

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 460**

51 Int. Cl.:

A61K 31/435 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2018** **E 22186835 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 4129285**

54 Título: **Compuestos para uso en la regulación de la maduración del folículo**

30 Prioridad:

01.06.2017 EP 17173965

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

27.03.2025

73 Titular/es:

**AARHUS UNIVERSITET (100.00%)
Nordre Ringgade 1
8000 Aarhus C, DK**

72 Inventor/es:

**LYKKE-HARTMANN, KARIN;
HAGEN, ERNST EMIL y
HEUCK, ANDERS**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 3 009 460 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

Compuestos para uso en la regulación de la maduración del folículo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto que regula la maduración del folículo, para uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno de la ovulación y métodos para el tratamiento de mujeres que padecen un trastorno de la ovulación.

10

Antecedentes

La activación de los folículos primordiales está marcada morfológicamente por la transición de primordial a primaria cuando las células de la granulosa aplanadas comienzan a proliferar y se vuelven cuboidales y el ovocito crece en tamaño. La transición de folículo primordial a primario es un proceso gradual en el que se pueden observar folículos intermedios con células de la granulosa tanto aplanadas como cuboidales. Mantener la latencia de los folículos primordiales por un lado y la activación gradual hacia la ovulación por el otro, es un proceso estrictamente regulado que involucra varias vías (Bonnet et al., 2013). Se sabe que los activadores e inhibidores de la transición del folículo primordial a primario son importantes para su regulación. Por ejemplo, la ablación condicional de Foxo3a, Pten y Tsc1/2 en los ovocitos desencadena una mayor activación de los ovocitos (Adhikari et al., 2009, Adhikari et al., 2012). Además, se ha demostrado que el cultivo in vitro de tejido ovárico humano con inhibición de PTEN y estimulación con AKT aumenta la activación del folículo primordial (Novella-Maestre et al., 2015). Se han realizado estudios en ovocitos humanos en un grupo de ovocitos aislados de folículos primordiales, intermedios y primarios (Markholt et al., 2012) o en combinación con las células de la granulosa circundantes (Kristensen et al., 2015). Sin embargo, no ha sido posible diseccionar específicamente la expresión génica en ovocitos de folículos primordiales y primarios, respectivamente.

15

20

25

Los déficits ováricos y, en consecuencia, la infertilidad son un problema creciente en todo el mundo y, a menudo, se atribuyen a una producción de óvulos comprometida o deficiente en las hembras. El tratamiento de la infertilidad es un desafío importante con numerosas implicaciones socioeconómicas y psicológicas negativas para el paciente. Impulsar la maduración de los óvulos puede ayudar a las mujeres con, por ejemplo, la disminución de los óvulos relacionada con la edad y/o mujeres con patologías como por ejemplo Síndrome de Ovario Poliquístico. Un desafío importante es proteger la reserva de óvulos en reposo, es decir, el potencial reproductivo, de la caducidad prematura. Por lo tanto, retrasar la maduración de los óvulos puede ayudar a las mujeres que necesitan mantener una reserva de óvulos, por ejemplo, durante el tratamiento de enfermedades, tal como el tratamiento del cáncer, o debido a enfermedades o trastornos genéticos que causan el agotamiento prematuro de los óvulos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de controlar las primeras etapas más importantes del desarrollo del huevo.

30

35

El documento US2008221173 describe una composición farmacéutica que tiene actividad dopaminérgica y otras actividades farmacéuticas relacionadas que comprende Trigonelina o su(s) derivado(s) y 4-hidroxiisoleucina o su(s) derivado(s).

40

45 Compendio

45

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona exclusivamente con fines informativos.

Los inventores de la presente descripción han identificado compuestos para uso en la regulación de la maduración de los folículos, en particular para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. La dinámica del transcriptoma asociada específicamente con los ovocitos humanos de los folículos primordiales y primarios, respectivamente, se ha caracterizado y utilizado para identificar objetivos y detectar compuestos potenciales que pueden regular la maduración del folículo, en particular, las primeras etapas de la maduración del folículo, como la transición primordial a primaria.

50

55

En consecuencia, un aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un método para detectar un compuesto que regula la maduración del folículo, en donde dicho método comprende

a. seleccionar un compuesto conocido para regular la actividad de al menos uno de los candidatos identificados en la tabla 1 y/o 2.

60

b. poner en contacto ovarios primordiales y/o primarios determinando dicho compuesto si dicho compuesto es capaz de regular la maduración del folículo determinando la cantidad de folículos primordiales y/o folículos primarios y compararlo con un control.

65

El método se ha utilizado para identificar los compuestos que se describen a continuación.

Por lo tanto, un aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la 6-fosfructo-2-quinasa.

5

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de la 6-fosfructo-2-quinasa. Preferiblemente, dicho compuesto promueve la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona (3PO). En un aspecto específico, se proporciona un compuesto para uso en el tratamiento, prevención o mejora de la infertilidad o fertilidad reducida en un individuo, en donde dicho compuesto es capaz de regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2).

10

También se proporciona un método (no reivindicado) para tratar, prevenir o mejorar la infertilidad o la fertilidad reducida en un individuo, comprendiendo dicho método administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es capaz de regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2).

15

El compuesto es preferiblemente un inhibidor de NFE2L2.

En otro aspecto no reivindicado, se proporciona un método para estimular la maduración del folículo, comprendiendo dicho método

20

a) proporcionar una fuente de folículos primordiales,

b) proporcionar un compuesto capaz de regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2), y

25

c) poner dicho compuesto en contacto con dicha fuente de folículos primordiales.

El método puede comprender simplemente una muestra de folículos primordiales,

30

a) proporcionar un compuesto capaz de regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2), y

b) poner dicho compuesto en contacto con dicha fuente de folículos primordiales.

35

Este método puede ser un método in vitro, y el compuesto es preferiblemente un compuesto que es capaz de estimular la transición primordial a primaria de los folículos.

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la subunidad alfa 1 catalítica activada por AMP de proteína quinasa (PRKAA1).

40

En una realización preferida dicho compuesto es un activador de PRKAA1. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosida (AICAR).

45

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA)

50

En una realización preferida dicho compuesto es un activador de PDGFRA. Preferiblemente, dicho compuesto promueve la maduración del folículo. En una realización específica, dicho compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la fosfodiesterasa 8B (PDE8B).

55

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de PDE8B. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es 4,9-dihidro-4-(1-metil-4-piper-idilidendeo)-10H-benzo(4,5)ciclohepta(1,2,b)tiófeno-10-ona (Ketotifeno).

60

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B).

65

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de PDE3B. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 7-(2,3-dihidroxiopropil)-1,3-dimetilpurina-2,6-diona (difilina), 5-metil-1H-1,6-naftiridin-2-uno (medorinona), 6-[4-(1-ciclohexiltetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-one (cilostazol), 2-[[2-bis(2-hidroxi-etil)amino]-4,8-di(piperidin-1-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-6-il]-(2-hidroxi-etil)amino]etanol (dipiridamol), 3-amino-5-piridin-4-il-1H-piridin-2-ona (amrinona), 1-butil-3-(4-metilfenil)sulfonilurea (tolbutamida), 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona (teofilina) y 3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-diona (pentoxifilina).

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la Carbamoil-Fosfato Sintasa 1 (CPS1).

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de CPS1. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es ácido ((2S)-2-(carbamoilamino)pentanodioico (ácido N-Carbamil-L-glutámico).

La presente invención se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2).

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de NFE2L2. Preferiblemente, dicho compuesto promueve la maduración del folículo. En una realización específica de la invención dicho compuesto es ácido 1-metilpiridin-1-ilo-3-carboxílico;cloruro (clorhidrato de Trigonelina).

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la proteína tirosina quinasa 2 beta (PTK2B).

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de PTK2B. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en N-metil-N-[3-[[[2-[(2-oxo-1,3-dihidroindol-5-il)amino]-5-(trifluorometil)pirimidin-4-il]amino]metil]piridin-2-il]metanesulfonamida (PF-562271) y CT-707.

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de MDM2.

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de MDM2. Preferiblemente, dicho compuesto promueve la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 1-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-4-N-piridin-4-ilbenceno-1,4-diamina (serdemetan), (1S)-1-(4-clorofenil)-6-metoxi-2-[4-[metil-[4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil]metil]amino]fenil]-7-propan-2-iloxi-1,4-dihidroisoquinolin-3-ona (CGM097), L-eritro-hexonamida, 2,6-anhidro-5-(((3'R,4'S,5'R)-6"-cloro-4'-(2-cloro-3-fluoro-4-piridinil)-1",2"-dihidro-4,4-dimetil-2"-oxodispiro(ciclohexano-1,2'-pirrolidina-3',3'-(3H)indol)-5'-il)carbonil)amino)-3,4,5-trideoxi-, 4-metilbencenosulfona (DS-3032b), 4-amino-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona (MK-8242), (6S)-5-(5-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-oxo-3-piridinil)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxi-5-pirimidinil)-5,6-dihidro-1-(1-metiletilo)-pirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (HDM201), ALRN-6924, ácido 4-[[[(3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-D-proli]amino]-3-metoxibenzoico (idasanutlin), RO6839921, [(4S,5R)-2-(4-terc-butil-2-etoxifenil)-4,5-bis(4-clorofenil)-4,5-dimetilimidazol-1-il]-[4-(3-metilsulfonilpropil)piperazin-1-il]metanona (RO-5045337), ácido 2-[[[(3R,5R,6S)-5-(3-clorofenil)-6-(4-clorofenil)-3-metil-1-[(2S)-3-metil-1-propan-2-ilsulfonilbutan-2-il]-2-oxopiperidin-3-il]acético (AMG-232) y APG-115.

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la tirosina quinasa 4 del receptor Erb-B2 (ERBB4).

En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de la tirosina quinasa 4 del receptor Erb-B2 (ERBB4). Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en [(3S)-morfolin-3-il]metil N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]carbamato (BMS-599626), (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-il]oxiquinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (afatinib), N-[2-[2-(dimetilamino)etilmetilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib), 1-[4-[4-(3,4-dicloro-2-fluoroanilino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxipiperidin-1-il]prop-2-en-1-ona (poziotinib), 4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-ilo)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[[4-piridin-3-ilpirimidin-2-il]amino]benzamida (pirotinib) y (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (pelitinib).

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación

de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la proteína quinasa de especificidad dual (TKK).

5 En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de TKK. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es metilo 2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato (BAY 1217389).

10 Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la tirosina quinasa linfoide B (BLK).

15 En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de BLK. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es N-[2-[2-(dimetilamino)etilmetilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib).

Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas 1 (IGF1R)

20 En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de IGF1R. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en (5R,5aR,8aS,9R)-5-hidroxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-ona (picropodofilina), 3-[8-amino-1-(2-fenilquinolin-7-il)imidazo[1,5-a]pirazin-3-il]-1-metilciclobutan-1-ol)(LC Laboratories (linsitinib), cixutumumab, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida (ganitumab), ((E)-N-[4-[3-cloro-4-(piridin-2-ilmetoxi)anilino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (neratinib), 4-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-N-[(3-propan-2-il-1,2-oxazol-5-il)metil]pirimidina-2,4-diamina (XL228), 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridin-2-carboxamida (BIIB022), 4-amino-N-(1-azabicyclo [3.3.1]nonan-4-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida (dalotuzumab) y MM-141.

30 Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF2).

35 En una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de IGF2. Preferiblemente, dicho compuesto inhibe la maduración del folículo. En una realización específica dicho compuesto es BI 836845.

Los compuestos descritos en el presente documento y anteriormente son para uso en la regulación de la maduración del folículo *in vitro*.

40 En otro aspecto no reivindicado, los compuestos descritos en el presente documento son para uso en la regulación de la maduración del folículo *in vivo*.

45 En una realización preferida de la presente invención, los compuestos son para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Preferiblemente, dichos folículos son folículos de mamíferos. Se prefiere que dicho mamífero sea un ser humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto como se define en el presente documento para uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno de la ovulación.

50 En una realización, dicho trastorno de la ovulación se selecciona del grupo que consiste en síndrome de ovario poliquístico (PCOS), insuficiencia ovárica prematura (POI), disfunción hipotalámica y menopausia.

55 En otra realización, dicho trastorno de la ovulación está causado por hiperprolactinemia.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos Trigonelina para usar en el tratamiento, prevención o mejora de la infertilidad o reducción de la fertilidad en un individuo femenino.

60 Preferiblemente, dicha composición farmacéutica comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dicha composición farmacéutica comprende además un agente activo adicional.

65 Dicha composición farmacéutica puede, por ejemplo, administrarse *in vitro* a los folículos primordiales de dicho individuo.

En una realización preferida, dicho individuo hembra es un mamífero hembra. Preferiblemente, dicho mamífero hembra es una hembra humana.

5 Otro aspecto no reivindicado de la presente descripción se refiere a un método para tratar, prevenir o mejorar la infertilidad de una mujer que tiene un trastorno de la ovulación, que comprende administrar a dicha persona una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se define en el presente documento.

Preferiblemente, dicho individuo hembra es una hembra de mamífero, tal como una hembra humana.

10 En un aspecto específico no reivindicado del compuesto para uso o métodos proporcionados en el presente documento, el tratamiento comprende las etapas de

a. retirar los ovocitos ovulados de dicho individuo,

15 b. someter dicho ovocito ovulado a fertilización in vitro obteniendo así un ovocito fertilizado que dio lugar a un cigoto,

c. cultivar dicho cigoto para obtener un blastocisto multicelular, y

20 d. transferir dicho blastocisto al útero de dicho individuo y/o una madre subrogada.

En un aspecto no reivindicado de la presente descripción, también se proporciona un método para estimular la maduración del folículo, comprendiendo dicho método

25 a) proporcionar un compuesto capaz de regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2), y

b) poner dicho compuesto en contacto con dicha fuente de folículos primordiales.

30 Descripción de los dibujos

Figura 1: Diseño experimental para identificación por microdissección y secuenciación (A-B), corte por láser y posterior captura de ovocitos de folículos primordiales (A) y primarios (B), revelando la precisión con la que se aislaron los ovocitos específicos de la etapa. Los ovocitos de los folículos primordiales y primarios, así como las células de la granulosa (GC) se indican mediante barras. Barra de escala de 50 μm . (C) Ovocitos de primordiales (N=3 pacientes; n=185, n=181, n=70 ovocitos) y primaria (N=3 pacientes; n=76, n=61= n=45 ovocitos) se aislaron folículos de tres pacientes diferentes (paciente 1-3). Posteriormente, el ovocito adherido a la tapa se lisó para el aislamiento de ARNm, la síntesis de ADNc y la secuenciación de ARN. Después de la secuenciación, se realizó el mapeo de los datos al genoma humano antes de la anotación. Finalmente, cada gen se normalizó transformándolo a \log_2 (CPMS).

40

Figura 2: Construcción de listas SSCEG y DEG

Después de la secuenciación, mapeo, anotación y filtrado, como se ilustra en la Fig. 1b, los genes (11914 y 10186 de ovocitos de folículos primordiales y primarios, respectivamente) se filtraron para incluir transcripciones basadas en la prueba t, que seleccionaron solo genes expresados consistentemente para cada etapa de ovocitos (1099 SSCEG y 1046 SSCEG de ovocitos de folículos primordiales y primarios, respectivamente). A partir de esos genes SSCEG, se identificaron genes DEG (268 DEG regulados positivamente en ovocitos de folículos primordiales en comparación con ovocitos de folículos primarios y 223 DEG regulados negativamente en folículos de folículos primordiales a primarios). Para DEG, prueba t pareada $p < 0,05$ entre dos conjuntos de triplicados y/o cambio de veces del valor FPKM >2

50

Figura 3: Ovarios tratados con 3PO. (A) Tinción H&E de una sección en parafina de un ovario completo cultivado con 3PO 30 μM durante cuatro días. (B) Distribución de folículos de ovarios incubados con 3PO o en medios de control. Diferencias significativas ($P < 0,05$) están marcados con asteriscos.

55

Figura 4: Ovarios tratados con el activador de AMPK AICAR. (A) Sección de parafina teñida H&E de un ovario de ratón juvenil después de 4 días de cultivo con AICAR 1 mM. (B) Distribución de folículos de ovarios incubados con AICAR o en medios de control (ddH₂O). Diferencias significativas ($P < 0,05$) están marcados con asteriscos.,

60

Figura 5: Ovarios tratados con inhibidor AMPK de dorsomorfina. (A) Secciones de parafina teñidas con H&E de ovarios juveniles después de un cultivo de órganos de 4 días con dorsomorfina. (B) Distribución de folículos de ovarios incubados con dorsomorfina o en medios de control. Diferencias significativas ($P < 0,05$) están marcados con asteriscos.

65

Figura 6: Efecto del Ketotifeno inhibidor de la PDE8B sobre la distribución folicular. (A) H & Secciones de parafina teñidas con E de ovarios cultivados durante 96 horas con ketotifeno 85 nM o (B) sin (control). (B) Distribución de folículos de ovarios incubados con Ketotifeno o en medios de control. Se contaron tres secciones para cada tratamiento. El promedio de folículos (%) se representa (\pm errores estándar de la media).
 5 Diferencias significativas ($P < 0,05$) están marcados con asteriscos.

Figura 7. El efecto del NCG protector de CPS1 sobre la distribución folicular. (A) y (B) Los ovarios se trataron con NCG 10 mM y se cultivaron durante 96 horas. Las secciones se tiñeron con H&E. (A) aumento de 200x, (B) aumento de 400x. (C) Ovario tratado con medio de control con DMSO.
 10

Figura 8. El efecto del Trigonelina inhibidor de NFE2L2 en la distribución del folículo. (A) Secciones de parafina teñidas con H&E tratadas con Trigonelina 1,0 μ M o (B) sin (control). (C) Distribución de folículos de ovarios incubados con Trigonelina o en medios de control. Se contaron tres secciones para cada tratamiento. El promedio de folículos (%) se representa (\pm errores estándar de la media). Diferencias significativas ($P < 0,05$) están marcados con asteriscos.
 15

Figura 9. (A) Usamos cultivo de ovario de ratón para detectar el efecto de los compuestos, por su capacidad para inducir o inhibir la activación del folículo primordial. (B) Una vez que se evalúe el efecto (como se describe en (A)), los folículos individuales se tratarán con compuestos en un cultivo 3D que contiene gel (Amoushahi et al, sin publicar), y el ovocito maduro se generará usando gonadotropina coridan humana (hCG), antes de la fertilización in vitro y la transferencia nuevamente a un ratón hembra. Para cada compuesto se valorará la capacidad de parir camadas.
 20

Figura 10. (A) Efecto del bpV(HOpic) inhibidor de PTEN en la distribución de folículos. El promedio de folículos (%) están representados en tres estadios foliculares (Bruun et al, sin publicar). (A) Ovarios tratados con el Temsirolimus inhibidor de mTORC1. Se evaluó y contó la distribución de folículos, y se realizó una prueba t para determinar diferencias significativas ($P < 0,05$). Los resultados significativos están marcados con un asterisco
 25

Figura 11 (A) Porcentaje de folículos en diferentes etapas de desarrollo en diferentes concentraciones de Trigonelina antes y después del cultivo de ovarios. Los valores se dan como media \pm SE. a: Diferencias significativas con ovarios no cultivados ($P < 0,05$). b: Diferencias significativas con el grupo control ($P < 0,05$). c: Diferencias significativas con ovarios cultivados en 0,5 μ M de Trigonelina ($P < 0,05$). (Amoushashi y Lykke-Hartmann, sin publicar)(B) Fotomicrografías de secciones de ovario de ratón completo usando tinción con hematoxilina y eosina sin cultivo (A) y después (B) de 7 días de cultivo, y con tratamientos de Trigonelina a (C) 0,5 μ M, (D) 1 μ M, (E) 5 μ M, (F) 10 μ M, (G) 15 μ M y (H) 20 μ M. Barras de escala de 100 o 50 μ M, como se indica (Amoushashi y Lykke-Hartmann, sin publicar).
 30
 35

Figura 12. Distribución de folículos en ovarios tratados con 3PO. El gráfico ilustra la distribución de folículos en ovarios tratados con o sin 3PO. Diferencias significativas ($P < 0,05$) están marcados con asteriscos
 40

Figura 13: ovario tratado con activador de AMPK AICAR. Después de 4 días de cultivo con 1 mM de AICAR, se evaluó la distribución de folículos en los ovarios tratados con o sin AICAR. Los asteriscos indican diferencias significativas
 45

Figura 14. Efecto del Ketotifeno inhibidor de la PDE8B sobre la distribución folicular. Ovarios cultivados durante 96 horas con ketotifeno 85 nM o sin (control). Se contaron tres secciones para cada tratamiento. El promedio de folículos (%) se representa (\pm errores estándar de la media).
 50

Figura 15. El efecto del NCG protector de CPS1 sobre la distribución folicular. Los ovarios se cultivaron con NCG 10, 20 o 30 μ M y la distribución de los folículos se evaluó después de 96 horas de incubación.
 55

Figura 16. El efecto de la difilina en la distribución del folículo. Los ovarios se cultivaron con difilina 10 o 100 μ M y la distribución de los folículos se evaluó después de 96 horas de incubación.
 55

Descripción detallada

Definiciones

60 El término "ovario", como se usa en el presente documento, se refiere al órgano reproductor productor de óvulos, que es el sitio de producción y liberación periódica de óvulos, los gametos femeninos. En los ovarios, el óvulo en desarrollo (u ovocito) crece dentro del entorno proporcionado por los folículos.

65 El término "folículo", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de agregación celular aproximadamente esférico que se encuentra en los ovarios. El folículo es una estructura anatómica en la que se desarrolla el ovocito primario. Los folículos están compuestos por diferentes tipos y número de células según

la etapa de su maduración, y su tamaño es indicativo de la etapa de desarrollo del ovocito.

5 El término "folículo primordial", como se usa en el presente documento, se refiere a los folículos que se forman en el ovario femenino a las 18-22 semanas después de la concepción. Los folículos primordiales contienen ovocitos inmaduros rodeados de células de la granulosa planas y escamosas (las células de soporte) que están separadas del entorno del ovocito por la lámina basal. Están inactivos y muestran poca o ninguna actividad biológica.

10 El término "folículo primario" como se usa en este documento se refiere al folículo que se forma cuando las células de la granulosa de estos folículos primordiales cambian de una estructura plana a una cuboide, marcando el comienzo del folículo primario. Tanto el ovocito como el folículo crecen de forma espectacular, aumentando hasta casi 0,1 mm de diámetro. Una cápsula de polímero de glicoproteína llamada zona pelúcida se forma alrededor del ovocito, separándolo de las células de la granulosa circundantes.

15 El término "ovocito primordial", como se usa en el presente documento, se refiere a un ovocito de un folículo primordial.

20 El término "ovocito primario", como se usa en el presente documento, se refiere a un ovocito de un folículo primario.

25 El término "transición de folículos primordial a primario", como se usa en el presente documento, se refiere a la etapa en la que el folículo se desarrolla desde un folículo primordial a un folículo primario. Por lo tanto, la transición primordial a primaria es el proceso por el cual el folículo primordial 'despierta' y madura o se desarrolla en un folículo primario. Por ejemplo, cuando un compuesto promueve la transición primordial a primaria de los folículos, significa que el compuesto promueve o activa la maduración de los folículos primordiales en folículos primarios. Cuando un compuesto inhibe la transición primordial a primaria de los folículos, significa que el compuesto inhibe la maduración de los folículos primordiales en folículos primarios o simplemente mantiene los folículos primordiales en la etapa latente.

30 Método para la detección de compuestos (aspecto no reivindicado de la presente descripción)

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un método para detectar un compuesto que regula la maduración del folículo, en donde dicho método comprende

35 c. seleccionar un compuesto conocido por regular la actividad de al menos uno de los candidatos identificados en la tabla 1 y/o 2.

d. poner en contacto con un ovario primordial y/o un primario con dicho compuesto

40 e. determinar si dicho compuesto es capaz de regular la maduración folicular determinando la cantidad de folículos primordiales y/o folículos primarios y compararlo con un control.

Los métodos para determinar si dicho compuesto es capaz de regular el desarrollo de folículos se describen en la sección de ejemplos.

45 En una realización, el compuesto a probar se disuelve en un disolvente adecuado y se añade a un medio de cultivo que comprende primordial y/o ovarios primarios. Como control, se puede añadir al medio de cultivo un disolvente que no comprende el compuesto.

50 El ovario puede ser un ovario de mamífero tal como, por ejemplo, un ovario de ratón o un ovario humano.

El compuesto también puede ponerse en contacto con una biopsia de un ovario, en particular una biopsia de un ovario humano.

55 La concentración del compuesto en el medio de cultivo depende del compuesto a probar. En una realización, la concentración del compuesto es al menos 0,01 micromolar (μM), tal como al menos 0,1 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM o al menos 5 μM .

60 En una realización, la concentración del compuesto está entre 0,01 μM y 100 milimolar (mM), entre 0,01 μM y 50 mM o entre 0,1 μM y 50 mM.

65 El tiempo de incubación puede ser, por ejemplo, de al menos 10 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas o al menos 96 horas. En una realización, el tiempo de incubación es de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días o 5 días.

Los ovarios primordiales y/o primarios se incuban preferiblemente con el compuesto a 37°C. En particular, los

ovarios primordiales y/o primarios se incuban preferiblemente con el compuesto a 37°C y 5% CO₂

El número de folículos primordiales y primarios se puede determinar mediante microscopía para visualizar la morfología de los ovarios. Consulte la sección experimental para obtener más detalles.

5

Compuestos para uso en la regulación de la maduración del folículo

Los compuestos identificados por el método descrito anteriormente se analizan a continuación. Obsérvese que sólo la Trigonelina forma parte de la presente invención.

10

6-fosfructo-2-quinasa como diana

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la 6-fosfructo-2-quinasa (PFKFB3).

15

Se encontró que PFKFB3 se expresa de manera significativa y consistente en ovocitos primordiales y en ovocitos primarios. Además, se encontró que la regulación de PFKFB3 da como resultado una regulación de la maduración del folículo. Más específicamente, la inhibición de PFKFB3 promueve la maduración del folículo.

20

Por lo tanto, en una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de la 6-fosfructo-2-quinasa. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor promueve la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PFKFB3 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PFKFB3 promueve la transición primordial a primaria de los folículos.

25

En una realización particular preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor es 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona (3PO). 3PO es un inhibidor de PFKFB3.

30

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a 3PO para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Una realización preferida particular se refiere a 3PO para uso en la promoción de la maduración de los folículos, tal como para uso en la promoción de la transición primordial a primaria de los folículos.

35

Subunidad catalítica alfa activada por proteína quinasa AMP como diana

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la subunidad alfa 1 catalítica activada por proteína quinasa AMP (PRKAA1).

40

Se encontró que PRKAA1 se expresa de manera significativa y consistente en ovocitos primordiales y en ovocitos primarios. Además, se encontró que la regulación de PRKAA1 da como resultado una regulación de la maduración del folículo. Más específicamente, la activación de PRKAA1 inhibe la maduración del folículo.

45

Por lo tanto, en una realización preferida dicho compuesto es un activador de PRKAA1. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho activador inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o activador de PRKAA1 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PRKAA1 inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

50

En una realización particular, dicho compuesto o dicho activador es 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosida (AICAR). AICAR es un activador de PRKAA1.

55

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a AICAR para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Una realización preferida particular se refiere al AICAR para uso en la inhibición de la maduración de los folículos, tal como para uso en inhibir la transición primordial a primaria de los folículos.

Receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas

60

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA)

65

Se encontró que PDGFRA se expresa de manera significativa y consistente en ovocitos primordiales y en ovocitos primarios.

En una realización, la activación de PDGFRA promueve la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un activador de PDGFRA. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho activador promueve la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o activador de PDGFRA regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PDGFRA promueve la transición primordial a primaria de los folículos.

En una realización particular, dicho compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, tal como al menos 80 % de identidad de secuencia, tal como al menos 85 % de identidad de secuencia, tal como al menos 90 % de identidad de secuencia, tal como al menos 95 % de identidad de secuencia, tal como al menos 96 % de identidad de secuencia, tal como al menos 97 % de identidad de secuencia, tal como al menos 98 % de identidad de secuencia o tal como al menos 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 codifica el péptido PDGF-AA que se une y activa PDGFRA

Fosfodiesterasa 8B como diana

Aún otro aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la fosfodiesterasa 8B (PDE8B).

Se encontró que PDE8B se expresa de manera significativa y consistente en ovocitos primordiales y en ovocitos primarios. Además, se encontró que la regulación de PDE8B da como resultado una regulación de la maduración del folículo. Más específicamente, la inhibición de PDE8B inhibe la maduración del folículo.

Por lo tanto, en una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de PDE8B. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PDE8B regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PDE8B inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

En una realización particular, dicho compuesto o dicho inhibidor es 4,9-dihidro-4-(1-metil-4-piper-idilidendeo)-10H-benzo(4,5)ciclohepta(1,2,b)tiofeno-10-ona. 4,9-dihidro-4-(1-metil-4-piper-idilidendeo)-10H-benzo(4,5)ciclohepta(1,2,b)tiofeno-10-ona también se conoce como ketotifeno. El ketotifeno es un inhibidor de la PDE8B.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a ketotifeno para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Una realización preferida particular se refiere al ketotifeno para uso en la inhibición de la maduración de los folículos, tal como para uso en inhibir la transición primordial a primaria de los folículos.

Fosfodiesterasa 3B como diana

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B).

Se encontró que PDE3B se expresa de manera significativa y consistente en ovocitos primordiales y en ovocitos primarios.

En una realización, la inhibición de PDE3B inhibe la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de PDE3B. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PDE3B regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PDE3B inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

En una realización, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 7-(2,3-dihidroxiopropil)-1,3-dimetilpurina-2,6-diona (difilina), 5-metil-1H-1,6-naftiridina-2-ona (medorinona), 6-[4-(1-ciclohexiltetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona (cilostazol), 2-[[2-[bis(2-hidroxietyl)amino]-4,8-di(piperidin-1-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-6-il]-(2-hidroxietyl)amino]etanol (dipiridamol), 3-amino-5-piridin-4-il-1H-piridin-2-ona (amrinona), 1-butyl-3-(4-metilfenil)sulfonilurea (tolbutamida), 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona (teofilina) y 3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-diona (pentoxifilina).

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 7-(2,3-dihidroxiopropil)-1,3-dimetilpurina-2,6-diona (difilina), 5-metil-1H-1,6-naftiridin-2-ona (medorinona), 6-[4-(1-ciclohexiltetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona (cilostazol), 2-[[2-[bis(2-

5 hidroxietil)amino]-4,8-di(piperidin-1-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-6-il]-(2-hidroxi)etil)amino]etanol (dipiridamol), 3-amino-5-piridin-4-il-1H-piridin-2-ona (amrinona), 1-butil-3-(4-metilfenil)sulfonilurea (tolbutamida), 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona (teofilina) y 3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-diona (pentoxifilina) para usar en la regulación de la maduración del folículo, tal como para uso en la regulación de primordial a primaria transición de folículos.

10 Una realización preferida particular se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 7-(2,3-dihidroxi)propil)-1,3-dimetilpurina-2,6-diona (difilina), 5-metil-1H-1,6-naftiridina-2-ona (medorinona), 6-[4-(1-ciclohexiltetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona (cilostazol), 2-[[2-[bis (2-hidroxi)etil)amino]-4,8-di(piperidin-1-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-6-il]-(2-hidroxi)etil)amino]etanol (dipiridamol), 3-amino-5-piridin-4-il-1H-piridin-2-ona (amrinona), 1-butil-3-(4-metilfenil)sulfonilurea (tolbutamida), 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona (teofilina) y 3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-diona (pentoxifilina) para uso en la inhibición de la maduración de los folículos, tal como para uso en la inhibición de la transición primordial a primaria de los folículos.

15 Carbamoil-fosfato sintasa 1 como diana

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración folicular, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la carbamoil fosfato sintasa 1 (CPS1).

20 Se encontró que CPS1 se expresaba de manera significativa y consistente en ovocitos primarios y significativamente regulado negativamente en ovocitos primarios en comparación con los ovocitos primordiales.

25 En una realización, la inhibición de CPS1 inhibe la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de CPS1. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de CPS1 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida particular, dicho compuesto o inhibidor de CPS1 inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

30 En una realización particular, dicho compuesto o dicho inhibidor es el ácido ((2S)-2-(carbamoilamino)pentanodioico (ácido N-Carbamil-L-glutámico).

35 Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere al ácido N-carbamil-L-glutámico para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Una realización preferida particular se refiere al ácido N-carbamil-L-glutámico para uso en la inhibición de la maduración de los folículos, tal como para uso en la inhibición de la transición primordial a primaria de los folículos.

40 Factor nuclear eritroide 2 similar a 2 como diana

Aún otro aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del factor nuclear eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2).

45 Se encontró que NFE2L2 se expresaba de manera significativa y constante en los ovocitos primarios.

Además, se encontró que la regulación de NFE2L2 da como resultado una regulación de la maduración del folículo. Más específicamente, la inhibición de NFE2L2 promueve la maduración del folículo.

50 Por lo tanto, en una realización preferida, dicho compuesto es un inhibidor de NFE2L2. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor promueve la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de NFE2L2 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de NFE2L2 promueve la transición primordial a primaria de los folículos.

55 En una realización particular de la invención, dicho compuesto o dicho inhibidor es ácido 1-metilpiridin-1-ilo-3-carboxílico;cloruro (clorhidrato de Trigonelina). El clorhidrato de Trigonelina es un inhibidor de NFE2L2.

60 Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención se refiere al clorhidrato de Trigonelina para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Una realización preferida particular se refiere al clorhidrato de Trigonelina para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en promover la transición primordial a primaria de los folículos.

65 Proteína Tirosina Quinasa 2 Beta como diana

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la proteína tirosina quinasa 2 beta (PTK2B).

- 5 Se encontró que PTK2B se expresaba de manera significativa y constante en los ovocitos primarios.

En una realización, la inhibición de PTK2B inhibe la maduración folicular. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de PTK2B. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de PTK2B regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización particularmente preferida, dicho compuesto o inhibidor de PTK2B inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

- 10 En una realización, dicho compuesto o dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en N-metil-N-[3-[[[2-[(2-oxo-1,3-dihidroindol-5-il)amino]-5-(trifluorometil)pirimidin-4-il]amino]metil]piridin-2-il]metanesulfonamida (PF-562271) y CT-707. Estos compuestos son inhibidores de PTK2B.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a un compuesto o un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en N-metil-N-[3-[[[2-[(2-oxo-1,3-dihidroindol-5-il)amino]-5-(trifluorometil)pirimidin-4-il]amino]metil]piridin-2-il]metanesulfonamida (PF-562271) y CT-707 para uso en la regulación de la maduración del folículo, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

- 20 Una realización preferida particular se refiere a un compuesto o un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en N-metil-N-[3-[[[2-[(2-oxo-1,3-dihidroindol-5-il)amino]-5-(trifluorometil)pirimidin-4-il]amino]metil]piridin-2-il]metanesulfonamida (PF-562271) y CT-707 para uso en la inhibición de la maduración del folículo, tal como para uso en la inhibición de la transición primordial a primaria de los folículos.

Homólogo del doble minuto 2 de ratón

- 30 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del homólogo del doble minuto 2 de ratón (MDM2). MDM2 también se conoce como ubiquitina-proteína ligasa E3 Mdm2. Se encontró que MDM2 expresaba de manera significativa y constante en los ovocitos primarios.

- 35 En una realización, la inhibición de MDM2 promueve la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de MDM2. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor promueve la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de MDM2 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida particular, dicho compuesto o inhibidor de MDM2 promueve la transición primordial a primaria de los folículos.

- 40 En una realización preferida particular, dicho compuesto o dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en 1-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-4-N-piridin-4-ilbenceno-1,4-diamina (serdemetan), (1S)-1-(4-clorofenil)-6-metoxi-2-[4-[metil-[4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil]metil] amino]fenil]-7-propan-2-iloxi-1,4-dihidroisoquinolin-3-ona (CGM097), L-eritro-hexanamida, 2,6-anhidro-5-(((3'R,4'S,5'R)-6"-cloro-4'-(2-cloro-3-fluoro-4-piridinil)-1",2"-dihidro-4,4-dimetil-2"-oxodispiro(ciclohexano-1,2'-pirrolidina-3',3"-(3H)indol)-5'-il)carbonil)amino)-3,4,5-trideoxi-, 4-metilbencenosulfona (DS-3032b), 4-amino-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona (MK-8242), (6S)-5-(5-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-oxo-3-piridinil)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxi-5-pirimidinil)-5,6-dihidro-1-(1-metiletil)-pirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (HDM201), ALRN-6924, 4-[[[(3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-D-prolil]amino]-3-metoxibenzoico (idasanutlin), RO6839921, [(4S,5R)-2-(4-terc-butil-2-etoxifenil)-4,5-bis(4-clorofenilo)-4,5-dimetilimidazol-1-il]-[4-(3-metilsulfonilpropil)piperazin-1-il]metanona (RO-5045337), 2-[(3R,5R,6S)-5-(3-ácido clorofenil)-6-(4-clorofenil)-3-metil-1-(2S)-3-metil-1-propan-2-ilsulfonilbutan-2-il]-2-oxopiperidin-3-il]acético (AMG-232) y APG-115. Estos compuestos son inhibidores de MDM2.

- 55 Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a un compuesto o un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en 1-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-4-N-piridin-4-ilbenceno-1,4-diamina (serdemetan), (1S)-1-(4-clorofenil)-6-metoxi-2-[4-[metil-[4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-ilo)ciclohexil]metil]amino]fenil]-7-propan-2-iloxi-1,4-dihidroisoquinolin-3-ona (CGM097), L-eritro-hexanamida, 2,6-anhidro-5-(((3'R,4'S,5'R)-6"-cloro-4'-(2-cloro-3-fluoro-4-piridinil)-1",2"-dihidro-4,4-dimetil-2"-oxodispiro(ciclohexano-1,2'-pirrolidina-3',3"-(3H)indol)-5'-il)carbonil)amino)-3,4,5-tridesoxi-, 4-metilbencenosulfona (DS-3032b), 4-amino-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona (MK-8242), (6S)-5-(5-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-oxo-3-piridinil)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxi-5-pirimidinil)-5,6-dihidro-1-(1-metiletil)-pirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (HDM201), ALRN-6924, ácido 4-[[[(3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-D-prolil]amino]-3-metoxibenzoico (idasanutlin), RO6839921, [(4S,5R)-2-(4-terc-butil-2-etoxifenil)-4,5-bis(4-clorofenil)-4,5-dimetilimidazol-1-il]-[4-(3-metilsulfonilpropil)piperazin-1-il]metanona (RO-5045337), ácido 2-[(3R,5R,6S)-5-(3-clorofenil)-6-(4-

clorofenil)-3-metil-1-[(2S)-3-metil-1-propan-2-ilsulfonilbutan-2-il]-2-oxopiperidin-3-il]acético (AMG-232) y APG-115 para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

- 5 Una realización preferida particular se refiere a un compuesto o un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en 1-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-4-N-piridin-4-ilbenceno-1,4-diamina (serdemetán), (1S)-1-(4-clorofenil)-6-metoxi-2-[4-[metil-[[4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil]metil] amino]fenil]-7-propan-2-iloxi-1,4-dihidroisoquinolin-3-ona (CGM097), L-eritro-hexonamida, 2,6-anhidro-5-(((3'R,4'S,5'R)-6"-cloro-4'-(2-cloro-3-fluoro-4-piridinil)-1",2"-dihidro-4,4-dimetil-2"-oxodispiro(ciclohexano-1, 2'-pirrolidina-3',3"-(3H)indol)-5-il)carbonil)amino)-3,4,5-trideoxi-, 4-metilbencenosulfona (DS-3032b), 4-amino-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona (MK-8242), (6S)-5-(5-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-oxo-3-piridinil)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxi-5-pirimidinil)-5,6-dihidro-1-(1-metiletil)-pirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona (HDM201), ALRN-6924, 4-[[[(3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-D-prolil]amino]-3-metoxibenzoico (idasanutlin), RO6839921, [(4S,5R)-2-(4-terc-butil-2-etoxifenil)-4,5-bis(4-clorofenilo)-4,5-dimetilimidazol-1-il]-[4-(3-metilsulfonilpropil)piperazin-1-il]metanona (RO-5045337), ácido 2-[(3R,5R,6S)-5-(3-clorofenil)-6-(4-clorofenil)-3-metil-1-[(2S)-3-metil-1-propan-2-ilsulfonilbutan-2-il]-2-oxopiperidin-3-il]acético (AMG-232) y APG-115 para uso en la promoción de la maduración de los folículos, tal como para uso en la promoción de la transición primordial a primaria de los folículos.

- 20 Tirosina quinasa 4 del receptor Erb-B2 como diana

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la tirosina quinasa 4 del receptor Erb-B2 (ERBB4).

25

Se encontró que ERBB4 expresaba de manera significativa y constante en los ovocitos primarios.

- 30 En una realización, la inhibición de ERBB4 inhibe la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de ERBB4. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de ERBB4 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de ERBB4 inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

- 35 En una realización particular dicho compuesto o dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en [(3S)-morfolin-3-il]metil N-[4-[[1-(3-fluorofenil)metil]indazol-5-ilo]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]carbamatos (BMS-599626), (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-il]oxiquinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (afatinib), N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib), 1-[4-[4-(3,4-dicloro-2-fluoroanilino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxipiperidin-1-il]prop-2-en-1-ona (poziotinib), 4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]benzamida (pirotinib) y (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (pelitinib). Estos compuestos son inhibidores de ERBB4.

- 45 Por tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a un compuesto o un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en [(3S)-morfolin-3-il]metil N-[4-[[1-(3-fluorofenil)metil]indazol-5-ilo]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]carbamatos (BMS-599626), (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-il]oxiquinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (afatinib), N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib), 1-[4-[4-(3,4-dicloro-2-fluoroanilino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxipiperidin-1-il]prop-2-en-1-ona (poziotinib), 4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]benzamida (pirotinib) y (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (pelitinib) para uso en la regulación de la maduración del folículo, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

- 55 Una realización preferida particular se refiere a un compuesto o un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en [(3S)-morfolin-3-il]metil N-[4-[[1-(3-fluorofenil)metil]indazol-5-ilo]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]carbamatos (BMS-599626), (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-il]oxiquinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (afatinib), N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib), 1-[4-[4-(3,4-dicloro-2-fluoroanilino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxipiperidin-1-il]prop-2-en-1-ona (poziotinib), 4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]benzamida (pirotinib) y (E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (pelitinib) para uso en la inhibición de la maduración del folículo, tal como para uso en la inhibición de la transición primordial a primaria de los folículos.

65

Proteína quinasa de doble especificidad como diana

Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación del desarrollo de folículos primordiales, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la proteína quinasa de doble especificidad (TKK).

5

Se encontró que TKK se expresaba de manera significativa y consistente en los ovocitos primarios (véase la Tabla 2).

10

En una realización, la inhibición de TKK inhibe la maduración folicular. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de TKK. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de TKK regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de TKK inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

15

En una realización, dicho compuesto o dicho inhibidor es metilo 2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato. Metilo 2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato es un inhibidor de TKK.

20

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a metil 2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

25

Una realización preferida particular se refiere a metil 2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato para uso en la inhibición de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

Tirosina quinasa linfoide B como diana

30

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación del desarrollo de folículos primordiales, en donde dicho compuesto puede regular la actividad de la tirosina quinasa linfoide B (BLK).

35

Se encontró que BLK se expresaba significativamente de manera consistente en los ovocitos primordiales y la expresión de BLK estaba regulada negativamente en los ovocitos primarios en comparación con los ovocitos primordiales.

40

En una realización, la inhibición de BLK inhibe la maduración folicular. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de BLK. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de BLK regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida particular, dicho compuesto o dicho inhibidor de BLK inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

45

En una realización dicho compuesto o dicho inhibidor es N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib). N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib) es un inhibidor de TKK.

50

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib) para uso en la regulación de la maduración de los folículos, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

55

Una realización preferida particular se refiere a N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida (osimertinib) para uso en la inhibición de la maduración de los folículos, tal como para uso en la inhibición de la transición primordial a primaria de los folículos.

Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 como diana

60

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1R).

65

Se encontró que IGF1R se expresaba de manera significativa y constante en los ovocitos primordiales y en los ovocitos primarios.

En una realización, la inhibición de IGF1R inhibe la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de IGF1R. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la

maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de IGF1R regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de BLK inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

5 En una realización dicho compuesto o dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en (5R,5aR,8aS,9R)-5-hidroxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-ona (picropodofilina), 3-[8-amino-1-(2-fenilquinolin-7-il)imidazo[1,5-a]pirazin-3-il]-1-metilciclobutan-1-ol)(LC Laboratories (linsitinib), cixutumumab, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida (ganitumab), ((E)-N-[4-[3-cloro-4-(piridin-2-ilmetoxi)anilino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (neratinib), 4-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-N-[(3-propan-2-il-1,2-oxazol-5-il)metil]pirimidina-2,4-diamina (XL228), 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridin-2-carboxamida (BIIB022), 4-amino-N-(1-azabicyclo[3.3.1]nonan-4-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida (dalotuzumab) y MM-141. Estos compuestos son inhibidores de BLK.

15 El cixutumumab (IMC-A12) es un anticuerpo monoclonal humano que normalmente se usa para el tratamiento de tumores sólidos. Es un anticuerpo monoclonal IgG1 totalmente humano dirigido contra el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R) humano con actividad antineoplásica potencial. Cixutumumab se une selectivamente al IGF-1R unido a la membrana, evitando así la unión del ligando IGF-1 y la subsiguiente
20 activación de la vía de señalización PI3K/AKT.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere a un compuesto o un inhibidor que se selecciona del grupo que consiste en (5R,5aR,8aS,9R)-5-hidroxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-ona (picropodofilina), 3-[8-amino-1-(2-fenilquinolina-7-il)imidazo[1,5-a]pirazin-3-il]-1-metilciclobutan-1-ol)(LC Laboratories (linsitinib), cixutumumab, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida (ganitumab), ((E)-N-[4-[3-cloro-4-(piridin-2-ilmetoxi)anilino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (neratinib), 4-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-N-[(3-propan-2-il-1,2-oxazol-5-il)metil]pirimidina-2,4-diamina (XL228), 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridin-2-carboxamida (BIIB022), 4-amino-N-(1-azabicyclo[3.3.1]nonan-4-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida (dalotuzumab) y MM-141 para uso en la regulación de la maduración del folículo, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de folículos.

Una realización preferida particular se refiere a un compuesto o un inhibidor que se selecciona del grupo que consiste en (5R,5aR,8aS,9R)-5-hidroxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-ona (picropodofilina), 3-[8-amino-1-(2-fenilquinolin-7-il)imidazo[1,5-a]pirazin-3-il]-1-metilciclobutan-1-ol)(LC Laboratories (linsitinib), cixutumumab, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida (ganitumab), ((E)-N-[4-[3-cloro-4-(piridin-2-ilmetoxi)anilino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida (neratinib), 4-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-N-[(3-propan-2-il-1,2-oxazol-5-il)metil]pirimidina-2,4-diamina (XL228), 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridin-2-carboxamida (BIIB022), 4-amino-N-(1-azabicyclo[3.3.1]nonan-4-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida (dalotuzumab) y MM-141 para uso en la inhibición de la maduración del folículo, tal como para uso en la inhibición de la transición primordial a primaria de los folículos.

45 MM-141 también se conoce como istiratumab. MM-141 es un anticuerpo biespecífico tetravalente que se dirige al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) (IGF1R; CD221) y al receptor Erb-b2 de tirosina quinasa 3 (ERBB3; HER3; EGFR3).

50 Factor de crecimiento similar a la insulina 2 como diana

Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un compuesto para uso en la regulación de la maduración del folículo, en donde dicho compuesto puede regular la actividad del Factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2).

55 Se encontró que IGF2 expresaba de manera significativa y constante en los ovocitos primarios.

En una realización, la inhibición de IGF2 inhibe la maduración del folículo. Por lo tanto, preferiblemente, dicho compuesto es un inhibidor de IGF2. En otra realización preferida, dicho compuesto o dicho inhibidor inhibe la maduración del folículo. En una realización preferida, dicho compuesto o inhibidor de IGF2 regula la transición primordial a primaria de los folículos. En una realización preferida particular, dicho compuesto o dicho inhibidor de IGF2 inhibe la transición primordial a primaria de los folículos.

65 En una realización, dicho compuesto o dicho inhibidor es BI 836845. BI 836845 es un anticuerpo que se une e inhibe IGF2.

BI 836845 también se conoce como Xentuzumab. Xentuzumab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G1 humanizada (IgG1) que se une y neutraliza la función del factor de crecimiento similar a la insulina humana 1 y 2 (IGF-1, IGF-2). Esto da como resultado una inhibición eficaz de la activación inducida por IGF tanto de IGF-IR como de IR-A (Friedbichler K, et al., Mol Cancer Ther 2014; 13(2):399-409).

5

Por lo tanto, una realización preferida de la presente descripción se refiere al BI 836845 para uso en la regulación de la maduración del folículo, tal como para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

10 Una realización preferida particular se refiere al BI 836845 para uso en la regulación de la maduración del folículo, tal como para uso en promover la transición primordial a primaria de los folículos.

Uso de los compuestos según la presente invención

15 Los compuestos según la presente descripción se pueden usar *in vivo* en donde se administran a un individuo femenino que lo necesite. Por lo tanto, en un aspecto no reivindicado, los compuestos descritos en el presente documento y anteriormente son para uso en la regulación de la maduración del folículo *in vivo*.

20 Los compuestos también se pueden usar *in vitro* en donde se añaden *in vitro* a los folículos. Por lo tanto, en otra realización, los compuestos descritos en el presente documento y anteriormente son para uso en la regulación de la maduración del folículo *in vitro*.

25 En una realización preferida de la presente invención, los compuestos descritos en el presente documento y anteriormente son para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto como se define en el presente documento y anteriormente para uso en la regulación de la transición primordial a primaria de los folículos.

30 En una realización preferida, dichos folículos son folículos de mamíferos. El mamífero puede ser cualquier mamífero tal como, por ejemplo, un roedor, un primate o un carnívoro. En una realización preferida, el roedor es un ratón.

En una realización preferida, el mamífero es una hembra humana.

35 Los compuestos como se definen en el presente documento y anteriormente se pueden usar para ejercer un control farmacológico de la regulación del folículo, en particular la regulación del folículo primordial a primario.

40 Varias enfermedades o trastornos están asociados con un control deficiente en la primera etapa de la regulación del folículo, es decir, la regulación del folículo primordial a primario. Estos trastornos se conocen comúnmente como trastornos de la ovulación. Problemas con la regulación de las hormonas reproductivas por parte del hipotálamo o la glándula pituitaria, o problemas en el ovario, pueden causar trastornos de la ovulación.

Por tanto, la presente invención se refiere a Trigonelina para usar en el tratamiento, prevención o mejora de la infertilidad o reducción de la fertilidad en un individuo hembra.

45 Por ejemplo, la presente invención se refiere a Trigonelina para uso en el tratamiento, prevención o mejora de la infertilidad o reducción de la fertilidad en un mamífero hembra.

50 Preferiblemente dicho individuo femenino es un mamífero hembra. El mamífero es como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, preferiblemente, dicho mamífero hembra es una hembra humana.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto como se describe y define en el presente documento y anteriormente para uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno de la ovulación, tal como un trastorno de la ovulación.

55 En una realización, dicho trastorno de la ovulación es un trastorno de infertilidad.

En una realización, dicho trastorno de la ovulación se selecciona del grupo que consiste en síndrome de ovario poliquístico (PCOS), insuficiencia ovárica prematura (POI), disfunción hipotalámica y menopausia.

60 El PCOS causa un desequilibrio hormonal que afecta a la ovulación (entre otras cosas, es una enfermedad metabólica endógena). El PCOS es una afección que hace que las mujeres no ovulen o que ovulen de manera irregular. El PCOS está asociado con la resistencia a la insulina y la obesidad, el crecimiento anormal de vello en la cara o el cuerpo y el acné. El PCOS es la causa más común de infertilidad femenina.

65 La insuficiencia ovárica prematura (POI), también llamada insuficiencia ovárica primaria, es un trastorno generalmente causado por una respuesta autoinmune o por la pérdida prematura de óvulos de su ovario

(posiblemente debido a la genética o la quimioterapia). La POI, a veces denominada menopausia prematura, ocurre cuando los ovarios de una mujer fallan antes de los 40 años. El ovario ya no produce óvulos y reduce la producción de estrógeno en mujeres menores de 40 años. Aunque ciertas exposiciones, tales como la quimioterapia o la radioterapia pélvica, y ciertas condiciones médicas pueden causar la POI, la causa a menudo no se explica.

La disfunción hipotalámica, también llamada amenorrea hipotalámica funcional (FHA), es una afección causada por el ejercicio excesivo, el estrés o el bajo peso corporal. A veces se asocia con trastornos alimentarios tales como la anorexia. Dos hormonas producidas por la glándula pituitaria son responsables de estimular la ovulación cada mes: (FSH) y la hormona luteinizante (LH). El exceso de estrés físico o emocional, un peso corporal muy alto o muy bajo, o un aumento o pérdida de peso sustancial reciente pueden interrumpir la producción de estas hormonas y afectar la ovulación. Los períodos irregulares o ausentes son los signos más comunes.

El trastorno de la ovulación también puede ser causado por hiperprolactinemia, en donde se produce demasiada prolactina. Por ejemplo, la glándula pituitaria puede causar un exceso de producción de prolactina (hiperprolactinemia), lo que reduce la producción de estrógeno y puede causar infertilidad. Normalmente relacionado con un problema de la glándula pituitaria, esto también puede ser causado por medicamentos que está tomando para otra enfermedad.

En otra realización, el trastorno de la ovulación está causado por una función inadecuada del hipotálamo y las glándulas pituitarias. El hipotálamo y las glándulas pituitarias en el cerebro producen hormonas que mantienen la función ovárica normal. La producción excesiva de la hormona prolactina por parte de la glándula pituitaria (a menudo como resultado de un tumor benigno de la glándula pituitaria) o el funcionamiento inadecuado del hipotálamo o la glándula pituitaria pueden hacer que una mujer no ovule.

Formulación farmacéutica

Si bien es posible que los compuestos de la presente invención se administren solos, se prefieren presentarlos en forma de una formulación farmacéutica.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto como se define en el presente documento para uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de la infertilidad o la reducción de la fertilidad.

Por ejemplo, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto como se define en el presente documento para uso en el tratamiento, prevención o mejora de la infertilidad o reducción de la fertilidad en un mamífero hembra.

Preferiblemente dicho individuo hembra es un mamífero hembra. El mamífero es como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, preferiblemente, dicho mamífero hembra es una hembra humana.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto como se define en el presente documento para uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno de la ovulación, tal como un trastorno de infertilidad.

El trastorno de la ovulación es como se describe en el presente documento y anteriormente.

Se prefiere que la composición farmacéutica comprenda además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y la formulación de dichos productos farmacéuticos son conocidos por los expertos en la materia.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, obleas, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser uno o más excipientes que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes humectantes, agentes desintegradores de comprimidos o un material encapsulante.

También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse, poco antes de uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, saborizantes, estabilizantes, amortiguadores, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

Los compuestos de la presente descripción pueden formularse para administración parenteral y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en

- recipientes multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, por ejemplo, soluciones en polietilenglicol acuoso. Los ejemplos de portadores, diluyentes, solventes o vehículos aceitosos o no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo), y pueden contener agentes como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y / o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización de una solución, para constituir antes de uso con un excipiente líquido adecuado, p. ej., agua estéril, libre de pirógenos.
- Preferiblemente, la formulación comprenderá aproximadamente de 0,5% a 75% en peso del principio o principios activos y el resto consistirá en excipientes farmacéuticos adecuados como se describe en esta invención.
- Las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes compuestos, cuando pueden prepararse, también están destinadas a estar cubiertas por esta invención. Estas sales serán las que sean aceptables en su aplicación para un uso farmacéutico. Con esto quiere decirse que la sal retendrá la actividad biológica del compuesto precursor y que la sal no tendrá efectos adversos o perjudiciales en su aplicación y uso en el tratamiento de enfermedades.
- Las sales farmacéuticamente aceptables se preparan de una manera estándar. Si el compuesto precursor es una base, se trata con un exceso de un ácido orgánico o inorgánico en un disolvente adecuado. Si el compuesto precursor es un ácido, se trata con una base inorgánica u orgánica en un disolvente adecuado.
- Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de una sal de metal alcalino o metal alcalinotérreo de los mismos, paralelamente, simultáneamente o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, especialmente y preferiblemente en forma de una composición farmacéutica de los mismos, ya sea por vía oral, rectal o parenteral (incluyendo la subcutánea), en una cantidad eficaz.
- Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables para su uso en la presente composición farmacéutica de la invención incluyen las obtenidas de ácidos minerales, tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como los ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, p-toluenosulfónico y arilsulfónico, por ejemplo.
- El compuesto de la presente descripción se puede formular en una amplia variedad de formulaciones para administración por vía oral.
- Para las inyecciones e infusiones, las formulaciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, por ejemplo, soluciones en polietilenglicol acuoso. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización de una solución, para constituir antes de uso con un excipiente líquido adecuado, p. ej., agua estéril, libre de pirógenos. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición de secado por congelación (liofilización) que requiera solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.
- Ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o vehículos aceitosos o no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, y pueden contener agentes como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
- Las formulaciones para inyección típicamente contendrán de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25% en peso del principio activo en solución.
- El compuesto de la presente descripción se puede formular en una amplia variedad de formulaciones para administración por vía oral. Las preparaciones en forma sólida pueden incluir polvos, comprimidos, gotas, cápsulas, obleas, pastillas para chupar y gránulos dispersables. Otras formas adecuadas para la administración por vía oral pueden incluir preparaciones en forma líquida que incluyen emulsiones, jarabes, elixires, disoluciones acuosas, suspensiones acuosas, o preparaciones en forma sólida que estén destinadas a convertirse poco antes de uso en preparaciones en forma líquida, tales como disoluciones, suspensiones y emulsiones.
- En los polvos, el vehículo es un sólido dividido en partículas finas mezclado con el componente activo en partículas finas. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y el tamaño deseados. Los vehículos

adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera con bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

5 Las gotas según la presente descripción pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles o no estériles, y pueden prepararse disolviendo el principio activo en una solución acuosa adecuada, incluyendo opcionalmente un agente bactericida. y/o agente fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, y opcionalmente incluyendo un agente tensioactivo. Los disolventes adecuados para la preparación de una disolución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

10 Las emulsiones se pueden preparar en disoluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes como lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábica. Se pueden preparar disoluciones acuosas disolviendo el componente activo en agua y añadiendo los colorantes, saborizantes, estabilizantes y agentes espesantes adecuados. Se pueden preparar suspensiones acuosas dispersando en agua el componente activo finamente dividido con material viscoso, tal como gomas sintéticas o naturales, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión bien conocidos.

15 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente terapéutico adicional. La composición farmacéutica también puede comprender una combinación de los compuestos descritos en el presente documento y anteriormente.

Formas de administración

20 Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, las formas de administración incluyen pero no se limitan a la administración oral, parenteral, enteral, rectal o bucal.

30 En un aspecto no reivindicado, la composición farmacéutica se administra o se adapta para la administración por vía enteral, parenteral o como parte de un implante de liberación sostenida. La administración parenteral puede ser por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal o intraperitoneal.

En un aspecto no reivindicado preferido, se administra la composición farmacéutica mediante o se adapta para inyección. En una realización preferida, se administra la composición farmacéutica mediante o se adapta para inyección.

35 Se aprecia que la composición farmacéutica de la presente descripción comprende al menos 30 % en peso compuesto, tal como al menos 25 % en peso de compuesto, tal como por ejemplo al menos 20 % en peso de compuesto, al menos 15 % en peso de compuesto, tal como al menos 25 % en peso de compuesto, tal como por ejemplo al menos 20 % en peso de compuesto, al menos 15 % en peso de compuesto, tal como al menos 10 % en peso de compuesto, tal como por ejemplo al menos 8 % en peso de compuesto, al menos 5 % en peso de compuesto, tal como al menos 4 % en peso de compuesto, tal como por ejemplo al menos 3 % en peso de compuesto, al menos 2 % en peso de compuesto, tal como al menos 1 % en peso de compuesto, tal como por ejemplo al menos 0,5 % en peso de compuesto o al menos 0,5 % en peso de compuesto.

40 % en peso es una abreviatura de porcentaje de peso. El compuesto es cualquier compuesto definido en el presente documento.

45 En una realización, el compuesto como se describe en el presente documento se administrará en una dosis de 1 µg/kg-30.000 µg/kg peso corporal, como 1 µg/kg-7.500 µg/kg, como 1 µg/kg-5.000 µg/kg, como 1 µg/kg-2.000 µg/kg, como 1 µg/kg-1.000 µg/kg, como 1 µg/kg-700 µg/kg, como 5 µg/kg-500 µg/kg, como 10 µg/kg a 100 µg/kg peso corporal. En otra realización, el compuesto como se describe en el presente documento se administrará en una dosis de 1 µg/kg-1.000 µg/kg peso corporal, como 1 µg/kg-500 µg/kg, como 1 µg/kg-250 µg/kg, como 1 µg/kg-100 µg/kg, como 1 µg/kg-50 µg/kg, como 1 µg/kg a 10 µg/kg peso corporal. En aún otra realización, el compuesto como se describe en el presente documento se administrará en una dosis de 10 µg/kg-30.000 µg/kg peso corporal, como 10 µg/kg-7.500 µg/kg, como 10 µg/kg-5.000 µg/kg, como 10 µg/kg-2.000 µg/kg, como 10 µg/kg-1.000 µg/kg, como 10 µg/kg-700 µg/kg, como 10 µg/kg-500 µg/kg, como 10 µg/kg a 100 µg/kg peso corporal.

50 En una realización, la administración de la composición farmacéutica como se describe en el presente documento se repite al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 veces por semana. En otra realización, la administración se repite al menos 1-3 veces por semana, tal como 2-5 veces por semana, tal como 3-6 veces por semana.

60 La composición farmacéutica de la presente invención se administra *in vitro* a los folículos primordiales de dicho individuo hembra. Por lo tanto, los folículos primordiales pueden tomarse de un individuo que los necesite, tratarse *in vitro* con al menos un compuesto de la presente invención y reinsertarse en dicho individuo hembra.

65 En una realización preferida, dicho individuo hembra es un mamífero hembra. Preferiblemente, dicho mamífero

hembra es una hembra humana.

Métodos (no reivindicados)

5 Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un método para tratar, prevenir o mejorar la infertilidad de una mujer que tiene un trastorno de la ovulación, que comprende administrar a dicha persona una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se define en el presente documento.

10 El compuesto también se puede administrar en forma de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento y anteriormente. Las formas de administración y las dosis son las descritas en el presente documento y anteriormente.

15 El trastorno de la ovulación es como se describe en el presente documento y anteriormente. En una realización, dicho trastorno de la ovulación es un trastorno de infertilidad.

Preferiblemente, dicho individuo hembra es una hembra de mamífero, tal como una hembra humana.

Ejemplos

20 Materiales y Métodos

Participantes

25 Se obtuvieron muestras de ovocitos de tejido cortical ovárico obtenido de tres pacientes que se sometieron a ovariectomía unilateral antes del tratamiento gonadotóxico por una enfermedad maligna (no relacionada con ninguna neoplasia maligna de ovario). Las pacientes eran normoovulatorias, con hormonas reproductivas normales y no habían recibido estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas. Todos los procedimientos se llevaron a cabo según las pautas y regulaciones pertinentes, y los Comités de Ética de Investigación Biomédica de la Región Central de Dinamarca y la Agencia Danesa de Protección de Datos aprobaron el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos antes de la inclusión. Los pacientes dieron su consentimiento para la investigación realizada. En sujetos sometidos a ooforectomía, se utiliza una pequeña porción de la corteza ovárica para evaluar la reserva ovárica y con fines de investigación. El tejido cortical ovárico, recolectado en un momento aleatorio del ciclo menstrual, se crioconservó y clasificó el tejido como normal mediante evaluación morfológica (Rosendahl *et al.*, 2011). Después de la crioconservación, se seleccionó aleatoriamente una pequeña pieza de corteza ovárica de cada paciente para el presente estudio. Hasta uso, la muestra cortical se almacenó en nitrógeno líquido (-196 °C), como se describió anteriormente (Andersen *et al.*, 2008).

40 Microdissección de Captura Láser (LCM).

De cada una de las tres pacientes, se realizaron los siguientes tipos de aislamiento a) grupos de ovocitos primordiales puros y b) grupos de ovocitos primarios puros.

45 Los detalles sobre el aislamiento de ARN, la preparación y secuenciación de bibliotecas, el mapeo y el análisis estadístico, la bioinformática, la qPCR y la inmunohistoquímica están disponibles en Información complementaria.

Resultados

50 Ejemplo 1

Identificación de candidatos que intervienen en el desarrollo del folículo.

55 Sólo la Trigonelina forma parte de la presente invención.

Preparación de datos y filtración de datos transcriptómicos de ovocitos

60 Los folículos se estadiaron con precisión en función de su morfología (Fig. 1A y Fig. 1B) y los ovocitos se extirparon rigurosamente utilizando LCM, lo que permitió la recolección de ovocitos puros de folículos primordiales (N=3 pacientes, n=436 ovocitos) y primarios (N=3 pacientes, n=182 ovocitos), respectivamente. Las muestras de LCM recolectadas se agruparon posteriormente en tres muestras principales para cada etapa, haciendo un total de seis muestras (dos de cada paciente), antes de la preparación de la biblioteca y la secuenciación del ARN (Fig. 1C y Fig. 2). La secuenciación de ARN generó un promedio de 77 millones de lecturas por muestra (intervalo: 64-110 millones de lecturas) que se asignó al genoma humano (hg19) (asignación promedio: 35 millones de lecturas, intervalo: 23-65 millones de lecturas), usando genes RefSeq como modelo.

Análisis de clasificación y enriquecimiento de datos de secuenciación de ARN de ovocitos de folículos primordiales y primarios

5 Se encontró un total de 1099 transcripciones expresadas significativamente en ovocitos de folículos primordiales (Tabla 1, Fig. 2), y 1046 transcripciones expresadas significativamente en ovocitos de folículos primarios (Tabla 2, Fig. 2). Usando una prueba t estricta de una muestra ($p < 0,05$) como punto de corte estadístico, se generó una lista de SSCEG para ovocitos de folículos primordiales y primarios, respectivamente, y se seleccionaron para un análisis posterior (Fig. 2).

10 El análisis SSCEG reveló 1099 transcripciones (9,22%) (ovocitos de folículos primordiales y 1046 transcripciones (10,27%) (ovocitos de folículos primarios, de los genes expresados que se expresaron de manera significativa y consistente de una manera específica de etapa en ovocitos de folículos primarios y primarios, respectivamente (Fig. 2).

15 El SSCEG de ovocitos de folículos primordiales (1099) y primarios (1046) se utilizó para identificar genes que se expresaron de manera diferencial entre los dos grupos. El análisis DEG identificó 223 genes que estaban significativamente regulados negativamente durante la transición de los ovocitos de primordiales a primarios (la expresión más alta en los ovocitos de los folículos primordiales) y 268 genes que estaban significativamente regulados positivamente (la expresión más alta en los ovocitos de los folículos primarios) (Fig. 2).

Se generó un mapa de calor de los datos de DEG FPKM para mostrar la expresión de los dos estadios celulares diferentes en los aislamientos, y la correlación entre los aislamientos por triplicado específicos de la etapa.

25 La identidad específica de los ovocitos aislados por LCM se evaluó mediante la presencia de varios transcritos específicos de ovocitos y la ausencia (o presencia escasa e inconsistente) de transcritos específicos de células de la granulosa.

30 El análisis de enriquecimiento continuo generado por IPA® de los transcriptomas se realizó en los siguientes cuatro grupos.

35 1) SSCEG en ovocitos de folículos primordiales (1099 genes) 2) SSCEG en ovocitos de folículos primarios (1046 genes). 3) DEG regulado negativamente (223) o 4) DEG regulado positivamente (268) en ovocitos durante la transición de folículo primordial a primario (Fig. 2).

40 Se empleó el software IPA® para realizar el análisis de enriquecimiento. En este análisis de enriquecimiento, se seleccionaron tres grupos de Sistemas Biológicos para analizar los transcriptomas; 1) 'Vías canónicas' 2) 'Funciones moleculares y celulares' y 3) 'Redes biológicas', y solo significativas ($p < 0,05$) se incluyen enriquecimientos en el texto.

45 En base en los datos del transcriptoma, los candidatos mencionados en las tablas 1a o 2 fueron identificados como candidatos para uso en la regulación del desarrollo del folículo al añadir un compuesto que cambia la actividad del candidato y determinar si dicho compuesto era capaz de regular la maduración del folículo, en particular, regular las transiciones primordiales a primarias de los folículos.

Tabla 1

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
Clorhidrato de Trigonelina (ácido 1-metilpiridin-1-ilo-3-carboxílico; cloruro) (Antagonista)	NFE2L2 (factor nuclear, eritroide 2 similar a 2)	promueve la maduración del folículo (Fig. 4)
3PO (3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona) (antagonista, inhibidor).	PFKFB3 6-fosfructo-2-quinasa.	promueve la maduración del folículo (Fig. 5)
Ketotifeno (4,9-dihidro-4-(1-metil-4-piper-idilideneo)-10H-benzo(4,5)ciclohepta(1,2,b)tiofeno-10-ona) (antagonista)	PDE8B (Fosfodiesterasa 8B)	inhibe la maduración del folículo (Fig. 7)
Difilina (7-(2,3-dihidroxipropil)-1,3-dimetilpurina-2,6-diona) (Antagonista)	PDE3B (Fosfodiesterasa 3B)	promueve la maduración del folículo (Fig. 9)
Ácido N-carbamil-L-glutámico (ácido (2S)-2-(carbamoilamino)pentanodioico) (antagonista)	CPS1 (carbamoil-fosfato sintasa 1)	promueve la maduración del folículo (Fig. 8)

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
Metformina (N,N-Dimetilimidicarbomiddiamida)	PRKAA1 (subunidad alfa 1 catalítica activada por AMP de proteína quinasa)	promueve la maduración del folículo (Fig. 6) (AICAR, metformina en curso)
PDGF-AA (péptido, expresado en E coli) (agonista)	PDGFRA Factor de crecimiento α derivado de plaquetas	promueve la maduración del folículo (en curso)
PF-562271 (N-metil-N-[3-[[[2-[(2-oxo-1,3-dihidroindol-5-il)amino]-5-(trifluorometil)pirimidin-4-il]amino]metil]piridin-2-il]metanosulfonamida)(Antagonista)	PTK2B (Proteína Tirosina Quinasa 2 Beta)	promueve la maduración del folículo (en curso)
CT-707 (N/A) (antagonista)		
BAY 1217389 (2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridin-3-carboxilato de metilo) (Antagonista)	TTK (proteína quinasa de doble especificidad)	promueve la maduración del folículo (en curso)
BI 836845 (anticuerpo neutralizante de ligando)(=Xentuzumab)(antagonista)	IGF2 (factor de crecimiento similar a la insulina 2)	promueve la maduración del folículo (en curso)
SF1126 ((8S,14S,17S)-14-(carboximetil)-8-(3-guanidinopropil)-17-(hidroximetil)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1-(4-(4-oxo-8-fenil-4H-cromen-2-il)morfolino-4-io)-2-oxa-7,10,13,16-tetrazaoctadecan-18-oato)	PIK3CB (subunidad beta de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa)	promueve la maduración del folículo (en curso)
Lavendustin (ácido 5-amino-((N-2,5-dihydroxibencil)-N'-2-hidroxibencil)aminosalicílico)	STIP1 (Fosfoproteína 1 inducida por estrés)	promueve la maduración del folículo (en curso)
Picropodofilina ((5R,5aR,8aS,9R)-5-hidroxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-ona) (Antagonista).	IGF1R (receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina)	promueve la maduración del folículo (en curso)
Linsitinib (3-[8-amino-1-(2-fenilquinolin-7-il)imidazo[1,5-a]pirazin-3-il]-1-metilciclobutan-1-ol) (Antagonista).		
Cixutumumab (=IMC-A12) (un anticuerpo monoclonal humano IgG1 contra el receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina) (antagonista).		
Ganitumab (Dasatinib) (N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazole-5-carboxamida) (antagonista)		
AVE1642 (Neratinib) ((E)-N-[4-[3-cloro-4-(piridin-2-ilmetoxi)anilino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida) (Antagonista)		
XL228 (4-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-N-[(3-propan-2-il-1,2-oxazol-5-il)metil]pirimidina-2,4-diamina) (Antagonista)		
BIIB022 (4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metilpiridin-2-carboxamida) (Antagonista)		

ES 3 009 460 T3

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
Dalotuzumab (4-amino-N-(1-azabicyclo[3.3.1]nonan-4-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida)(inicialmente MK-0646)(Antagonista) MM-141 ((anticuerpo) (antagonista))		
PX-866 (ácido acético (1S,4E,10R,11R,13S,14R)-[4-diallilaminometilen-6-hidroxi-1-metoximetil-10,13-dimetil-3,7,17-trioxo-1,3,4,7,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-2-oxa-ciclopenta[a]fenantren-11-il éster) Dactolisib (-metil-2-(4-(3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)fenil)propanonitrilo) Pictilisib (2-(1H-indazol-4-il)-6-(4-metanosulfonilpiperazin-1-ilmetil)-4-morfolin-4-iltieno(3,2-d)pirimidina) Buparlisib (5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)-4-(trifluorometil)piridin-2-amina)	PIK3CB (subunidad beta catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa)	promueve la maduración del folículo (en curso)
XI147 (Pilaralisib (2-amino-N-[3-({3-[(2-cloro-5-metoxifenil)amino]quinoxalin-2-il}sulfamoil)fenil]-2-m)) SAR260301 (S)-2-(2-(2-metilindolin-1-il)-2-oxoetil)-6-morfolinopirimidin-4(3H)-ona)		
Medorinona (5-metil-1H-1,6-naftiridin-2-ona) (antagonista) Cilostazol (6-[4-(1-ciclohexiltetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona) (Sigma-Aldrich) (Antagonista) Dipiridamol (2-[[2-[bis(2-hidroxietil)amino]-4,8-di(piperidin-1-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-6-il]-(2-hidroxietil)amino]ethanol) (Antagonista) Amrinona (3-amino-5-piridin-4-il-1H-piridin-2-ona) (Antagonista)	PDE3B (Fosfodiesterasa 3B)	promueve la maduración del folículo (en curso)
Tolbutamida (1-butil-3-(4-metilfenil)sulfonilurea) (Antagonista) Teofilina (1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona) (Antagonista) Pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-diona) (Antagonista)		

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
Serdemetán (1-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-4-N-piridin-4-ilbenceno-1,4-diamina) (Antagonista)	MDM2 (Doble minuto 2 de ratón, homólogo humano de; proteína de unión a P53)	promueve la maduración del folículo (en curso)
CGM097 ((1S)-1-(4-clorofenil)-6-metoxi-2-[4-[metil-[[4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil]metil]amino]fenil]-7-propan-2-iloxi-1,4-dihidroisoquinolin-3-ona) (Antagonista)		
DS-3032b (L-eritro-hexonamida, 2,6-anhidro-5-(((3'R,4'S,5'R)-6"-cloro-4'-(2-cloro-3-fluoro-4-piridinil)-1",2"-dihidro-4,4-dimetil-2"-oxodispiro(ciclohexano-1,2'-pirrolidina-3',3''-(3H)indol)-5'-il) carbonil)amino)-3,4,5-trideoxi-, 4-metilbencenosulfona) (Antagonista)		
MK-8242 (4-amino-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona) (Antagonista)		
HDM201 ((6S)-5-(5-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-oxo-3-piridinil)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxi-5-pirimidinil)-5,6-dihidro-1-(1-metiletil)-pirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona) (Antagonista)		
Idasanutlin (ácido 4-[[[(3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-D-prolil]amino}-3-metoxibenzoico) (antagonista)		
RO6839921 (N/A) (antagonista)		
RO5045337 ([[(4S,5R)-2-(4-terc-butil-2-etoxifenil)-4,5-bis(4-clorofenil)-4,5-dimetilimidazol-1-il]-[4-(3-metilsulfonilpropil)piperazin-1-il]metanona) (Antagonista)		
AMG-232 (ácido 2-[(3R,5R,6S)-5-(3-clorofenil)-6-(4-clorofenil)-3-metil-1-[(2S)-3-metil-1-propan-2-ilsulfonilbutan-2-il]-2-oxopiperidin-3-il]acético)(Antagonista)		
APG-115 (Antagonista)		
BMS-599626 ([[(3S)-morfolin-3-il]metil N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]carbamato) (antagonista)	ERBB4 (Tirosina Quinasa 4 del Receptor Erb-B2)	Promueve la maduración del folículo (en curso)
Afatinib ((E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-il]oxiquinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida)(antagonista)		
Osimertinib (N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida) (antagonista)		
Pozitotinib (1-[4-[4-(3,4-dicloro-2-fluoroanilino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxipiperidin-1-il]prop-2-en-1-ona)(antagonista)		
Pirotinib (4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[[4-piridin-3-ilpirimidin-2-il]amino]benzamida)		
Pelitinib ((E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida) (antagonista)		

Tabla 2

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
Clorhidrato de Trigonelina (ácido 1-metilpiridin-1-ilo-3-carboxílico; cloruro) (Antagonista)	NFE2L2 (factor nuclear, eritroide 2 similar a 2)	promueve la maduración del folículo (Fig. 4)
3PO (3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona (antagonista, inhibidor).	PFKFB3 6-fosfructo-2-quinasa.	promueve la maduración del folículo (Fig. 5)
Ketotifeno (4,9-dihidro-4-(1-metil-4-piperidilidendo)-10H-benzo(4,5)ciclohepta(1,2,b)tiofeno-10-ona) (antagonista)	PDE8B (Fosfodiesterasa 8B)	inhibe la maduración del folículo (Fig. 7)
Difilina (7-(2,3-dihidroxipropil)-1,3-dimetilpurina-2,6-diona) (Antagonista)	PDE3B (Fosfodiesterasa 3B)	promueve la maduración del folículo (Fig. 9)
Ácido N-carbamil-L-glutámico (ácido (2S)-2-(carbamoilamino)pentanodioico) (Antagonista)	CPS1 (Carbamoil-fosfato sintasa 1)	promueve la maduración del folículo (Fig. 8)
Metformina (N,N-Dimetilimidicarbonyldiamida)	PRKAA1 (subunidad alfa 1 catalítica activada por AMP de proteína quinasa)	promueve la maduración del folículo (Fig. 6) (AICAR, metformina en curso)
PDGF-AA (péptido, expresado en E coli) (Agonista)	PDGFRA Factor de crecimiento α derivado de plaquetas	promueve la maduración del folículo (en curso)
PF-562271 (N-metil-N-[3-[[[2-[(2-oxo-1,3-dihidroindol-5-il)amino]-5-(trifluorometil)pirimidin-4-il]amino]metil]piridin-2-il]methanesulfonamida)(Antagonista)	PTK2B (Proteína tirosina quinasa 2 Beta)	promueve la maduración del folículo (en curso)
CT-707 (N/A) (antagonista)		
BAY 1217389 (2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxilato de metilo) (Antagonista)	TTK (Proteína quinasa de doble especificidad)	promueve la maduración del folículo (en curso)
BI 836845 (anticuerpo neutralizante de ligando)(=Xentuzumab)(antagonista)	IGF2 (factor de crecimiento similar a la insulina 2)	promueve la maduración del folículo (en curso)
SF1126 ((8S,14S,17S)-14-carboximetil)-8-(3-guanidinopropil)-17-(hidroximetil)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1-(4-(4-oxo-8-fenil-4H-cromen-2-il)morfolino-4-ilo)-2-oxa-7,10,13,16-tetraazaoctadecan-18-oato)	PIK3CB (Subunidad beta catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa)	promueve la maduración del folículo (en curso)
Lavendustin (ácido 5-amino-((N-2,5-dihidroxibencil)-N'-2-hidroxibencil)aminosalicílico)	STIP1 (Fosfoproteína inducida por estrés)	promueve la maduración del folículo (en curso)

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
<p>Picropodofilina ((5R,5aR,8aS,9R)-5-hidroxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-ona) (Antagonista).</p> <p>Linsitinib (3-[8-amino-1-(2-fenilquinolin-7-il)imidazo[1,5-a]pirazin-3-il]-1-metilciclobutan-1-ol) (Antagonista).</p> <p>Cixutumumab (=IMC-A12) (un anticuerpo monoclonal humano IgG1 contra el receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina) (Antagonista).</p> <p>Ganitumab (Dasatinib) (N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-il]amino]-1,3-tiazole-5-carboxamida) (antagonista)</p> <p>AVE1642 (Neratinib) ((E)-N-[4-[3-cloro-4-(piridin-2-ilmetoxi)anilino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida) (Antagonista)</p> <p>XL228 (4-N-(5-ciclopropil-1H-pirazol-3-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-N-[(3-propan-2-il-1,2-oxazol-5-il)metil]pirimidina-2,4-diamina) (Antagonista)</p> <p>BIB022 (4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metilpiridin-2-carboxamida) (Antagonista)</p> <p>Dalotuzumab (4-amino-N-(1-azabicyclo[3.3.1]nonan-4-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida)(inicialmente MK-0646)(Antagonista)</p>	<p>IGF1R (Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina)</p>	<p>promueve la maduración del folículo (en curso)</p>
MM-141 ((anticuerpo) (antagonista))		
<p>PX-866 (ácido acético (1S,4E,10R,11R,13S,14R)-[4-diallilaminometil-6-hidroxi-1-metoximetil-10,13-dimetil-3,7,17-trioxo-1,3,4,7,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-2-oxa-ciclopenta[a]fenantren-11-il éster)</p> <p>Dactolisib (-metil-2-(4-(3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)fenil)propanonitrilo)</p> <p>Pictilisib (2-(1H-indazol-4-il)-6-(4-metanosulfonilpiperazin-1-ilmetil)-4-morfolin-4-iltieno(3,2-d)pirimidina)</p> <p>Buparlisib (5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)-4-(trifluorometil)piridin-2-amina)</p> <p>XI147 (Pilaralisib (2-amino-N-[3-({3-[(2-cloro-5-metoxifenil)amino]quinoxalin-2-il}sulfamoil)fenil]-2-m))</p> <p>SAR260301 (S)-2-(2-(2-metilindolin-1-il)-2-oxoetil)-6-morfolinopirimidin-4(3H)-ona)</p>	<p>PIK3CB (Subunidad beta de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa)</p>	<p>promueve la maduración del folículo (en curso)</p>

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
<p>Medorinona (5-metil-1H-1,6-naftiridin-2-ona) (antagonista)</p> <p>Cilostazol (6-[4-(1-ciclohexiltetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona) (Sigma-Aldrich) (Antagonista)</p> <p>Dipiridamol (2-[[2-[bis(2-hidroxi)etil]amino]-4,8-di(piperidin-1-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-6-il]-(2-hidroxi)etil]amino]ethanol) (Antagonista)</p> <p>Amrinona (3-amino-5-piridin-4-il-1H-piridin-2-ona) (Antagonista)</p> <p>Tolbutamida (1-butil-3-(4-metilfenil)sulfonilurea) (Antagonista)</p> <p>Teofilina (1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona) (Antagonista)</p>	PDE3B (Fosfodiesterasa)	promueve la maduración del folículo (en curso)
<p>Pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-diona) (Antagonista)</p>		
<p>Serdemetán (1-N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-4-N-piridin-4-ilbenzo-1,4-diamina) (Antagonista)</p> <p>CGM097 ((1S)-1-(4-clorofenil)-6-metoxi-2-[4-[metil-[[4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil]metil]amino]fenil]-7-propan-2-iloxi-1,4-dihidroisoquinolin-3-ona) (Antagonista)</p> <p>DS-3032b (L-eritro-hexonamida, 2,6-anhidro-5-(((3'R,4'S,5'R)-6"-cloro-4'-(2-cloro-3-fluoro-4-piridinil)-1",2"-dihidro-4,4-dimetil-2"-oxodispiro(ciclohexano-1,2'-pirrolidina-3',3''-(3H)indol)-5'-il) carbonil)amino)-3,4,5-trideoxi-, 4-metilbencenosulfona) (Antagonista)</p> <p>MK-8242 (4-amino-1-[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona) (Antagonista)</p> <p>HDM201 ((6S)-5-(5-cloro-1,2-dihidro-1-metil-2-oxo-3-piridinil)-6-(4-clorofenil)-2-(2,4-dimetoxi-5-pirimidinil)-5,6-dihidro-1-(1-metiletil)-pirrolo[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona) (Antagonista)</p> <p>Idasanutin (ácido 4-[[[(3S,4R,5S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-4-(4-cloro-2-fluorofenil)-4-ciano-5-(2,2-dimetilpropil)-D-prolil]amino}-3-metoxibenzoico) (antagonista)</p> <p>RO6839921 (N/A) (antagonista)</p> <p>RO5045337 (([4S,5R)-2-(4-terc-butil-2-etoxifenil)-4,5-bis(4-clorofenil)-4,5-dimetilimidazol-1-il]-[4-(3-metilsulfonilpropil)piperazin-1-il]metanona) (Antagonista)</p>	MDM2 (Doble minuto 2 de ratón, homólogo humano de; proteína de unión a P53)	promueve la maduración del folículo (en curso)
<p>AMG-232 (ácido 2-[(3R,5R,6S)-5-(3-clorofenil)-6-(4-clorofenil)-3-metil-1-[(2S)-3-metil-1-propan-2-il]sulfonilbutan-2-il]-2-oxopiperidin-3-il]acético)(Antagonista)</p> <p>APG-115 (Antagonista)</p>		

Compuesto	Diana (proteína)	Efecto
BMS-599626 ([[(3S)-morfolin-3-il]metil N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]carbamato) (antagonista)	ERBB4 (Tirosina quinasa 4 del receptor Erb-B2)	promueve la maduración del folículo (en curso)
Afatinib ((E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-il]oxiquinazolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida)(antagonista)		
Osimertinib (N-[2-[2-(dimetilamino)etil-metilamino]-4-metoxi-5-[[4-(1-metilindol-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil]prop-2-enamida) (antagonista)		
Pozitotinib (1-[4-[4-(3,4-dicloro-2-fluoroanilino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxipiperidin-1-il]prop-2-en-1-ona)(antagonista)		
Pirotinib (4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometilo)fenil]-3-[4-piridin-3-ilpirimidin-2-il]amino]benzamida)		
Pelitinib ((E)-N-[4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida) (antagonista)		

Ejemplo 2:

Materiales y métodos

5

Cultivos de ovarios

10 Los ovarios obtenidos de ratones se lavaron dos veces con medio de cultivo. Los antagonistas o agonistas a ensayar se disolvieron en disolventes adecuados y se añadieron al medio. Como medio de control que comprende disolvente se utilizó el antagonista o agonista. Uno de los ovarios se cultivó en medio control y otro se cultivó con el antagonista o agonista. Los antagonistas o agonistas probados y sus concentraciones se describen en la tabla 2.

15 Los ovarios se incubaron con antagonista a 37°C y 5% CO₂ durante 24 y 96 horas, respectivamente (véase tabla 3).

Tabla 3:

Antagonista o agonista	Sustrato	Concentración de antagonista/agonista	Tiempo de incubación
AICAR	Activador de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)	1mM	96 horas
Dorsomorfina 3PO	Inhibidor de AMPK inhibidor de 6-fosfructo-2-quinasa	5 µM 30 µM	96 horas 96 horas
PDGF-AA (Sigma)	Agonista del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA)	10 ng/mL	96 horas
PDE8B	ketotifeno	85nM	96 horas
CPS1	Ácido N-Carbamil-L-glutámico	10mM	96 horas
NFE2L2	Clorhidrato de trigonelina	1,0 µM	96 horas

20 Los ovarios de los cultivos se fijaron, se incluyeron en parafina y se miraron al microscopio en rodajas. Los ovarios seccionados se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar la morfología del ovario por microscopía.

Análisis histológico y clasificación de folículos

Se determinó el número de folículos primordiales, primarios y secundarios, y se determinó si el antagonista o agonista era capaz de regular la foliculogénesis.

3PO -un inhibidor de PFKFB3 que

5 El inhibidor de PFKFB3 3PO (30 μ M) se añadió al medio y los ovarios se cultivaron en él durante cuatro días. Para el análisis estadístico solo se contaron los folículos sanos. Los ovarios cultivados con 3PO contenían 63,11 \pm 8,83% de folículos primordiales, mientras que los ovarios de control contenían 76,15 \pm 5,81%, lo que resulta en una disminución significativa en los folículos primordiales ($P=0,01282$) cuando se trata con 3PO. Los ovarios de control tenían 13,50 \pm 4,02 % de folículos primarios y los ovarios tratados con 3PO tenían 26,60 \pm 11,24 % de folículos primarios. La diferencia entre los dos grupos de folículos primarios fue significativamente diferente ($P=0,022794$). Los ovarios tratados con 3PO contenían 11,58 \pm 9,07 % de folículos secundarios y los ovarios de control contenían 10,35 \pm 2,89 % de folículos secundarios. La distribución de folículos se ilustra en la Figura 3B.

15 AICAR - activador de AMPK

20 Para investigar los efectos de AICAR en la transición del folículo primordial a primario in vitro, se cultivaron ovarios en medio que contenía AICAR 1 mM (Figura 4A) o ddH₂O (apéndice 14) durante cuatro días. Se observó que los ovarios cultivados en medio con AICAR contenían 86,02 \pm 5,84 % de folículos primordiales mientras que los ovarios no tratados solo contenían 68,25 \pm 5,965 % de folículos primordiales, por lo que la incubación con AICAR da como resultado una diferencia significativa en el número de folículos primordiales ($P=0,00022$). También hubo diferencia significativa en el número de folículos primarios en ovarios amenazados con o sin AICAR ($P=0,00428$), ya que los ovarios tratados con AICAR solo contenían 10,82 \pm 4,98 % de folículos primarios frente a los ovarios no tratados que contenían 20,90 \pm 4,52 % de folículos primarios. Además, se observó que solo el 3,0 \pm 3,09% de todos los folículos se caracterizaron de forma secundaria cuando se trataron con AICAR, mientras que el 10,73 \pm 2,92% se caracterizaron de forma secundaria en el medio de control, diferencia que es significativa ($P=0,00122$). La distribución del folículo se presenta en la Figura 4B.

30 Dorsomorfina

35 Para verificar si la inhibición de AMPK podría estar involucrada en la transición del folículo primordial a primario, se añadió dorsomorfina 5 μ M al medio y se incubó durante cuatro días (figura 15A y apéndice 16). El medio de control estaba contaminado, por lo que los resultados de los ovarios tratados con dorsomorfina se comparan con los resultados ilustrados en la figura 7. Los ovarios tratados con dorsomorfina contenían 71,32 \pm 5,50 % de folículos primordiales mientras que los ovarios de control contenían 76,15 \pm 4,02 % de folículos primordiales; diferencia entre los dos grupos no es significativa ($P=0,1694$). El número de folículos primarios tampoco es significativo ($P=0,74224$), ya que los ovarios tratados con dorsomorfina contienen 12,78 \pm 2,23 % de folículos primarios y los ovarios no tratados contienen 13,495 \pm 4,02 % de folículos primarios. Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre el número de folículos secundarios ($P=0,00938$), ya que los ovarios tratados con dorsomorfina contenían 15,87 \pm 3,06 % de folículos secundarios y los ovarios no tratados contenían 10,35 \pm 2,89%. La distribución de folículos se ilustra en la Figura 5B.

45 Ketotifeno - un inhibidor de la PDE8B

El estudio del transcriptoma discutido en el Ejemplo 1 muestra que PDE8B estaba regulado positivamente y, por lo tanto, tenía una expresión más alta en los folículos primarios que en los folículos primordiales.

50 PDE8B es el gen que codifica la proteína fosfodiesterasa 8B. Los ovarios se cultivaron con ketotifeno 85 nM durante 96 horas. Posteriormente se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se tiñeron con H&E en secciones de 5 μ m. Nuestro análisis mostró una diferencia significativa ($P<0,05$) entre el grupo tratado (Ketotifeno) y el grupo control (Figura 6). Cuando se trataron los ovarios con el inhibidor de la PDE8B, hubo aproximadamente 9% más folículos primordiales ($P=0,029$), 44% menos folículos primarios y 65% menos folículos secundarios ($P=0,019$).

55 Ácido N-Carbamoil-L-glutámico - regula positivamente la actividad de CPS1

60 El estudio del transcriptoma descrito en el Ejemplo 1 muestra que el gen de la carbamoil-fosfato sintasa 1 (*CPS1*) está regulado negativamente. El gen *CPS1* tuvo una mayor expresión en los folículos primordiales en comparación con los folículos primarios. Se añadió ácido N-carbamoil-L-glutámico (NCG) al medio en una concentración de 10 mM. La Figura 7 demuestra que los folículos estaban muy bien formados y los ovocitos estaban intactos cuando se trataron con NCG en comparación con otros tratamientos (Figura 7).

65 Clorhidrato de Trigonelina - un inhibidor de Nrf2

Se indica que el factor nuclear, el gen eritroide 2 similar a 2 (NFE2L2 o Nrf2) está regulado positivamente en

los folículos primarios según el estudio del transcriptoma descrito en el Ejemplo 1. Los ovarios se cultivaron durante 96 horas en medio suplementado con clorhidrato de Trigonelina 1,0 μM . La Figura 11 muestra los ovarios tratados con medio de clorhidrato de Trigonelina y medio de control después de la tinción H&E. El análisis estadístico mostró que hubo una disminución significativa ($\sim 20\%$) en el número promedio de folículos primordiales ($P=9,9 \cdot 10^{-4}$) y un aumento significativo ($\sim 74\%$) en comparación con el control ($P=9,5 \cdot 10^{-4}$) (véase Figura 9).

Ejemplo 3

10 Métodos

Animales

15 Se alojaron y criaron ratones híbridos C57BL/6jxCBA F1 (Janvier Labs, Francia) en las instalaciones para animales del Departamento de Biomedicina de la Universidad de Aarhus. Los animales fueron alojados en un ambiente controlado de luz-oscuridad 12:12 h y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Para el estudio se utilizaron cachorros hembras de 7 días de edad.

Aislamiento de ovarios y cultivo de órganos

20 Se sacrificaron las crías y se extirparon los ovarios. Usando un estereomicroscopio MZ75 (Leica Microsystems, Alemania), se eliminó el exceso de tejido. Durante la disección, los ovarios se mantuvieron a 37°C en medio de cultivo: αMEM (Thermo Fisher) suplementado con 10% FBS (Thermo Fisher), 100 mIU/mL de FSH (Sigma-Aldrich), 100 IU/mL penicilina (Thermo Fisher), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomycin (Thermo Fisher) y 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Thermo Fisher). Los ovarios aislados se transfirieron a insertos de pocillos (membrana de PET ThinCert, tamaño de poro de 0,4 μm ; Greiner bio-one) en placas de 24 pocillos (placas de cultivo celular tratadas con cultivo de tejidos; Costar). Se agregaron 200-300 μL de medio de cultivo al pocillo debajo del inserto y se colocaron hasta dos ovarios en la membrana de cada inserto. El medio de cultivo se complementó con diferentes concentraciones de los compuestos ensayados; bpV(HOPic) (Sigma-Aldrich), Temsirolimus (Sigma-Aldrich), Ketotifeno (Sigma-Aldrich), 3PO (Sigma-Aldrich), Dorsomorfin (Sigma-Aldrich), AICAR (Sigma-Aldrich), NCG (Sigma-Aldrich), y Difilina (Cayman Chemical). Se usaron hasta seis pozos en la placa de 24 pozos para insertos. Se añadió dH_2O estéril al resto de los pocillos para asegurar la humedad y reducir la evaporación. Los ovarios se cultivaron a 37°C , 5% CO_2 durante cuatro días. Se reemplazaron 150 μl de medio cada dos días con medio de cultivo fresco.

35 Análisis histológico y recuento de folículos

40 Los ovarios mantenidos en cultivo de órganos durante cuatro días se fijaron durante 24 horas en solución de paraformaldehído al 4% a 4°C . Después de la fijación, los ovarios se deshidrataron en series de etanol utilizando etanol al 70%, 96% y 99,9%. Se usó xileno como agente de limpieza antes de infiltrar los ovarios en cera de parafina. Se cortaron secciones de 5 μm de muestras en parafina utilizando un micrótopo (Cut 6062, SLEE medical, Alemania). Las secciones de parafina se montaron en portaobjetos de vidrio, la parafina se fundió a 60°C y las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina (usando protocolos estándar).

45 Las muestras se desparafinizaron incubando en xileno durante 2x 15 min. y posteriormente rehidratado en serie de etanol; 3 x 2 min. en etanol al 99,9%, 2 min. en etanol al 96% y 2 min. en etanol al 70%. A continuación, las muestras se enjuagaron con dH_2O , se tiñeron con hematoxilina durante 40 segundos, se enjuagaron con dH_2O durante 5 minutos y se tiñeron con eosina durante 46 s. Las muestras se deshidrataron en etanol: 2x 2 min. en etanol al 96 %, 2 x 2 min en etanol al 99,9 % y finalmente aclarado en xileno durante al menos 30 min antes de montar las muestras utilizando medio de montaje Eukitt (Sigma-Aldrich) y cubreobjetos.

55 El número de folículos en cada etapa de desarrollo se contó utilizando un microscopio de investigación invertido (DMI4000B, Leica Microsystems, Alemania). Se contaron los folículos de cada 3^a a 4^a sección de cada ovario y se determinó la distribución de folículos en los diferentes estadios en porcentaje. Cada tratamiento se repitió en al menos tres repeticiones biológicas. Solo se contaron los folículos con un núcleo de ovocito visible. Los folículos se clasificaron en primordiales, primarios y secundarios. Brevemente, los folículos primordiales consisten en un ovocito encapsulado por células de la granulosa escamosas aplanadas. Los folículos primarios son ovocitos encapsulados por una capa de células de la granulosa cuboidales y los folículos secundarios consisten en ovocitos encapsulados por más de una capa de células de la granulosa cuboidales.

60 Análisis estadístico

65 Se promediaron los porcentajes de folículos en las diferentes etapas de cada repetición biológica. Al comparar dos grupos, se realizó una prueba t no pareada. Se realizó ANOVA unidireccional seguido de la determinación de la significación estadística utilizando el método de Holm-Sidak cuando se compararon más de dos grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0,05$. Las estadísticas se calcularon con la ayuda de

GraphPad Prism (versión 7.00 GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

Resultados

5 Usando el ratón como nuestro sistema modelo experimental, hemos optimizado un sistema *in vitro* muy robusto y confiable para probar los compuestos por su capacidad para activar, o inhibir, los ovocitos de los folículos primordiales y, posteriormente, evaluar la distribución de los folículos primarios y secundarios (Fig. 9A), Tenemos excelentes pruebas de punto final para abordar funcionalmente si la calidad de las células se mantiene lo suficientemente bien como para que el ovocito sea fertilizado. Una vez que se selecciona un compuesto para pruebas adicionales, los folículos individuales se rizarán en un gel 3D (Fig. 9B), y los ovocitos maduros resultantes se someterán a fertilización *in vitro* y se transferirán nuevamente a un ratón hembra, para evaluar su potencial para formar un embrión (Fig. 9B).

15 Como experiencias de control, apuntamos a la vía PI3K/PTEN/Akt, el bpV(HOpic) inhibidor de PTEN, un inhibidor de bisperoxovanadio que ha demostrado tener un efecto aparente sobre la activación del folículo primordial^{13,18-20}. Además, nos enfocamos en la vía mTOR/Tsc mediante la inhibición de mTORC1 utilizando el análogo de rapamicina Temsirolimus (C₅₆H₈₇NO₁₆) con el objetivo de disminuir la activación del folículo, ya que la rapamicina parece tener un efecto antagonista sobre la activación del folículo primordial²¹. Mediante el uso de estos dos antagonistas, establecimos un sistema que nos permite manipular la tasa de transición de primordial a primaria, así como disminuir la tasa de transición de primordial a primaria.

Compuestos de control.

25 Para establecer el sistema de detección *in vitro*, probamos nuestro sistema utilizando dos compuestos conocidos que inducen e inhiben la activación del folículo primordial, respectivamente. Para dirigirse a la vía PI3K/PTEN/Akt, se eligió el bpV(HOpic) inhibidor de PTEN. Se ha demostrado que este inhibidor tiene un efecto aparente sobre la activación del folículo primordial^{13,18-20}. Nuestro análisis del transcriptoma sugirió que la vía PI3K/AKT/PTEN se expresa diferencialmente, lo que hizo de PTEN un gran objetivo de control. Para dirigirse a la vía mTOR/Tsc, se utilizó la inhibición de mTORC1 con el análogo de rapamicina temsirolimus con el objetivo de disminuir la activación del folículo, ya que la rapamicina parece tener un efecto antagonista sobre la activación del folículo primordial²¹.

bpV(HOpic)

35 Estudios bioquímicos y de manipulación genética en ratones han identificado la vía de señalización PI3K-AKT como un mecanismo clave implicado en el mantenimiento del crecimiento y la pérdida de folículos¹³. La vía se invierte por la acción de PTEN que provoca la desfosforilación de PIP3, regulando así el inicio del crecimiento del folículo y previniendo el agotamiento prematuro de la reserva de folículos.

40 El inhibidor de PTEN bpV(HOpic) es un inhibidor de bisperoxovanadio que afecta la activación del folículo primordial¹³ al inhibir la vía PI3K/PTEN/Akt. Utilizando bpV(HOpic), demostramos que el sistema *in vitro* nos permite manipular el aumento de la tasa de transición de primordial a primario (Fig. 10A)

Temsirolimus

45 La inhibición de mTORC1 utilizando el análogo de rapamicina Temsirolimus (C₅₆H₈₇NO₁₆) inhibe la vía mTOR/Tsc y, por lo tanto, disminuye la activación del folículo, ya que la rapamicina parece tener un efecto antagonista sobre la activación del folículo primordial²¹. Mediante el uso de Temsirolimus, demostramos que el sistema nos permite manipular una disminución de la tasa de transición primordial a primaria (Fig. 10B).

NRF2

55 NRF2 es un factor de transcripción que aumenta la expresión de una batería de genes para combatir el estrés oxidativo y electrofílico. Bajo condiciones sin estrés, NRF2 forma un complejo que conduce a su degradación. Tras la exposición a una variedad de factores estresantes, incluyendo ROS, sustancias tóxicas y carcinógenos, NRF2 se libera y se traslada al núcleo y se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de varios genes. Utilizamos Trigonelina inhibidor de NRF2 en nuestro sistema de cultivo *in vitro* de ovario. El valor médico de Trigonelina es muy alto y ya está clínicamente aprobado para otras afecciones, como la disminución de los niveles de glucosa en sangre, y posee actividades anticancerígenas, antimigrañosas, hipocolesterolémicas y antidiabéticas. Llevamos a cabo un intervalo de titulación de las concentraciones de Trigonelina (Fig. 11A) y monitorizamos la apariencia morfológica (Fig. 11B). Encontramos que la mayoría de las concentraciones de Trigonelina causaron una disminución significativa de los folículos primordiales en comparación con los grupos de control (Fig. 11A)

65 3PO

Además, probamos 3PO (Sigma-Aldrich) (antagonista, inhibidor), antagonista de molécula pequeña 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona que es un inhibidor potente y selectivo de PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa), y encontró que los ovarios cultivados con 3PO contenían $63,11 \pm 8,83\%$ de folículos primordiales, mientras que los ovarios de control contenían $76,15 \pm 5,81\%$, lo que resulta en una
5 disminución significativa en los folículos primordiales ($p=0,01282$) cuando se trata con 3PO (Fig. 12).

AMPK

Probamos AICAR (Sigma-Aldrich), un activador de AMPK. Los ovarios aislados de ratones juveniles F1 se
10 cultivaron *in vitro* durante cuatro días en medio de control (0 mM AICAR) o medio que contenía diferentes concentraciones de AICAR: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 1 mM para determinar la concentración óptima para ovarios para ser incubados con AICAR. AICAR es un activador de AMPK, y planteamos la hipótesis de que la activación de AMPK mantendría más folículos primordiales en latencia. Sin embargo, los folículos en crecimiento dentro del ovario tendían a parecer poco saludables y los ovocitos no podían mantener una
15 estructura redonda, sin embargo, la distribución de folículos se contó de todos modos.

Los ovarios *in vitro* se cultivaron en medio que contenía 1 mM de AICAR y se encontró que la incubación de los ovarios cultivados en medio con AICAR contenía $86,02 \pm 5,84\%$ de folículos primordiales, mientras que los ovarios no tratados solo contenían $68,25 \pm 5,965\%$ de folículos primordiales, por lo que la incubación con
20 AICAR da como resultado una diferencia significativa en el número de folículos primordiales ($P=0,00022$). También hubo diferencia significativa en el número de folículos primarios en ovarios amenazados con o sin AICAR ($P=0,00428$), ya que los ovarios tratados con AICAR solo contenían $10,82 \pm 4,98\%$ de folículos primarios frente a los ovarios no tratados que contenían $20,90 \pm 4,52\%$ de folículos primarios. Además, se observó que solo el $3,0 \pm 3,09\%$ de todos los folículos se caracterizaron de forma secundaria cuando se trataron
25 con AICAR, mientras que el $10,73 \pm 2,92\%$ se caracterizaron de forma secundaria en el medio de control, una diferencia que es significativa ($P=0,00122$) (Fig. 13).

También probamos una concentración más baja. También probamos una concentración más baja. Los ovarios cultivados con 0,5 mM de AICAR contenían $83,83 \pm 3,06\%$ ($n=1$) lo que significa que 0,5 mM de AICAR también
30 fueron capaces de inhibir significativamente la activación de los folículos primordiales ($P=0,0079$) (datos no mostrados), sin embargo, la concentración todavía parecía demasiado dura para los folículos en crecimiento.

Ahora estamos en proceso de probar la metformina, como alternativa, un activador de AMPK.

35 PDE8B

PDE8B es el gen que codifica la proteína fosfodiesterasa 8B (PDE8B). Se ha demostrado previamente que *PDE8B* junto con otros genes de fosfodiesterasa están presentes en el ovario humano (Petersen et al.
40 2015; Guillemette et al. 2009). Las fosfodiesterasas son enzimas que degradan el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). El cAMP se produce como resultado de la activación del receptor de la pareja de proteína G (GPCR) por la adenilato ciclasa. Tanto la FSH como la LH se unen a los GPCR, lo que lleva a la formación de cAMP. El cAMP es un segundo mensajero importante y los estudios indicaron que aumentó el crecimiento folicular y la expresión del gen KL en las células de la granulosa cuando se cultivaron chips de ovario humano con 8-bromo-cAMP (Zhang et al. 2004). Por lo tanto, se teorizó que la inhibición de PDE8B conduciría a un mayor crecimiento de folículos debido al aumento de cAMP intracelular. Contrariamente a esta hipótesis, Conti et al. (2002) describe cómo los niveles altos de cAMP dentro del ovocito pueden inhibir la reanudación meiótica de los ovocitos al mantener la fosfoquinasa A en un estado activo. Teorizaron que la alta concentración de cAMP intraovocitos puede ser producida por el transporte de cAMP desde las células de la granulosa a través de las uniones comunicantes. Esto se postuló porque se descubrió que la inhibición de la PDE3A (PDE en los ovocitos) prevenía la maduración de los ovocitos, mientras que los inhibidores de la PDE4 (PDE en las células de la granulosa) conducían a la continuación de la maduración de los ovocitos en los ovarios de ratón (Conti et al. 2002). Guillemette et al. (2009) demostraron que la inhibición de PDE8 en las células del cúmulo aumentaba el cAMP en el complejo cúmulo-ovocitos, lo que provocaba un retraso en la maduración de los ovocitos en los ovarios bovinos.
50

Como objetivo de PDE8B, usamos ketotifeno. Ovarios cultivados durante 96 horas con ketotifeno 85 nM. Posteriormente se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se tiñeron con H&E en secciones de 5 μ m. Nuestro análisis mostró una diferencia significativa ($P<0,05$) entre el grupo tratado (Ketotifeno) y su grupo de control (que recibió medio suplementado con ddH₂O) (Fig. 14). Cuando se trataron los ovarios con el inhibidor de PDE8B, hubo aproximadamente 9% más folículos primordiales ($P=0,029$), 44% menos folículos primarios y 65% menos folículos secundarios ($P=0,019$) (Fig. 14)
60

CPS1

65 CPS1 es una enzima importante para el ciclo de la urea que cataliza la primera reacción: la conversión de amonio en fosfato de carbamoilo. Se ha sugerido que la acumulación de amonio en el líquido folicular y la

alteración del perfil de expresión génica se asociaron con una reserva ovárica reducida y una edad materna avanzada Pacella-ince et al. (2014). Los niveles de amonio se utilizaron como marcador de la actividad de CPS1 y su estudio indicó que las mujeres con reserva ovárica reducida y edad materna avanzada tenían un aumento en los niveles de amonio, por lo tanto, una disminución en la actividad de CPS1 (Pacella-ince et al. 2014). Según este informe (Pacella-ince et al. 2014), sería interesante probar cómo la protección contra la escisión proteolítica y otros factores degradantes de CPS1 afectarían a nuestros ovarios cultivados *in vitro*.

Se ha informado que el ácido N-carbamoil-L-glutámico (NCG) protege a la CPS1 humana contra la escisión proteolítica (Diez-Fernandez et al. 2013). Se añadió NCG al medio de cultivo de ovario en una concentración de 10, 20 y 30 μM . Esto reveló que NCG tiene el potencial de activar la distribución de folículos primordiales (Fig. 15).

PDE3B

La fosfodiesterasa-3 (PDE3) es una de las principales PDE hidrolizantes de cAMP en los ovocitos ²⁴. Analizamos el potencial de la PDE3B para manipular la distribución de folículos mediante el uso de Dyphilline. Se añadió difilina al medio de cultivo de ovario en una concentración de 10 y 100 μM . Esto reveló que la difilina tiene el potencial de activar la distribución de folículos primordiales (Fig. 16), aunque el número analizado todavía es demasiado pequeño para realizar pruebas estadísticas.

Discusión

El impacto potencial de los resultados presentados en nuestra comprensión de la latencia, activación e integridad del folículo humano se analiza a continuación.

NRF2

NRF2 es un regulador de sustancias potencialmente tóxicas. Como se informó en la Sección 4.3.3, los ratones nulos *Nrf2* tratados con una toxina ovárica mostraron un desarrollo folicular acelerado (Hu et al. 2006). El estudio actual también indica que Nrf2 es importante para mantener la latencia de los folículos. Se observó una disminución significativa en la distribución de folículos primordiales y un aumento significativo en la distribución de folículos primordiales en los ovarios tratados con el inhibidor de Nrf2 en comparación con el control. Como Hu et al. (2006) plantearon la hipótesis de que un aumento en el desarrollo folicular podría deberse a una expresión de *Foxo3a* reducida. De hecho, los ratones nulos *NFE2L2* mostraron *Foxo3a* significativamente reducido (Hu et al. 2006). Las investigaciones de la interacción entre la vía mTORC1 y la actividad de Nrf2 serían un tema interesante.

PFKFB3

PFKFB3 es importante para la regulación de la glucólisis en el citoplasma, pero también para el control del ciclo celular en el núcleo. PFKFB3 convierte la fructosa-6-fosfato (F6P) en fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), que a su vez activa la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1) y la glucólisis en el citoplasma, sin embargo, en el núcleo F2,6BP activa Cdk1. Cdk1 es un jugador central en la progresión del ciclo celular. F2,6BP estimula la fosforilación de p27 mediada por Cdk en la treonina 187, lo que a su vez da como resultado la ubiquitinación de p27 y la degradación del proteasoma. Se ha demostrado que un antagonista de molécula pequeña 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona (3PO) de PFKFB3 aumenta la proteína p27 no fosforilada ²⁸.

Los ovarios tratados con 3PO generalmente contenían menos folículos que los vistos anteriormente, además, varios de los folículos parecían atrésicos. A pesar de esta mala base, se contaron los folículos sanos y el resultado reveló que 3PO podía promover la transición de primordial a primaria. Previamente, Sugiura (2004) dio a entender que los ovocitos regulan la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico en los GC, proporcionando así apoyo nutricional para los ovocitos. Además, Boland (1994) determinó que los folículos utilizan predominantemente la glucólisis para la producción de energía, y también se requiere la glucólisis folicular para el crecimiento y la secreción de estradiol. Este conocimiento indica que la inhibición de la glucólisis es adversa, por lo que se debe utilizar otro método para investigar el efecto de la 3PO en el ovocito.

PRKAA1

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es un sensor del estado energético celular y está compuesta por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras: β y γ . En los mamíferos, la subunidad catalítica está codificada por dos genes alternativos: PRKAA1, PRKAA2. Según los datos transcriptómicos, PRKAA1 se expresa en gran medida en los folículos primordiales y el análisis IPA [®] determinó que estaba involucrado con la vía mTOR. La AMPK se activa por estrés metabólico y compuestos xenobióticos que dan como resultado un desequilibrio del estado energético celular causado por un aumento en el ADP celular. ATP y/o relaciones AMP: ATP. Una vez activada, la AMPK activa las vías catabólicas que generan ATP, al tiempo que desactiva las vías biosintéticas y la progresión del ciclo celular, con el deseo de restaurar la homeostasis energética

celular. Una vez que se activa la AMPK, desencadenará efectos agudos en el metabolismo, por ejemplo, la AMPK activada inhibe la síntesis de proteínas de dos maneras, primero por la fosforilación de TSC2, segundo por la fosforilación directa de Raptor, una subunidad del complejo mTORC1, ambas acciones resultan en la inactivación de mTORC1. Además, AMPK también activa la glucólisis en monocitos y macrófagos mediante la fosforilación y activación de PFKFB3. Esto puede permitir que los macrófagos generen ATP eficientemente en regiones de infecciones o lesiones que son hipóxicas. Dado que los datos transcriptómicos revelaron que la expresión de PFKFB3 estaba altamente regulada en los ovocitos primordiales, este factor puede ser relevante. Además de estos efectos agudos sobre el metabolismo, la AMPK también tiene efectos sobre la transcripción. AMPK fosforila directamente Foxo3, activando la transcripción de muchos genes, incluyendo los genes implicados en la resistencia al estrés oxidativo y el metabolismo energético. Otros efectos de la activación de AMPK provocan la fosforilación de p27 que provoca la detención del ciclo celular³¹. Los resultados indican que AICAR pudo suprimir la transición de folículo primordial a primario, ya que los ovarios tratados con AICAR contenían más folículos primordiales, así como menos folículos primarios y secundarios, probablemente debido a una mayor o menor activación de Foxo3/p27 y mTORC1, respectivamente.

15 PDE

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) desempeñan funciones críticas en la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares (monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y monofosfato de guanosina cíclico (cGMP)) y la compartimentación a través de la degradación de los nucleótidos cíclicos^{32,33}. La fosfodiesterasa-3 (PDE3) es la principal PDE que hidroliza el cAMP presente en las VSMC y los ovocitos, y su inhibición por la acumulación de cGMP inducida por óxido nítrico da como resultado un aumento de la actividad del cAMP y la proteína quinasa A (PKA)^{32,34,35}. cAMP y cGMP son dos segundos mensajeros muy importantes que intervienen en la transducción de señales intracelulares en muchos tipos de células, incluidos los ovocitos³⁶⁻³⁸. Los ovocitos con deficiencia de PDE3A presentan una detención del ciclo celular en fase G₂/M porque aumentó cAMP/PKA la señalización en ovocitos KO probablemente inhibe la defosforilación/activación de Cdc2 catalizada por Cdc25B (factor promotor de la maduración (MPF)), un regulador clave de la transición²⁴ de G₂/M.

30 PDE3B

No se ha informado un rol para PDE3B. En nuestros datos, encontramos que la orientación antagonista de PDE3B resultó en la activación de los folículos primordiales, lo que sugiere que la difilina es un objetivo potencial para la regulación de los folículos primordiales ováricos.

35 PDE8B

Guillemette et al. (2009) demostraron que la inhibición de PDE8 en las células del cúmulo aumentaba el cAMP en el complejo cúmulo-ovocitos, lo que provocaba un retraso en la maduración de los ovocitos en los ovarios bovinos. Nuestros resultados mostraron significativamente más folículos primordiales cuando los ovarios fueron tratados con el inhibidor de PDE8B, lo que sugiere que el ketotifeno es un compuesto potencial para la conservación de los folículos primordiales.

45 CPS1

Los niveles de amoníaco parecen estar elevados en mujeres con reserva ovárica reducida y edad materna avanzada (Pacella-ince et al. 2014). Esto indica una disminución de la desintoxicación en estas mujeres. Debido a que CPS1 es parte de la degradación del amoníaco, podría tener un efecto beneficioso para inducir CPS1 en mujeres con reserva ovárica reducida o edad materna avanzada. Desafortunadamente, no pudimos obtener ningún resultado estadístico de los ovarios tratados con un NCG "protector" de CPS1 porque el protocolo de deshidratación de los ovarios no estaba completamente establecido. Sin embargo, los ovocitos parecían tener una forma más natural que cualquiera de las otras formas de tratamiento. Esto podría deberse a un aumento en la supervivencia. Por lo tanto, se necesitará más investigación sobre el efecto de CPS1 para probar nuestra hipótesis.

55 Se descubrió que tanto CPS1 como Nrf2 son reguladores del entorno intracelular y la homeostasis. Sería fascinante estudiar el papel de estas moléculas en mujeres con reserva ovárica reducida y POI. De hecho, las investigaciones de Venkatesh et al. (2010) indican que altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) están presentes en mujeres con POI. La investigación futura puede querer investigar el nivel de ROS cuando se usa un "protector" CPS1 o un inhibidor Nrf2.

Listado de secuencias

65 SEQ ID NO: 1

PDGF-AA (péptido, expresado en E. coli)

ES 3 009 460 T3

MSIEEAVPAV CKTRTVIYEI PRSQVDPTSA NFLIWPPCVE VKRCTGCCNT
SSVKCQPSRV HHRSVKVAKV EYVRKKPKLK EVQVRLEEHL ECACATSNLN
PDHREEETGR RRESGKNRKR KRLKPT

REIVINDICACIONES

- 5 1. Trigonelina para su uso en un método de tratamiento de la infertilidad o fertilidad reducida en un individuo hembra, en donde dicho método comprende tomar folículos primordiales de dicho individuo, tratar dichos folículos in vitro con trigonelina y reinsertarlos en dicho individuo.
- 10 2. La trigonelina para uso según la reivindicación 1, en donde la trigonelina es clorhidrato de trigonelina (cloruro de ácido 1-metilpiridin-1-*io*-3-carboxílico).
- 10 3. La trigonelina para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha trigonelina promueve la maduración del folículo.
- 15 4. La trigonelina para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha trigonelina estimula la transición primordial a primaria de los folículos.
- 15 5. La trigonelina para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho individuo es un ser humano.
- 20 6. La trigonelina para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha infertilidad o fertilidad reducida está influenciada por un trastorno de la ovulación.
7. La trigonelina para uso según la reivindicación 6, en donde dicho trastorno de la ovulación se selecciona del grupo que consiste en síndrome de ovario poliquístico (PCOS), insuficiencia ovárica prematura (POI), disfunción hipotalámica y menopausia prematura.

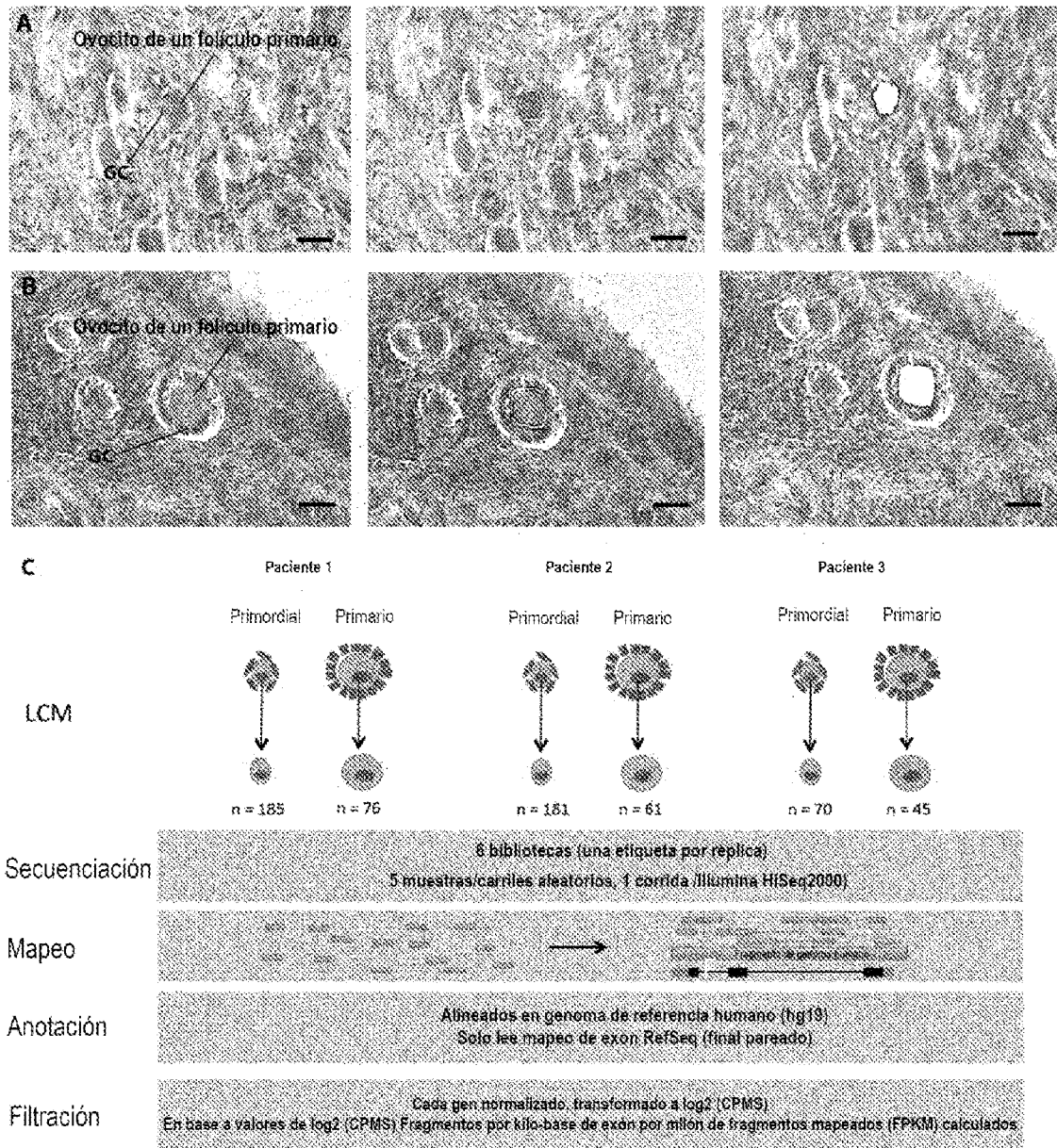


Figura 1

Figura 2

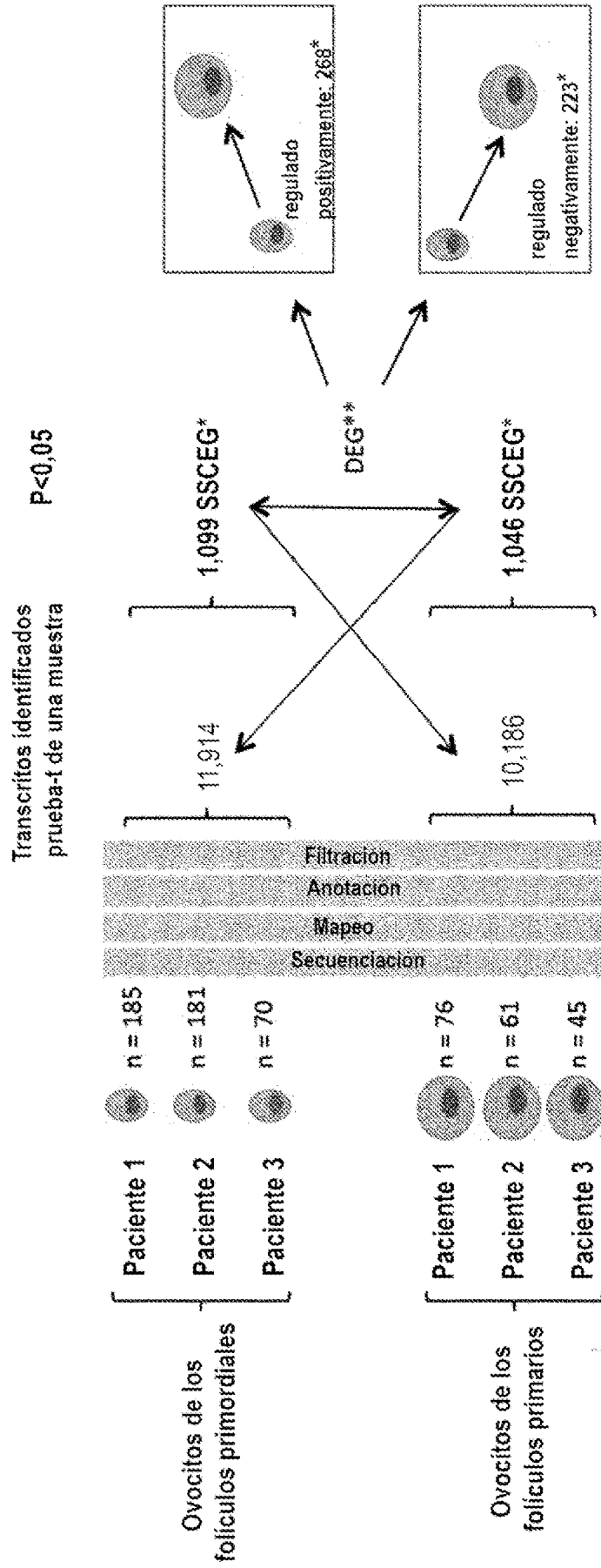


Figura 3

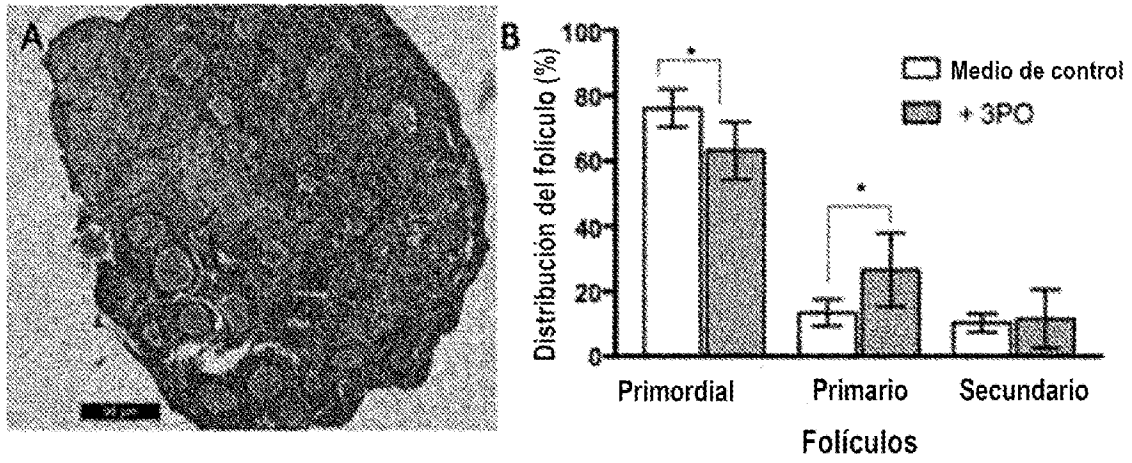


Figura 4

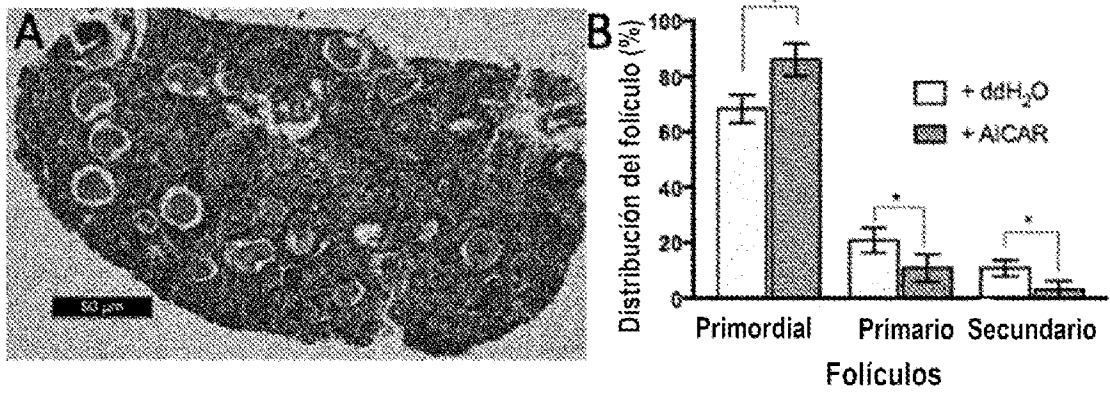


Figura 5

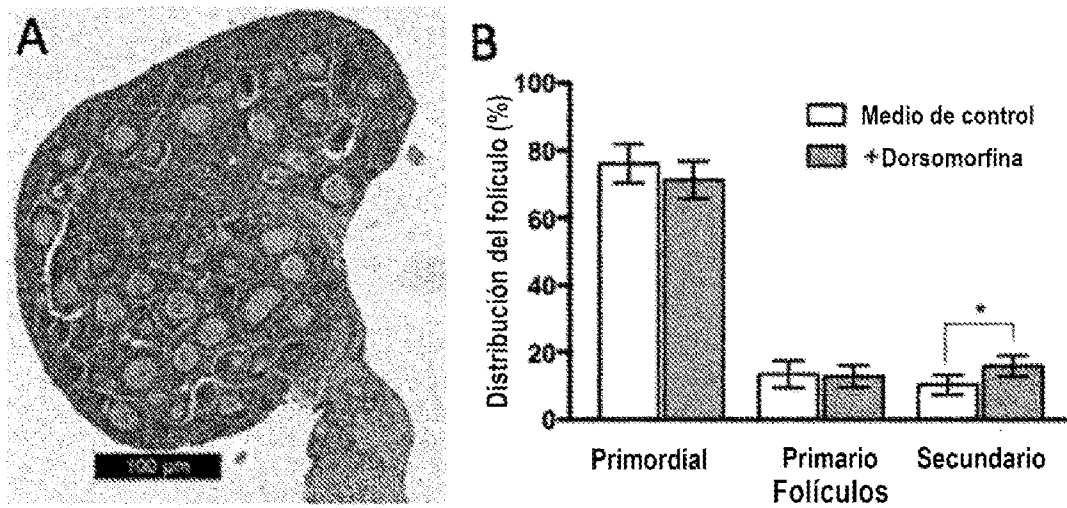


Figura 6

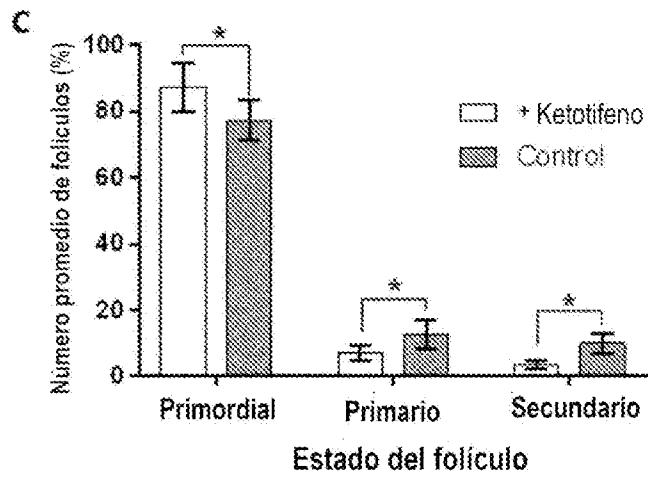
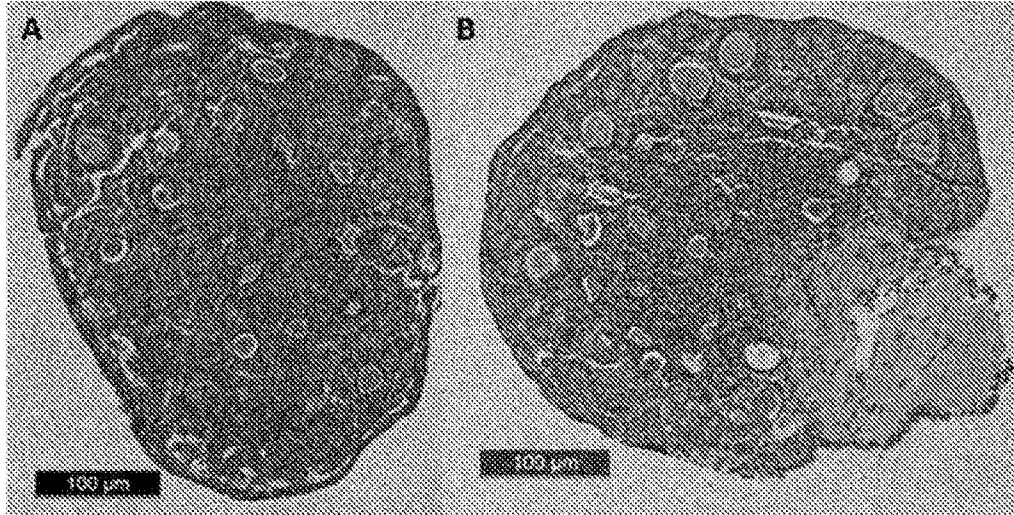


Figura 7

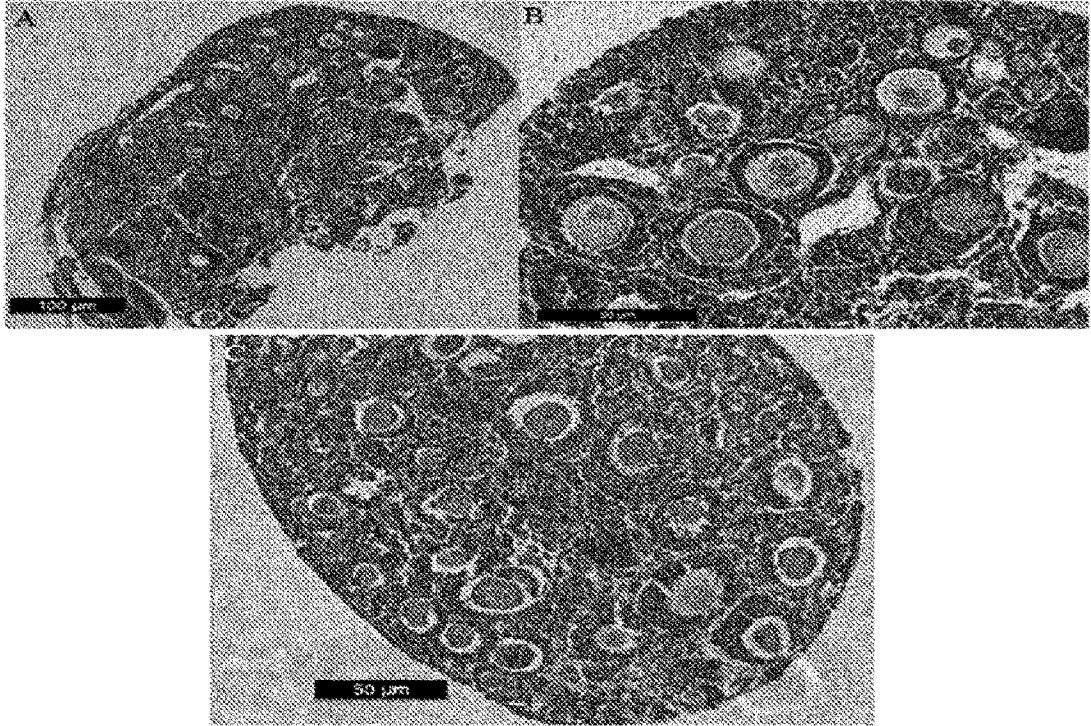


Figura 8

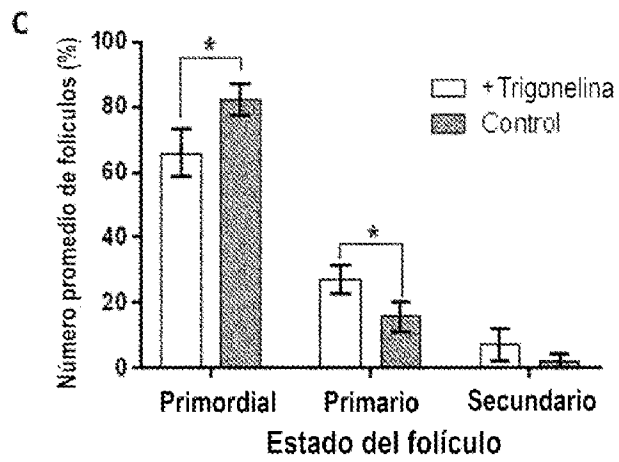
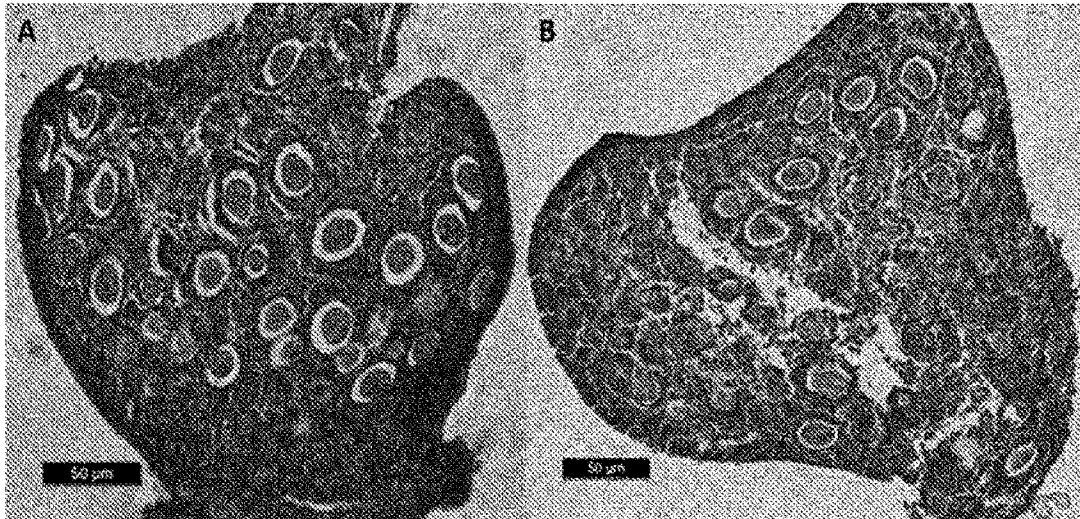


Figura 9

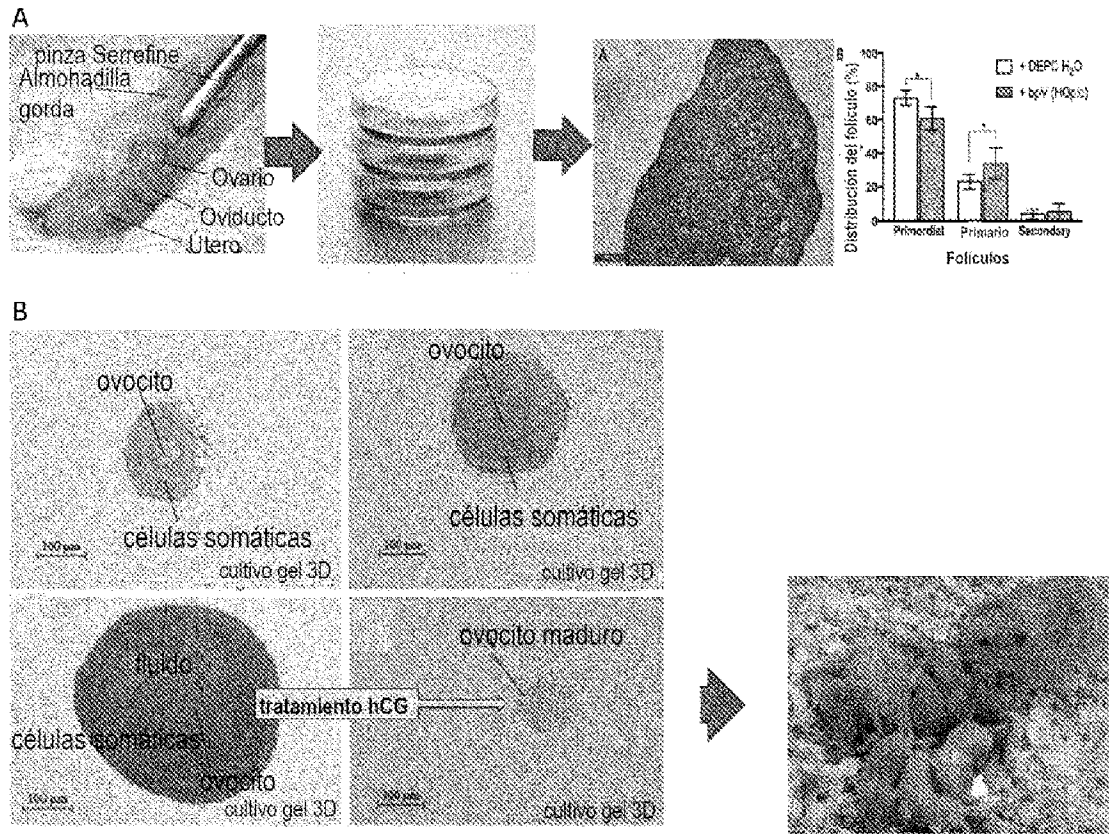


Figura 10

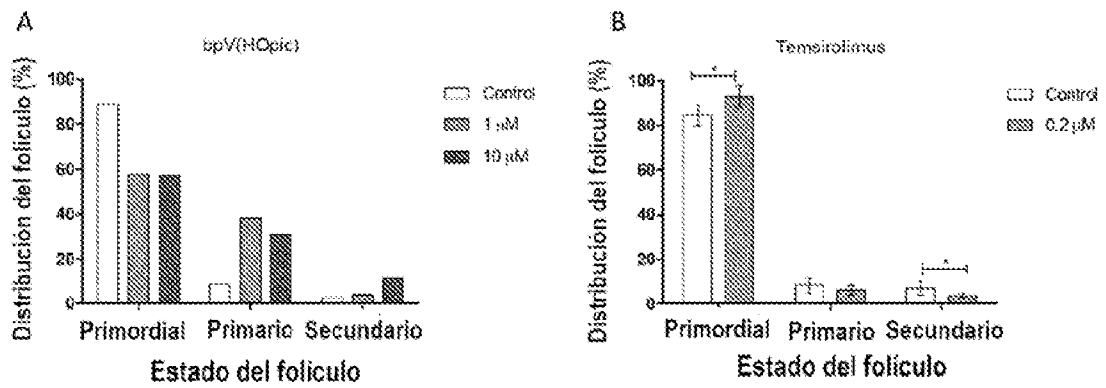


Figura 11

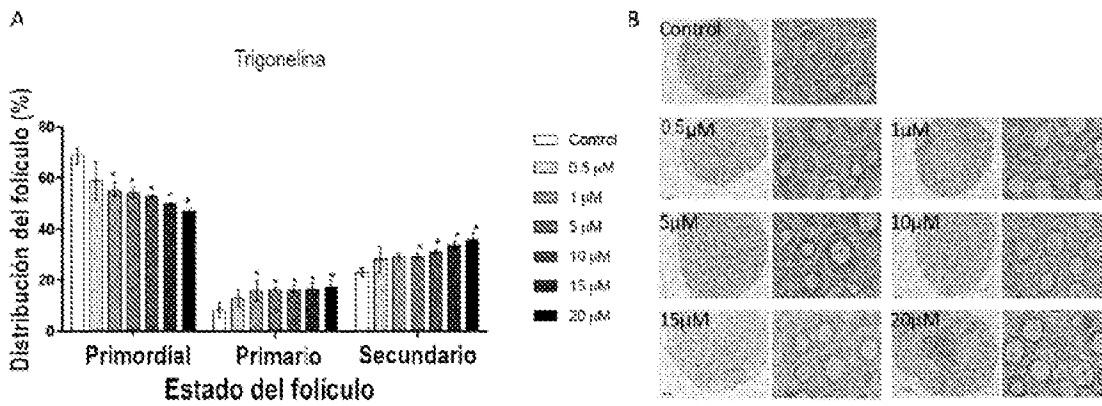


Figura 12

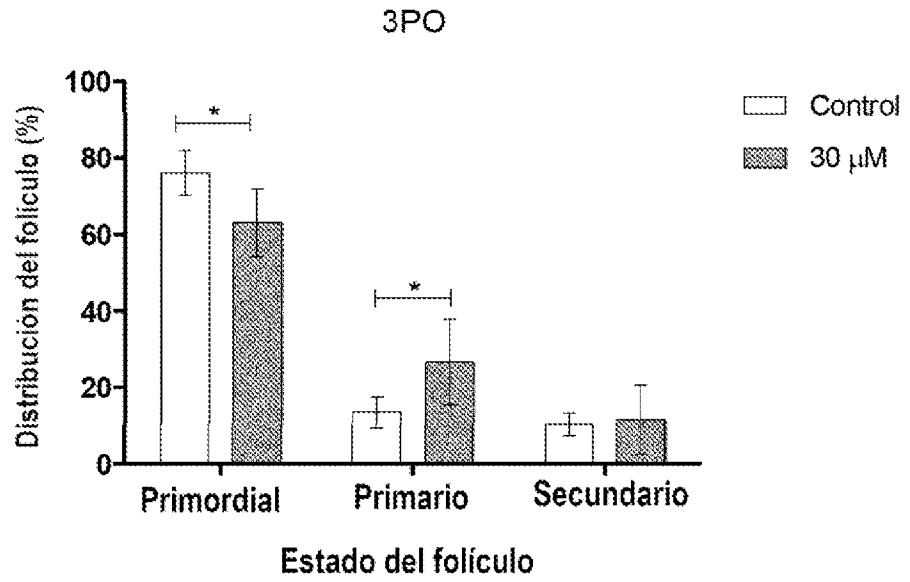


Figura 13

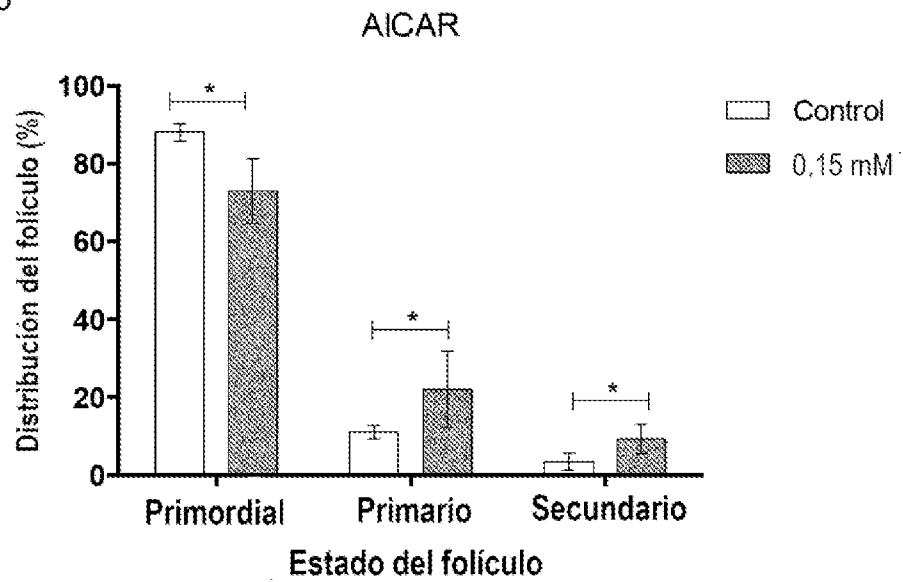


Figura 14

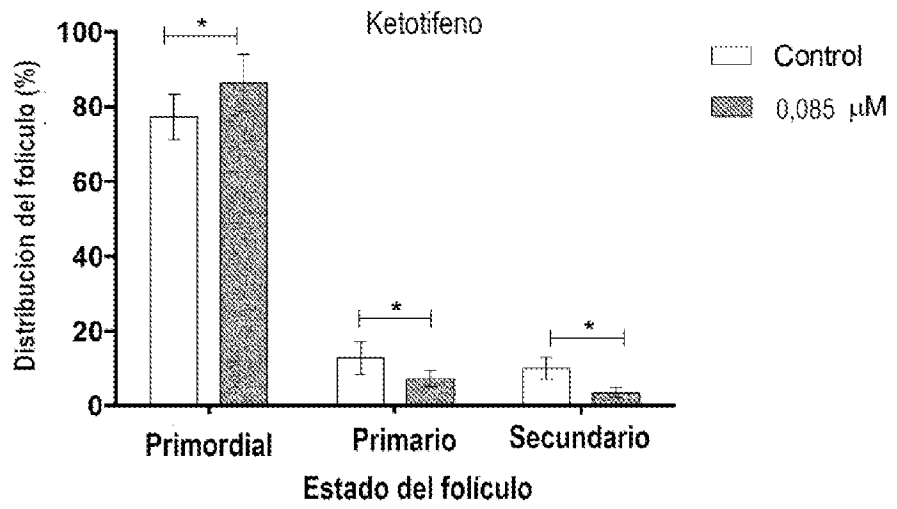


Figura 15

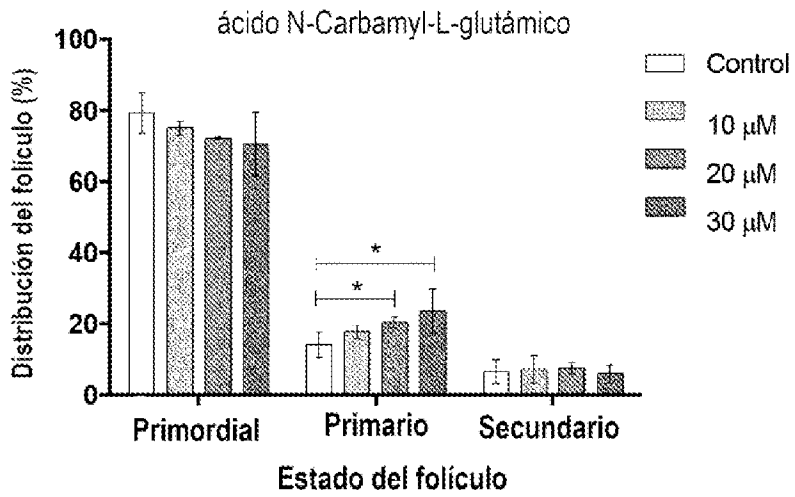


Figura 16

