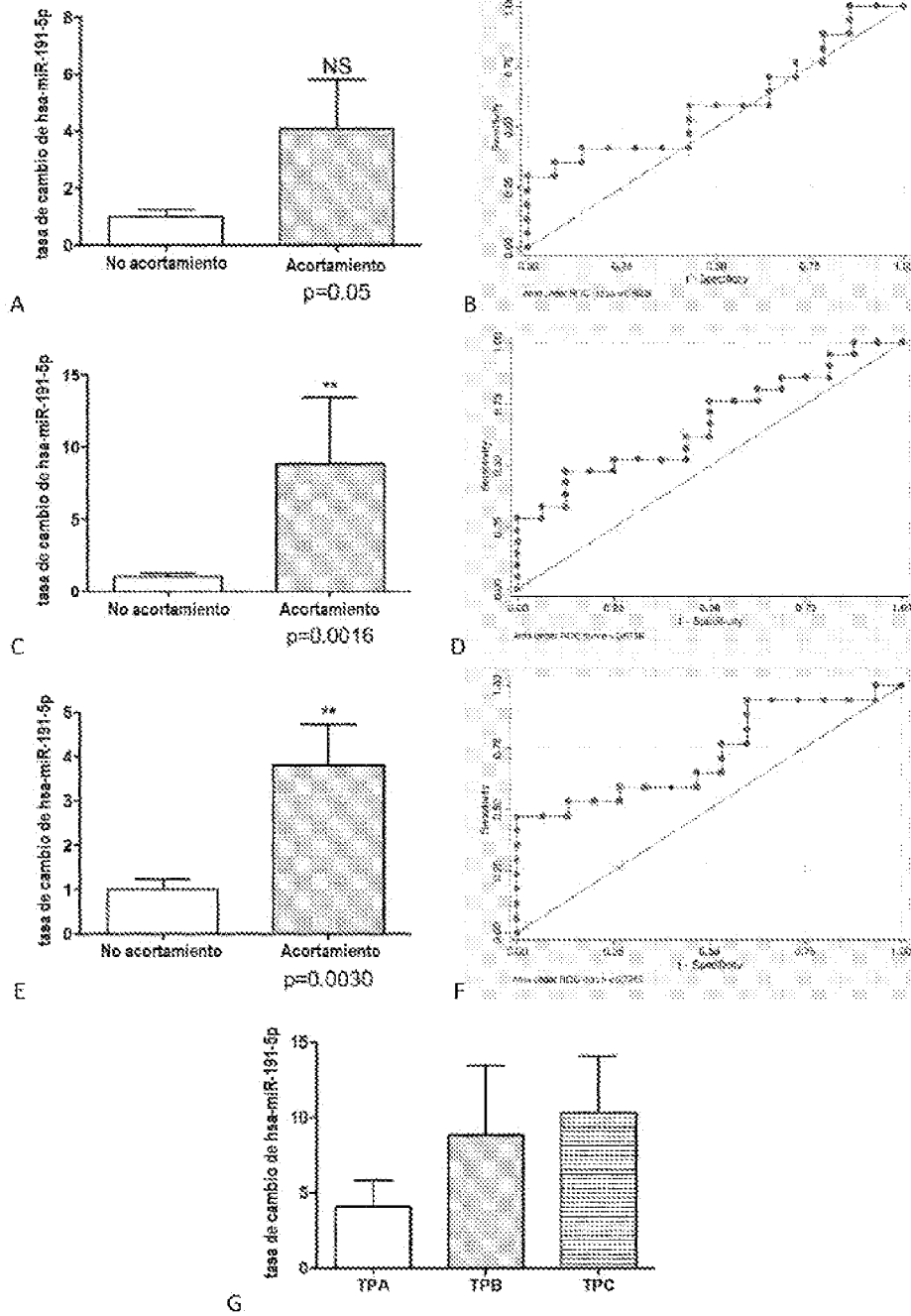


Figura 9

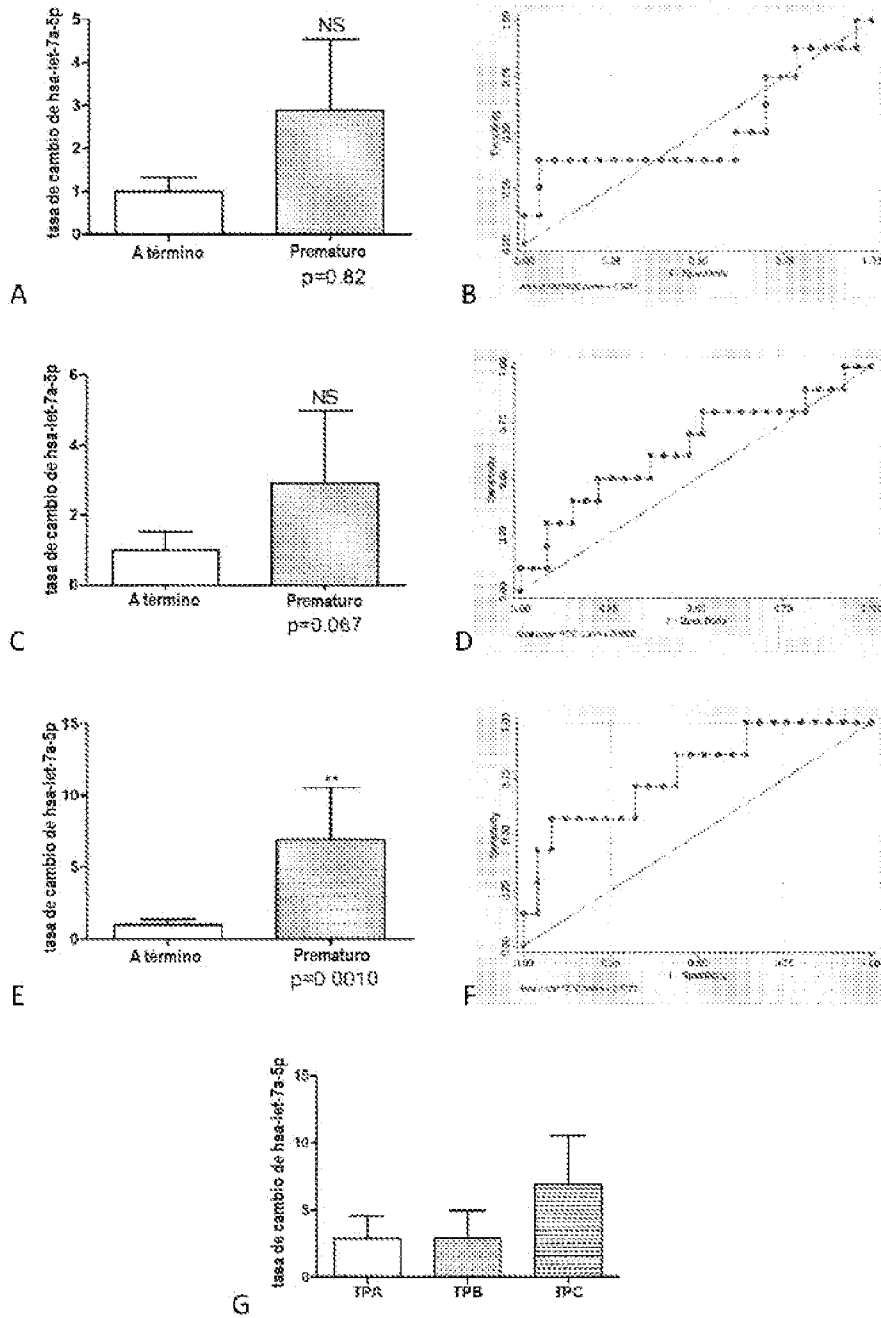


Figura 10

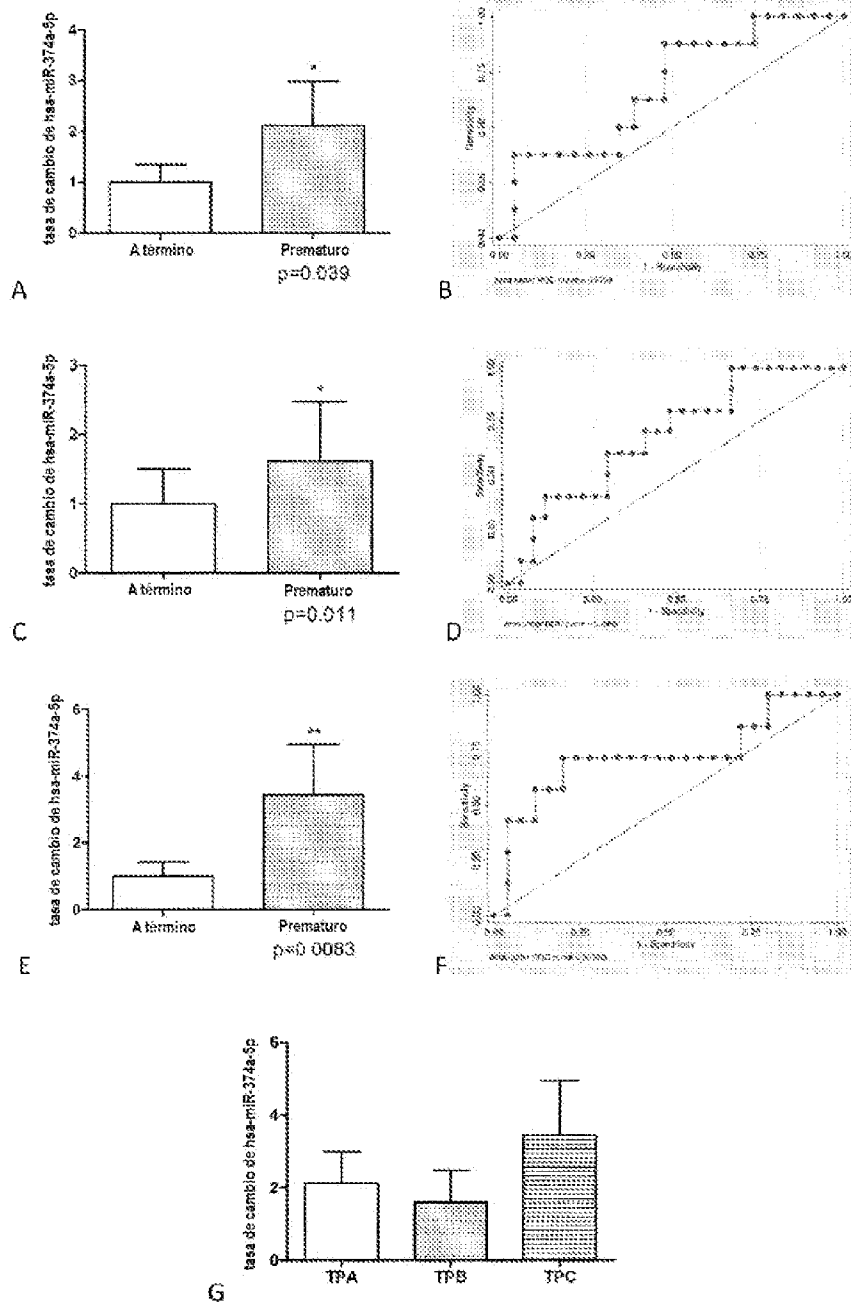


Figura 11

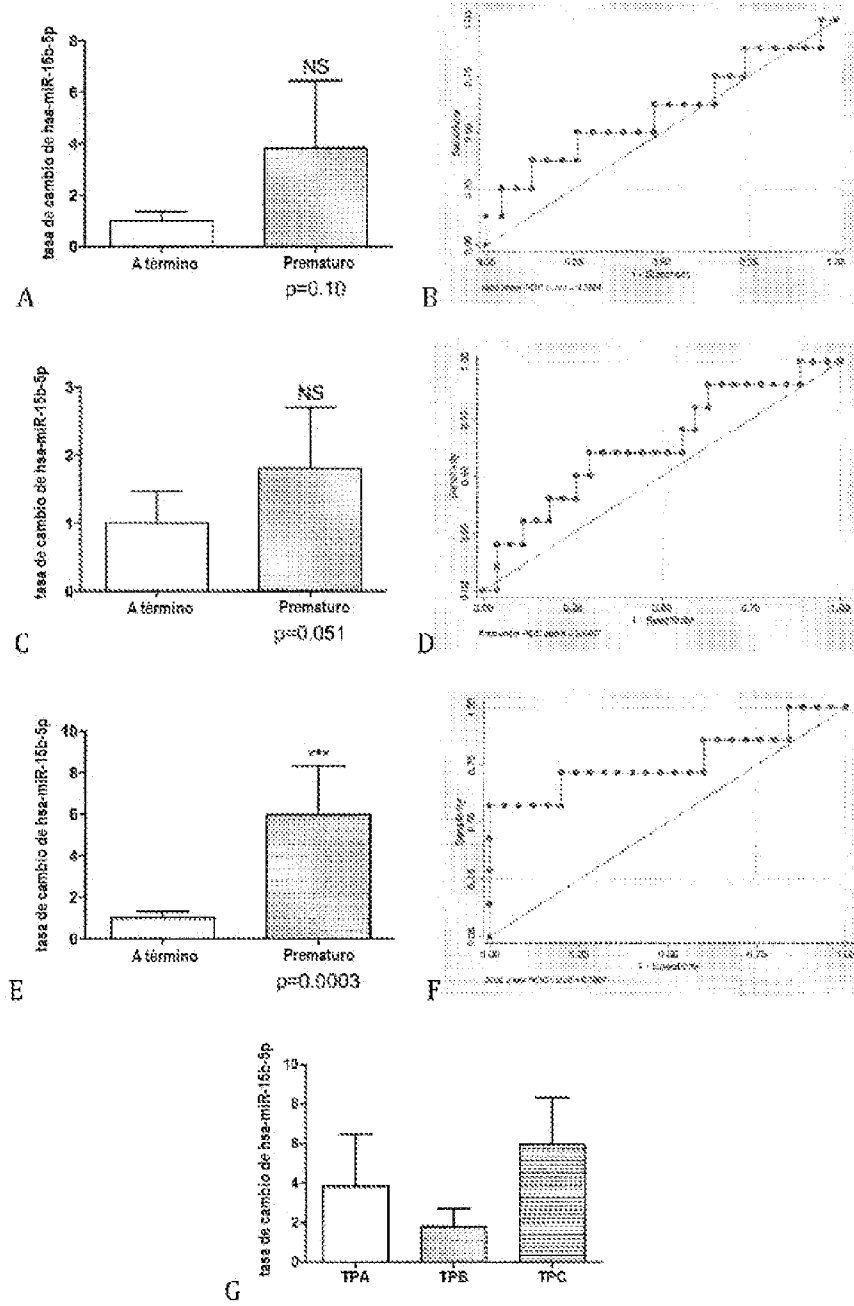


Figura 12

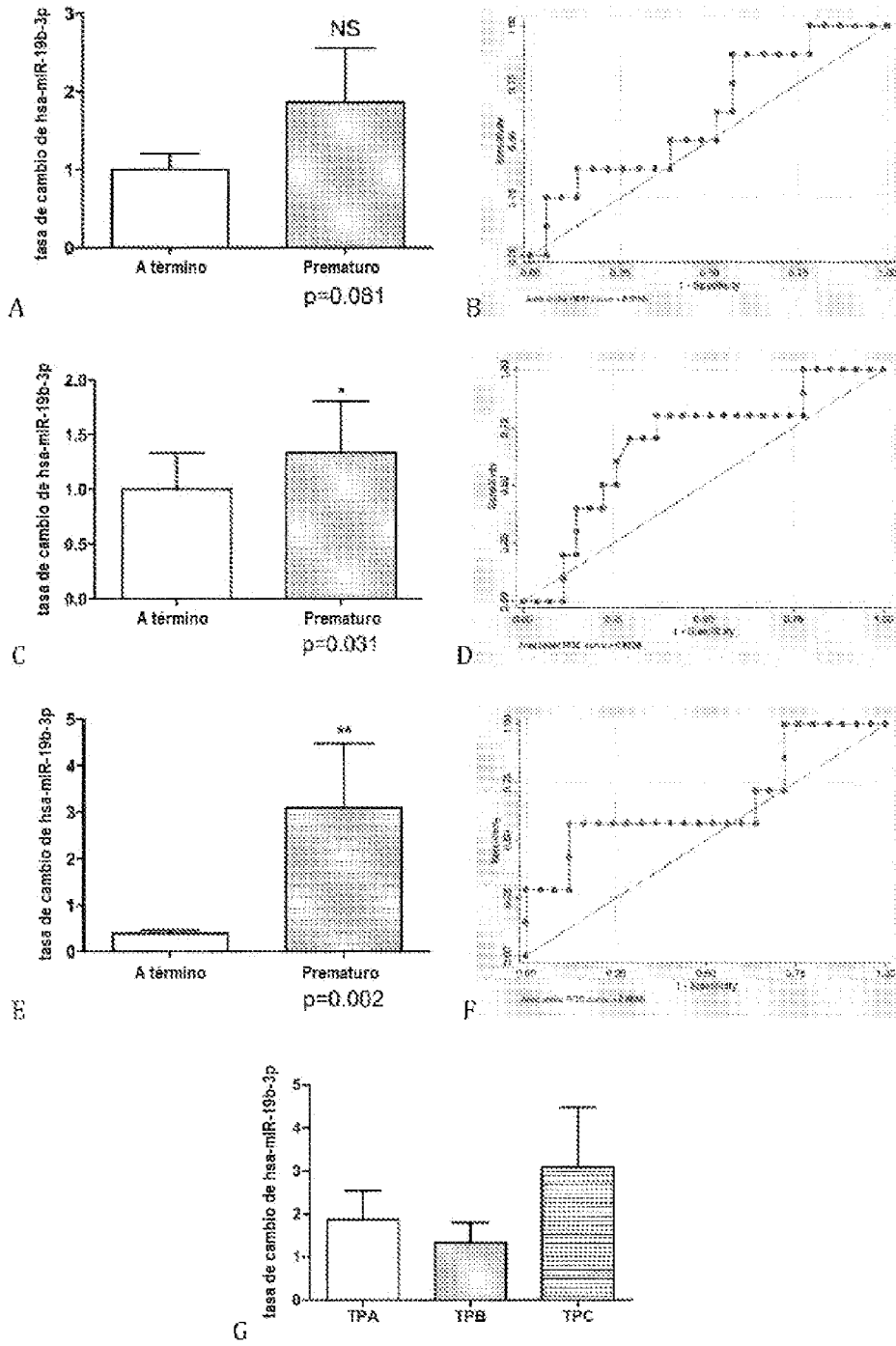


Figura 13

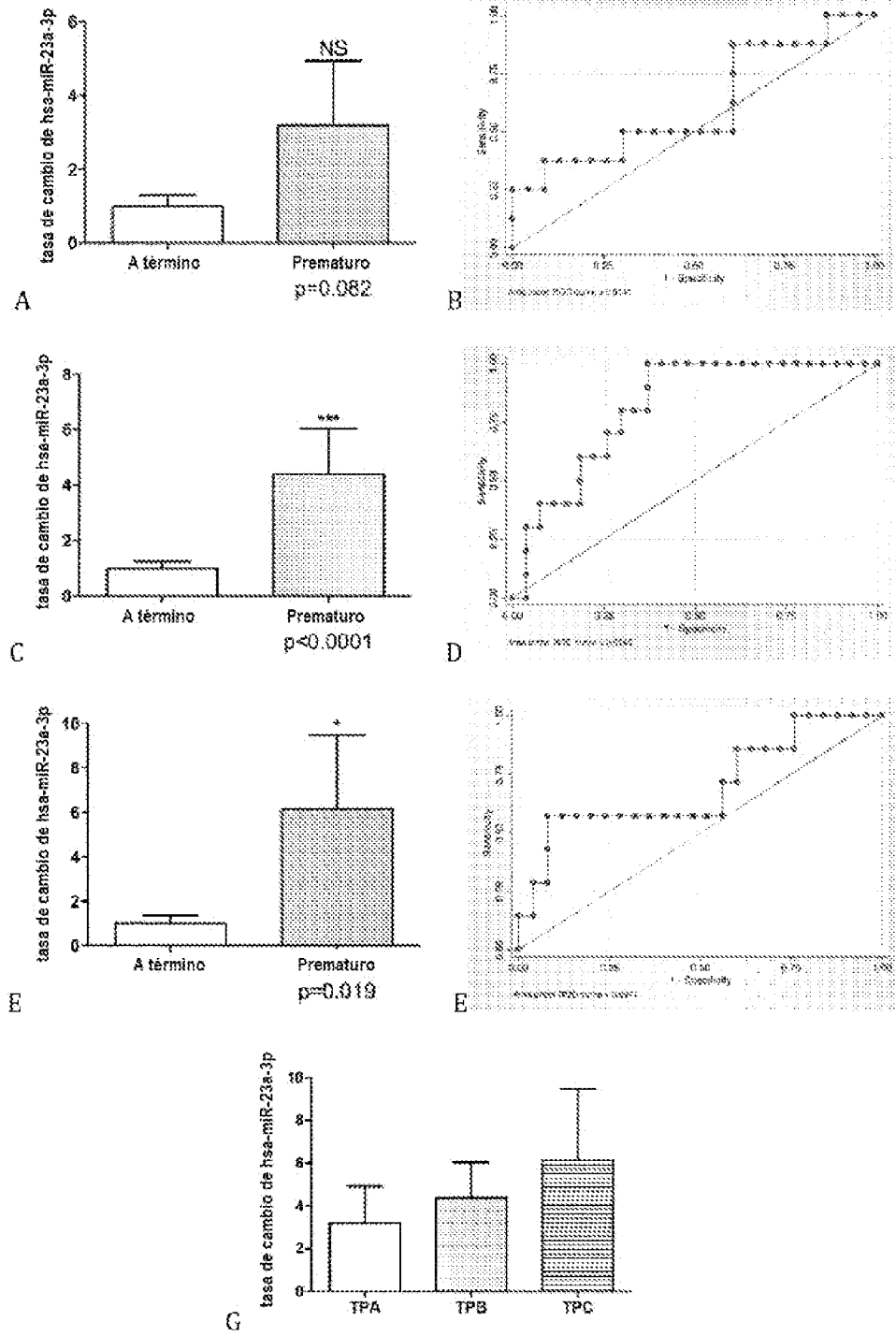


Figura 14

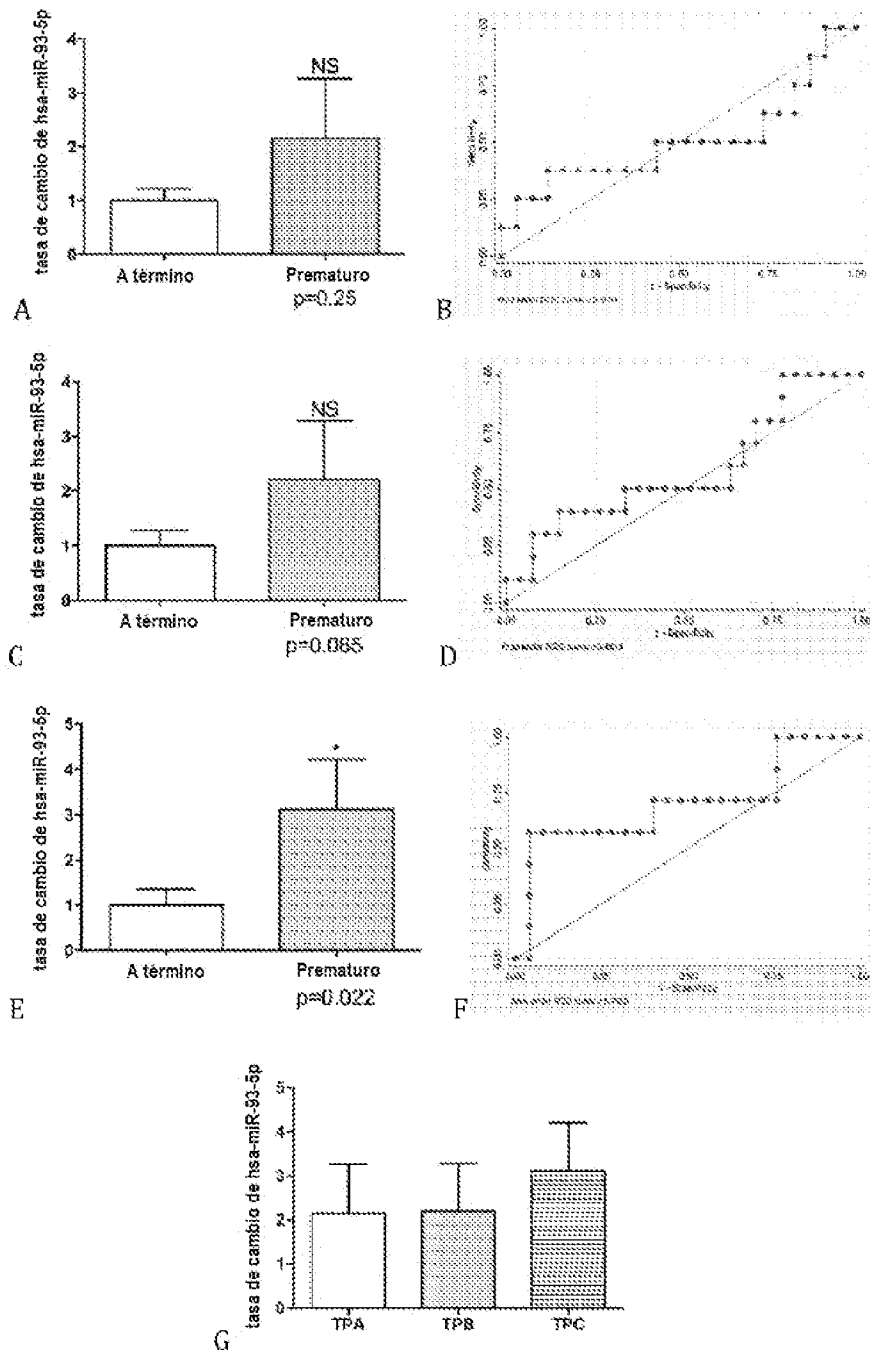


Figura 15

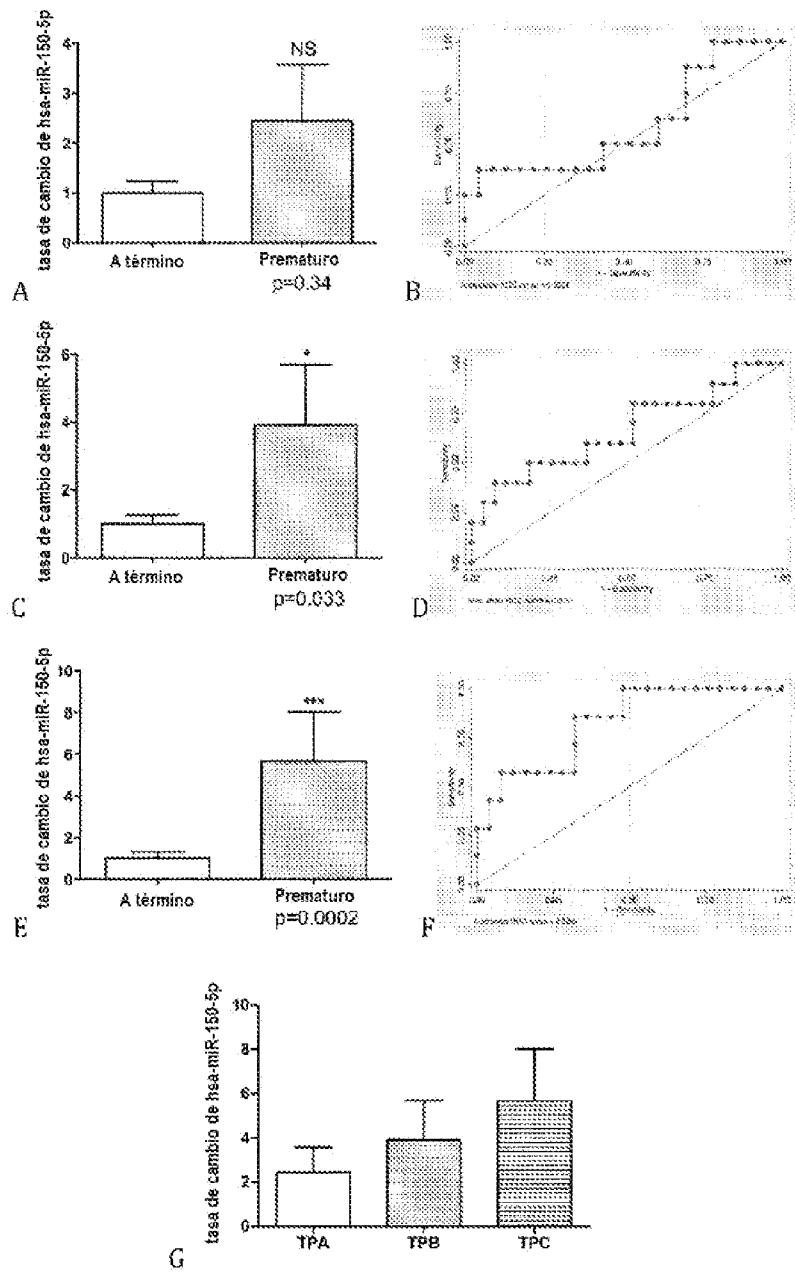


Figura 16

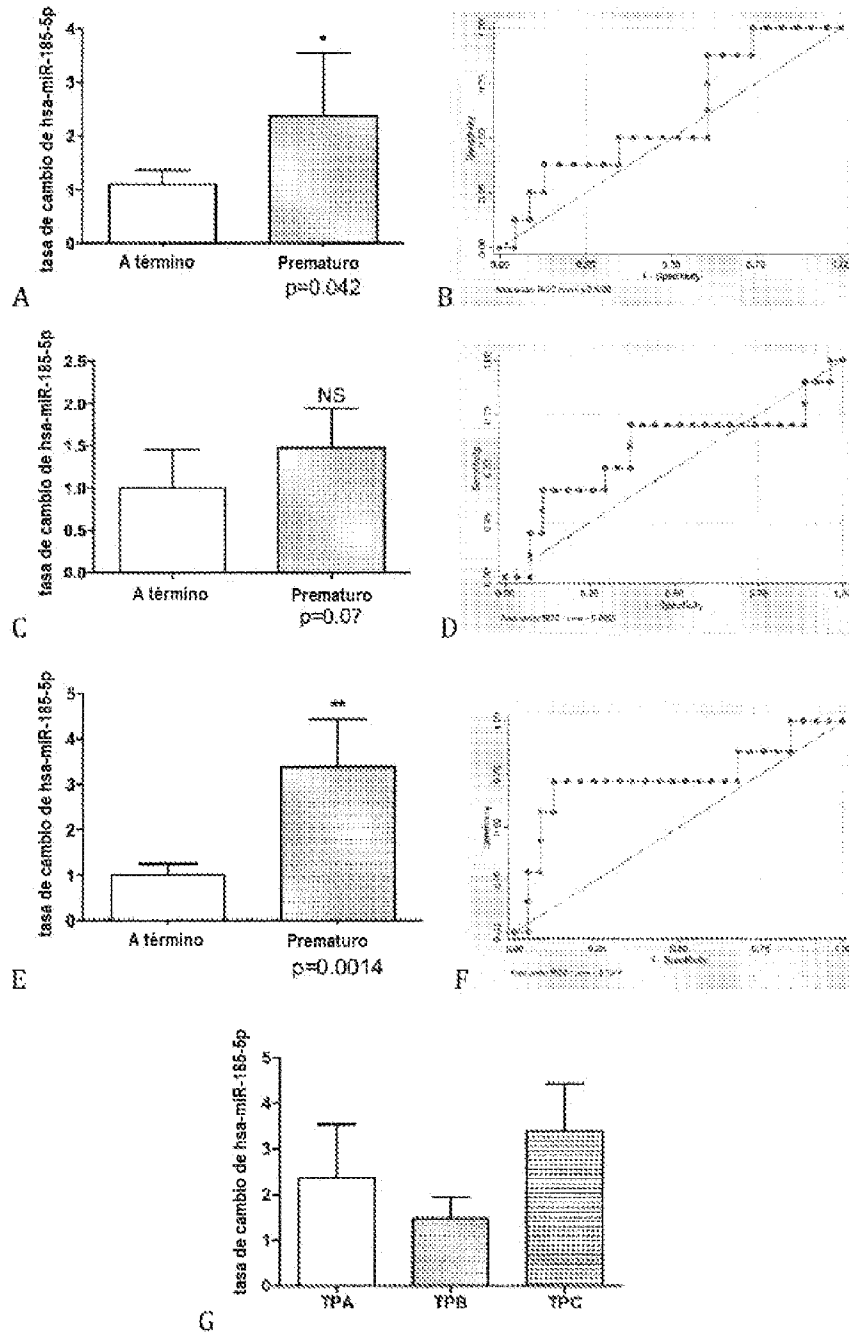


Figura 17

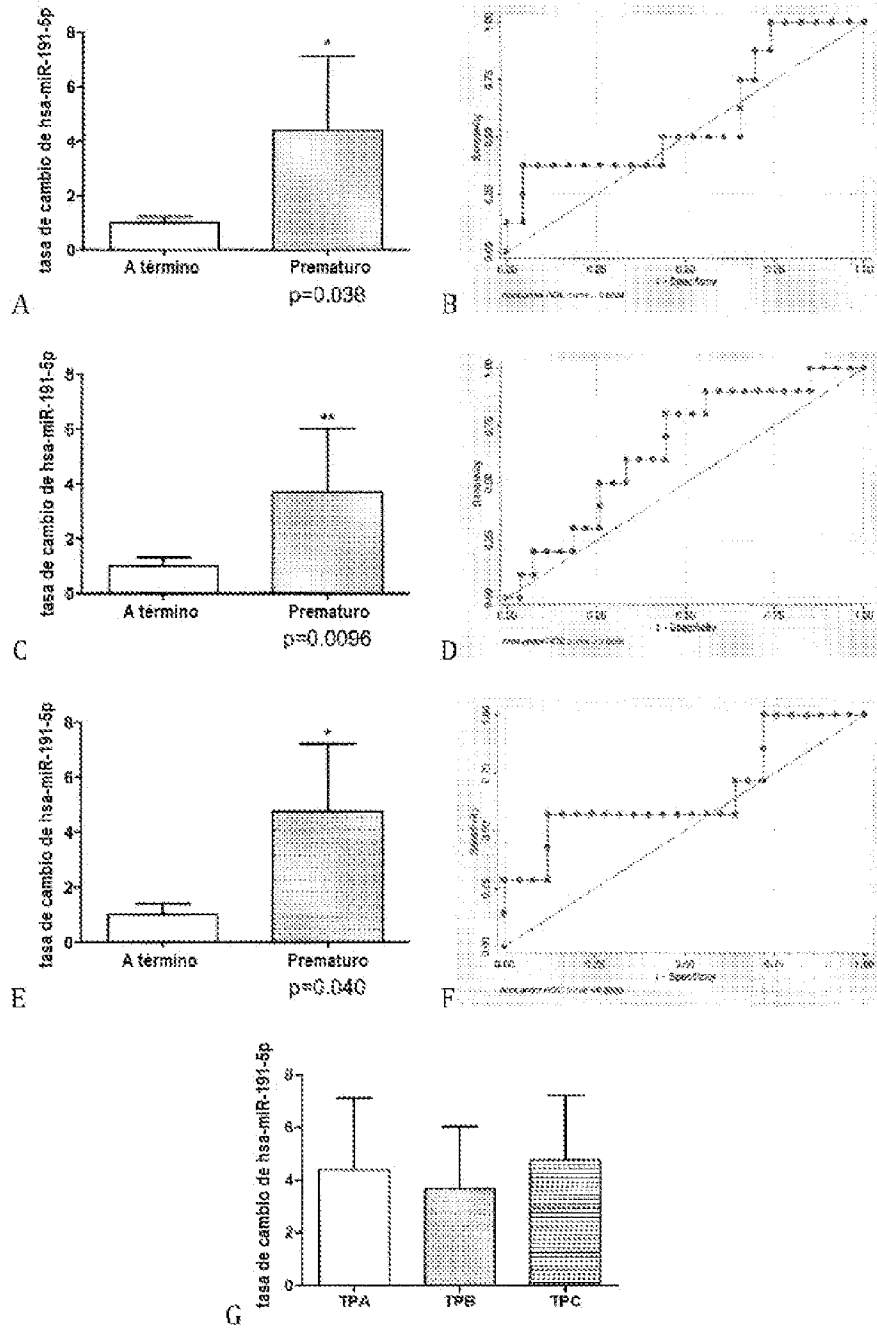


Figura 18

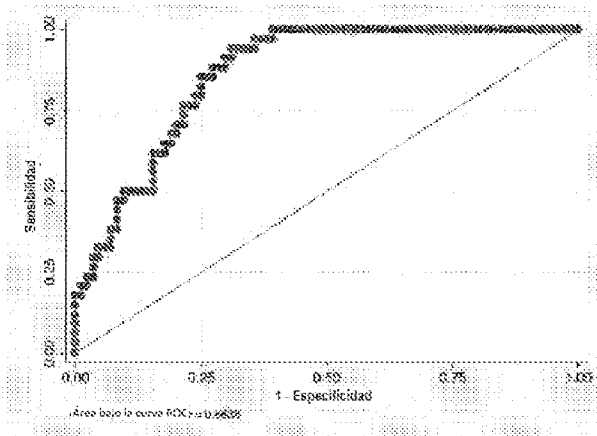


Figura 19

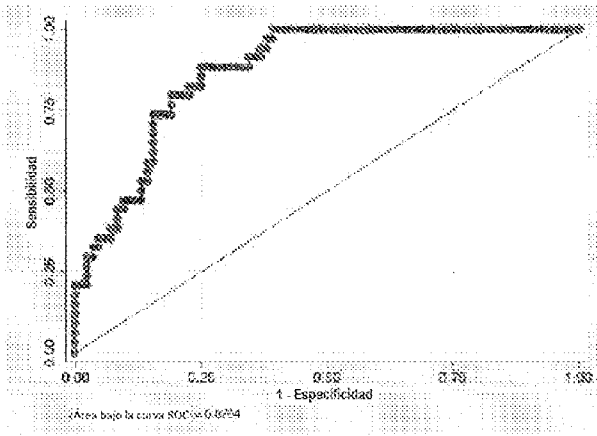


Figura 20

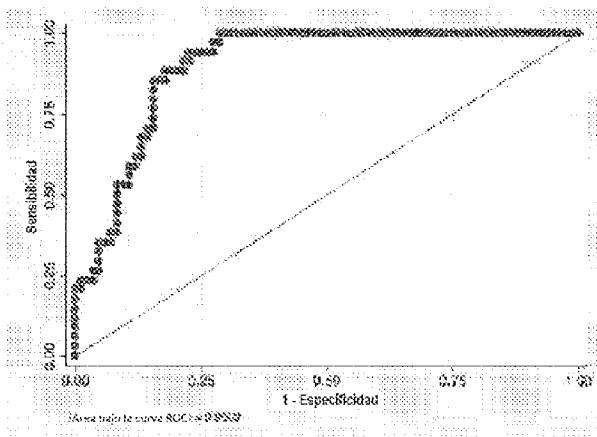


Figura 21