

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 920 753**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6881 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2014 PCT/EP2014/053164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14125129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2014 E 14707352 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2022 EP 2956552**

54 Título: **Genes marcadores para la competencia de los ovocitos**

30 Prioridad:

18.02.2013 EP 13155633

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

09.08.2022

73 Titular/es:

**VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (100.0%)
Pleinlaan 2
1050 Brussel, BE**

72 Inventor/es:

**SMITZ, JOHAN;
WATHLET, SANDRA y
ADRIAENSSENS, TOM**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 920 753 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

Genes marcadores para la competencia de los ovocitos

5 Campo de la invención

La expresión génica de las células del cúmulo (CC) se está explorando como un método adicional a la puntuación morfológica para elegir el embrión con la mayor probabilidad de embarazo. La presente invención se refiere a un método novedoso para identificar genes biomarcadores para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero en dar lugar a un embarazo viable después de la fecundación, en base a el uso de nacidos vivos y el desarrollo embrionario como criterios de valoración para los ovocitos que se usarán en un análisis a nivel de exones de posibles genes biomarcadores. La invención proporciona además genes biomarcadores expresados en las CC así identificados, así como también modelos de pronóstico basados en los genes biomarcadores identificados mediante el uso de los métodos de la presente invención.

15 Antecedentes de la invención

La transferencia de un solo embrión (SET) es el tratamiento preferido para limitar los embarazos múltiples después de las ART. Para no comprometer la tasa de gestación, la selección del embrión para la transferencia en el primer ciclo se vuelve aún más importante. Además del criterio existente en base a la morfología, actualmente se están investigando otros métodos. El uso de medidas cuantitativas de expresión génica en células del cúmulo (CC), que están en estrecho contacto con el ovocito durante el crecimiento y la maduración, parece un método prometedor (Huang y Wells 2010). Desde el primer estudio publicado sobre el tema donde la expresión de las CC podría estar relacionada con el desarrollo embrionario (McKenzie y otros 2004), otros diversos estudios han investigado esta posibilidad y tratan de relacionar la expresión de las CC con diferentes criterios de valoración. Los ejemplos de criterios de valoración investigados son: desarrollo embrionario (Anderson y otros 2009; Cillo y otros 2007; Feuerstein y otros 2007; Hasegawa y otros 2005; Van Montfoort y otros 2008; Zhang y otros 2005), estadio de aneuploidía del ovocito (Fragouli y otros 2012b), etapa de madurez nuclear del ovocito (Ouandaogo y otros 2011) y probablemente el más importante desde la perspectiva del paciente: el resultado del embarazo (Assidi y otros 2011; Asou y otros 2008; Gebhardt y otros 2011; Wathlet y otros 2012; Wathlet y otros 2011).

Wathlet y otros 2012, describe un método para evaluar la competencia de los ovocitos de mamíferos mediante la determinación de los niveles de expresión génica. Bitton y otros 2008 y Pohl y otros 2009, se dirigen a la determinación a nivel de exones mediante el uso del análisis de micromatrices/affymetrix.

La confirmación de los resultados entre diferentes estudios no parece obvia en el análisis de la expresión génica de las CC. En la literatura actual no se encontraron en común muchos genes en diferentes estudios. Por ejemplo, la hialuronano sintasa 2 (*HAS2*) se expresó más en embriones de buena calidad en comparación con embriones de baja morfología en dos estudios (Cillo y otros 2007; McKenzie y otros 2004), pero no pudo relacionarse con la morfología del embrión en otros dos estudios (Anderson y otros 2009; Gebhardt y otros 2011). Las divergencias pueden deberse a un diseño experimental diferente, con diferentes criterios de valoración, pero la expresión génica puede estar influenciada por factores conocidos, tales como el protocolo de estimulación de los pacientes (Adriaenssens y otros 2009; Adriaenssen y otros 2010; Grondahl y otros 2009) o factores aún no evaluados tales como los medios de cultivo usados en los diferentes laboratorios de IVF.

En este estudio, se analizaron retrospectivamente 47 complejos de cúmulos individuales de 47 pacientes con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QPCR). Mediante el uso del conjunto de muestras actual, se validó el poder predictivo de un modelo de predicción de embarazo de un estudio anterior (Wathlet y otros 2012). En una siguiente etapa, en un intento de buscar nuevos genes con mayor poder predictivo, se construyeron nuevos modelos multiparamétricos al considerar los 3 genes (efrina-B2 (EFNB2), proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina ID (CAMK1D), estanniocalcina 1 (STC1)) descritos anteriormente, y múltiples genes novedosos y variantes de corte y empalme de dichos genes en modelos matemáticos para predecir la competencia de los ovocitos (ver Tablas).

Nuestro conjunto de muestras de pacientes permitió un análisis nunca antes informado en la literatura: Se analizaron las CC de ovocitos que no resultaron en embarazo en el ciclo de transferencia en fresco y las CC de sus ovocitos hermanos que resultaron en embarazo después de un ciclo de transferencia de embriones congelados (FRET) (análisis intrapaciente). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que compara las CC de embarazo y en ausencia de embarazo del mismo ciclo de recuperación en un entorno de SET como se haría en una aplicación clínica final.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Resumen de las muestras usadas en este estudio.
Esta figura representa la distribución de las muestras usadas para los diferentes análisis realizados en este estudio. Los campos de fondo gris delimitan las muestras que se usaron para los análisis específicos que están

marcados en el lado izquierdo del campo. SET: transferencia de un solo embrión; FRET: ciclo de transferencia de embriones congelados; rFSH: hormona estimulante del folículo recombinante. ^a:(Wathlet y otros 2012).

A: Análisis de embarazo (interpacientes)

- Validación del modelo de embarazo de un estudio anterior ^a (EFNB2, CAMK1D y STC1)
- prueba t analiza embarazo contra ausencia de embarazo
- Construcción de un nuevo modelo de embarazo con nuevos genes

B: Análisis de embarazo (intrapacientes)

- Prueba t pareada de embarazo contra ausencia de embarazo
- Comprobación de los modelos multiparamétricos encontrados en los análisis interpacientes

Figura 2: prueba t de valores de expresión génica normalizados de muestras de células del cúmulo relacionadas con ausencia de embarazo contra nacidos vivos.

Los gráficos representan las diferencias en la expresión génica entre las muestras de células del cúmulo asociadas a un ovocito que después del tratamiento de fecundación *in vitro* resultó en un nacido vivo (n=19) o no (n=28). La normalización se hizo para la media de B2M y UBC. Dado que se probaron múltiples genes, la corrección de Bonferroni nos permitió considerar solo los valores de $P < 0,0042$ como significativos. El intervalo total de expresiones encontradas se representa mediante cajas y bigotes que representan respectivamente los dos cuartiles interior y exterior con la mediana en el centro.

Figura 3: Curva característica operativa del receptor (ROC) de los 3 modelos de embarazo.

Se construyeron modelos multiparamétricos para predecir la posibilidad de embarazo que incluyen los niveles de expresión génica medidos en muestras de células del cúmulo asociadas a un ovocito que después del tratamiento de fecundación *in vitro* resultó en un nacido vivo o no. Para el Modelo 3, se incluyeron además las características del ciclo y del paciente (de la Tabla 3). El Modelo 1 estaba limitado a 3 genes y está compuesto por EFNB2, PGR y GSTA4. En el Modelo 2, todos los genes se permitieron en el modelo siempre que pudieran mejorar el modelo. Se retuvieron cinco genes para el Modelo 2: EFNB2, PGR, GSTA4, GTS3, GPX3. Para tratar de mejorar el Modelo 2, en el Modelo 3 se permitieron las características del paciente y del ciclo en el modelo si podían mejorar el valor de P del modelo: EFNB2, PGR, GSTA4, GTS3, GPX3, edad, E2 Relativo y número de días de estimulación ovárica. Las áreas respectivas bajo la curva son 0,79, 0,89 y 0,90. E2 Relativo: Valor de E2 medido el día de hCG sobre el número de complejos de cumulus oophorus.

Figura 4: Prueba t pareada para el análisis intrapaciente de embarazo contra ausencia de embarazo.

Los gráficos comparan para cada paciente la expresión génica de un complejo del cúmulo que correspondía a un ovocito que no resultó en embarazo con uno que resultó en embarazo en un ciclo posterior de transferencia de un solo embrión congelado. Por paciente, los ovocitos se originan de un ciclo de recuperación. Una paciente tuvo 2 ciclos congelados consecutivos, el primero sin resultado de embarazo. Un color representa a un paciente. Las líneas discontinuas muestran (solo en los gráficos con una tendencia principal: hacia arriba o hacia abajo de ausencia de embarazo con respecto a embarazo con $P < 0,1$) los pares que no siguen la tendencia principal. Esos pares están marcados además con ^a en la Tabla 7.

Figura 5: El modelo más sólido obtenido con el análisis intrapaciente predictivo de embarazo, AUC=Área bajo la curva. Fórmula: para predecir la probabilidad de embarazo= $3,23 + 2,57 * EFNB2 + 1,87 * NCOA7$ $p = 0,0127$. (un valor de al menos 0,5 se refiere a un embarazo, un valor más bajo a ausencia de embarazo)

Figura 6: Uno de los modelos más sólidos obtenidos con el análisis interpacientes después del pretratamiento con rFSH y el antagonista de GnRH, predictivo de embarazo, AUC=Área bajo la curva. Fórmula: Embarazo = $-1,36999 + 1,79393 * \text{exón 9 de CAMK1D} + 0,89385 * \text{HSPH1 exón 2} - 0,73763 * NCOA7$ (un valor positivo se refiere a un embarazo, un valor negativo a ausencia de embarazo)

Figura 7: Uno de los modelos más sólidos obtenidos con el análisis interpacientes después del pretratamiento con HP-hMG y el antagonista de GnRH, predictivo de embarazo, AUC=Área bajo la curva. Fórmula: Embarazo = $0,46786 + 0,90886 * SASH1 - 0,2264 * \text{exón 1 de CAMK1D}$ (un valor positivo se refiere a un embarazo, un valor negativo a ausencia de embarazo)

Resumen de la invención

La presente solicitud se dirige a un método para detectar un gen biomarcador o su variante de corte y empalme, para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o a conducir a la fecundación; dicho método comprende

- usar como criterio de valoración de la selección los nacidos vivos o el desarrollo del embrión para los ovocitos que se van a usar;
- hacer un análisis a nivel de exones de la expresión génica en un experimento de micromatriz de una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito;
- realizar una comparación intrapaciente de dicho análisis a nivel de exones de la expresión génica; y
- considerar solo los valores de $p < 0,05$ en una prueba t pareada como significativos para un gen biomarcador capaz de evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/ o para conducir a la fecundación.

En un ejemplo alternativo, un gen se considera un gen biomarcador al evaluar la competencia de un ovocito en caso de expresión diferencial de dicho análisis génico a nivel de exones, en donde dicha expresión diferencial es al menos 20 % diferente de la expresión a nivel de exones de dicho gen en control o patrón de referencia.

En comparación con métodos existentes, el método de la presente invención difiere en el criterio de valoración de la selección para los ovocitos, en el análisis a nivel de exones de los genes y en la comparación intrapaciente. El uso de nacidos vivos y el desarrollo del embrión como criterios de valoración de la selección de los ovocitos que se usarán en la identificación de genes biomarcadores, realmente diferencia los resultados del presente hallazgo respecto a la técnica en la que otros criterios de valoración se han usado, denominados además "criterios de valoración intermedios", como la calidad embrionaria basada en la morfología, fecundación o el desarrollo de blastocistos. La relevancia de los criterios de valoración intermedios para la competencia total de los ovocitos es limitada, ya que, por ejemplo, los ovocitos con una buena capacidad de desarrollo embrionario (basada en la morfología) en el día 3 solo resultarán en un embarazo en 33 % de los casos. En consecuencia, la elección del criterio de valoración adecuado ha sido clave para llegar al conjunto actual de genes biomarcadores que se ha demostrado que proporcionan valores predictivos positivos (PPV) y valores predictivos negativos (NPV) de al menos 60 %.

Otra característica diferenciadora se basa en el hecho de que la selección de genes se basó en una comparación intrapaciente. Al hacer, por ejemplo, un análisis retrospectivo de células del cúmulo de pacientes que quedaron embarazadas o no, los datos estarán sesgados por la variación entre pacientes que influye en la expresión de los genes. Los niveles de expresión génica de las células del cúmulo están influenciados por: las características específicas de la paciente (por ejemplo, edad, IMC, pretratamiento), la calidad del ovocito y la expresión de otros genes (Adriaenssens y otros 2010). La competencia de un ovocito se determina además por la capacidad de tener éxito en diferentes procesos. Al usar muestras intrapaciente en su lugar, se suprime dicha variabilidad interpacientes, lo que se suma a la identificación de los genes biomarcadores de la presente invención, que muestra que son genes aplicables que pueden usarse para la predicción de nacidos vivos para pacientes con diferentes tratamientos previos.

Finalmente, el análisis de expresión génica de ovocitos se realiza como un análisis a nivel de exones. Como se demuestra en los ejemplos en lo adelante, esto se sumó al poder de resolución de los modelos predictivos. Cuando se demostró que la expresión general de algunos de los genes no fue predictiva, observar el nivel de expresión de los exones dentro de estos genes demostró tener un valor predictivo. Al observar la expresión general de un gen, algunas de las señales asociadas a nivel de exones se nivelarán con la posible pérdida de marcadores interesantes.

Mediante el uso del método anterior, se ha obtenido una lista mínima de genes biomarcadores predictivos, y se presenta en la Tabla 13 en la presente descripción más abajo. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona el método anterior en donde el análisis a nivel de exones de la expresión génica se realiza en los genes de la Tabla 13. Esta lista de genes debe verse como una reserva de genes marcadores de competencia de ovocitos, que pueden usarse en análisis multiparamétricos para seleccionar las combinaciones de genes independientes con la mayor capacidad de predicción de nacidos vivos. Como se demuestra en los ejemplos siguientes, los presentes inventores aplicaron con éxito combinaciones de estos genes en modelos predictivos de competencia de ovocitos, después de diferentes tipos de tratamiento con tecnología de reproducción asistida (ART).

Así, en otro ejemplo, la presente solicitud proporciona un método para detectar un modelo de combinación de genes biomarcadores o variantes de corte y empalme mediante el uso de la expresión génica de células del cúmulo a partir de ovocitos en un experimento de selección que comprende:

- a. Detectar al menos 2 genes biomarcadores identificados mediante el uso del método anterior;
- b. Usar una prueba t bilateral para evaluar la correlación de las combinaciones de expresión génica de biomarcadores de dichos al menos 2 genes biomarcadores con la capacidad de los ovocitos para nacer vivos, y retener combinaciones de dichos al menos 2 genes biomarcadores con un valor de corte de Tipo I $p < 0,05$ como modelo para predecir la competencia de un ovocito de mamífero para ser capaz de nacer vivo o para evaluar el desarrollo in vitro de embriones o blastocistos;
- c. Realizar un análisis de regresión multiparamétrico paso a paso para establecer si las variantes de corte y empalme de dichos al menos 2 biomarcadores tienen un valor de p de tipo III $< 0,3$ y añadir dicha variante de corte y empalme al modelo retenido en la etapa b; y
- d. Determinar el valor de p general del modelo que comprende las variantes de corte y empalme de la etapa c, y retener dichas variantes de corte y empalme en dicho modelo cuando el valor de p general se reduce aún más.

Como es evidente a partir de los ejemplos siguientes, en un ejemplo, el experimento de selección anterior es un experimento de micromatriz o un experimento de QPCR.

En un enfoque alternativo, en cambio, se parte de combinaciones de al menos 2 genes biomarcadores de los genes que se presentan en la Tabla 13. En un ejemplo particular, los genes usados para establecer un modelo de expresión génica de biomarcadores se seleccionan de los 11 genes enumerados en la Tabla 8 más abajo. Mediante el uso de los genes biomarcadores así identificados, y la combinación de genes biomarcadores, la presente solicitud proporciona además el uso de dichos genes y combinaciones de genes en un método in vitro para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación.

Así, en un ejemplo adicional la presente solicitud proporciona un método in vitro para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; dicho método comprende las etapas de:

- determinar el nivel de expresión génica de un biomarcador identificado mediante el uso del método mencionado anteriormente; o el nivel de expresión génica de biomarcadores de una combinación de biomarcadores identificados mediante el uso del método anterior, para detectar un modelo de combinación de genes biomarcadores, de genes o variantes de corte y empalme, en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito; y
- evaluar la competencia del ovocito para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; en base a dicho(s) nivel(es) de expresión.

En el método anterior, la evaluación de la competencia del ovocito se realiza mediante el uso de un modelo de combinación de genes biomarcadores determinado, mediante el uso del método de la presente invención. En particular, mediante el uso de uno de los modelos de combinación de genes biomarcadores como se describe en la presente descripción. En dichos modelos se usarán los niveles de expresión génica en una fórmula matemática (infra) que proporcione la probabilidad de embarazo (P) de dicho ovocito. En un ejemplo, los niveles de expresión usados para evaluar la competencia del ovocito son niveles de expresión normalizados. Así, en un ejemplo, los métodos in vitro para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero como se proporciona en la presente descripción, comprenden además la etapa de normalizar los niveles de expresión. En otro ejemplo, comprende la etapa de normalizar los niveles de expresión, en donde los niveles de expresión de los genes biomarcadores se normalizan mediante corrección del nivel de expresión absoluto de dicho marcador, mediante comparación de su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen de mantenimiento que se expresa constitutivamente. En un ejemplo, el gen de mantenimiento usado para normalizar los niveles de expresión génica de biomarcadores se selecciona del grupo que consiste en los genes de UBC, B2M, actina, GAPDH, HPRT, CPB, G6PD, histona H2A y el de la proteína S 18C ribosomal mitocondrial (conocido además como RNA18S5); en particular UBC o B2M.

En un método alternativo, la competencia de un ovocito de mamífero se evalúa mediante comparación del nivel de expresión génica de marcadores con un control del que se conoce la competencia. La expresión diferencial de dicho gen es indicativa de la competencia del ovocito cuando hay al menos 20 % de diferencia en el nivel de expresión. Así, en un ejemplo, la competencia de un ovocito de mamífero se evalúa mediante el uso de uno de los modelos de combinación de genes biomarcadores como se describe en la presente descripción. En dicho ejemplo, los métodos in vitro pueden comprender además la etapa de normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes; y evaluar la competencia del ovocito para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o a conducir a la fecundación; en base a dichos niveles de expresión normalizados. En otro ejemplo, el ovocito se evalúa mediante comparación del nivel de expresión génica de marcadores con un control del que se conoce la competencia, opcionalmente mediante el uso de niveles de expresión normalizados, y en donde dicho ovocito es capaz de conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación, cuando exista al menos 20 % de diferencia en el nivel de expresión de dicho gen.

El experto en la técnica es muy consciente de las metodologías disponibles para determinar el nivel de expresión génica de marcadores de dichos uno o más genes biomarcadores. En un ejemplo, esta comprende medir los niveles de polinucleótidos de dichos genes por medio de ensayos biológicos mediante el uso de cebadores y/o sondas capaces de hibridar específicamente con dichos polinucleótidos o con una o más regiones dentro de dichos polinucleótidos. En otro ejemplo esta comprende medir los niveles de proteínas de productos génicos relacionados mediante ensayos biológicos mediante el uso de aglutinantes, anticuerpos o fragmentos de estos, para dichas proteínas, sus proformas, sus sustratos o sus productos metabólicos.

Aunque los métodos anteriores están configurados para determinar la competencia de un ovocito de mamífero y, en particular, de un ovocito humano, esto no implica que la muestra se limite a estos. Las muestras a usar en la presente invención incluyen evidentemente granulosa o cúmulo que se origina a partir de un ovocito, pero pueden basarse también en líquido folicular o en medio de cultivo, que comprende al menos una célula de la granulosa o cúmulo asociada con un ovocito. En la muestra de control o de referencia se conoce la competencia del ovocito, pueden usarse muestras con ovocitos conocidos competentes o no competentes conocidos, donde dichas muestras podrían obtenerse del mismo o diferente sujeto que la muestra a ensayar. En un ejemplo particular, la muestra de control o de referencia comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con un ovocito no competente conocido, obtenido o no del mismo sujeto que la muestra a ensayar.

Como se desprende de los ejemplos siguientes, se ha descubierto que el análisis a nivel de exones de los siguientes genes, es decir, CAMK1D, PTGS2, EFNB2, VCAN, STC1, STC2, PGR y GPX3, permite establecer modelos de expresión génica de biomarcadores para predecir la competencia de un ovocito en una muestra. En particular, los genes biomarcadores a usar en los métodos in vitro de acuerdo con la solicitud se seleccionan del grupo que comprende SASH1, MROH9, NCOA7, DNAH3, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, GALNTL6, SPTBN5, exón 1

de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D y EFNB2. La presente solicitud proporciona así un método in vitro para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; dicho método comprende las etapas de:

- determinar la expresión génica a nivel de exones de uno o más genes biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CAMK1D, PTGS2, EFNB2, VCAN, STC1, STC2, PGR y GPX3 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito;
- comparar el nivel de expresión génica de biomarcadores con un control del que se conoce la competencia; y
- evaluar la competencia del ovocito para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; en base a dicha comparación.

En un ejemplo particular, el análisis a nivel de exones de la expresión génica se realiza en la variante de corte y empalme de uno o más genes seleccionados de SASH1, MROH9, NCOA7, DNAH3, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, GALNTL6, SPTBN5, exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D y EFNB2. Las combinaciones preferidas de biomarcadores dentro del conjunto de genes anterior se seleccionan de la lista que comprende;

- EFNB2 y NCOA7;
- exón 9 de CAMK1D y exón 2 de HSPH1 y NCOA7
- exón 9 de CAMK1D y exón 6 de HSPH1 y NCOA7
- exón 1 de CAMK1D y SASH1; y
- EFNB2 y SASH1; finalmente en combinación con uno o más genes adicionales seleccionados de los genes enumerados en la Tabla 13; en particular con uno o más genes adicionales seleccionados de los genes enumerados en la Tabla 8; en particular con uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en CAMK1D, PTGS2, EFNB2, VCAN, STC1, STC2, PGR y GPX3; más particularmente con un gen seleccionado de EFNB2, exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, NCOA7 y SASH1; más en particular con un gen seleccionado de exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, NCOA7 y SASH1

Así, en un ejemplo adicional, la presente solicitud proporciona un método in vitro para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; dicho método comprende las etapas de:

- determinar la expresión génica a nivel de exones de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 genes biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CAMK1D, PTGS2, EFNB2, VCAN, STC1, STC2, PGR y GPX3 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito;
- normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes; y
- evaluar la competencia del ovocito para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; en base a dicho(s) nivel(es) de expresión normalizados.

En otro ejemplo, la presente solicitud proporciona un método in vitro para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o a conducir a la fecundación; dicho método comprende las etapas de:

- determinar la expresión génica a nivel de exones de exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D o EFNB2, en combinación con uno o más genes seleccionados de los genes enumerados en la Tabla 13; en particular con uno o más genes adicionales seleccionados de los genes enumerados en la Tabla 8; en particular con uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, NCOA7 y SASH1 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito;
- normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes; y
- evaluar la competencia del ovocito para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o para conducir a la fecundación; en base a dicho(s) nivel(es) de expresión normalizados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de los métodos in vitro de acuerdo con la invención para identificar ovocitos que son capaces de dar lugar a un embarazo viable después de la fecundación, opcionalmente en combinación con otro método de evaluación in vitro de ovocitos, espermatozoides o embriones.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, el término "competencia de ovocitos" o "competencia" significa la capacidad de un ovocito para reanudar la meiosis, escindirse después de la fecundación, ayudar a promover el desarrollo embrionario y el establecimiento del embarazo, y llevar un embarazo a término en buenas condiciones de salud. En otras palabras, representa la capacidad de un ovocito de mamífero para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o a conducir a la fecundación.

De acuerdo con la invención, el ovocito puede resultar de un ciclo natural, un ciclo natural modificado o un ciclo estimulado por ART (técnicas de reproducción asistida) que comprenden, por ejemplo, fecundación in vitro (IVF) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Los ovocitos usados en los métodos de la presente invención se obtienen normalmente entre 20 y 44 horas después de la inducción de la ovulación, en donde la inducción de la ovulación podría obtenerse en un ciclo natural o natural modificado. El término "ciclo natural" se refiere al ciclo natural mediante el cual la hembra o mujer produce un ovocito. El término "ciclo natural modificado", denominado además "ciclo estimulado", se refiere al proceso mediante el cual se induce el crecimiento de múltiples folículos y/o la ovulación de los ovocitos mediante el tratamiento de la hembra o la mujer. Los desencadenantes de la ovulación que pueden usarse en dicho ciclo estimulado incluyen, por ejemplo, hormona luteinizante o análogos, gonadotropinas coriónicas y análogos, FSH y agonistas, GnRH y análogos, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y análogos, proteínas similares a EGF (péptidos) anfirregulina, epirregulina, betacelulina y sus análogos, interleucina-6, interleucina-1, inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 4 del factor inhibidor de la leucemia (LIF), compuestos de bajo peso molecular que activan cualquiera de los anteriores, y cualquier combinación de los anteriores. Los tratamientos particulares incluyen estimulación ovárica con análogos de GnRH (agonistas o antagonistas) asociados con FSH recombinante y/o hMG; o con citrato de clomifeno, tamoxifeno, letrozol y similares.

En una modalidad, los ovocitos usados en los métodos de la presente invención se obtienen y/o se recolectan entre 20 y 40 horas después del desencadenamiento de la ovulación. En una modalidad, los ovocitos usados en los métodos de la presente invención se obtienen y/o se recolectan entre 34 a 38 horas después de la inducción de la ovulación; en particular, 36 horas después de la inducción de la ovulación. Como será evidente para el experto en la técnica, desencadenar la ovulación de los ovocitos puede realizarse in vitro o in vivo.

Una 'célula de la granulosa', denominada además 'célula folicular', es una célula somática del cordón sexual que está estrechamente asociada con el gameto femenino en desarrollo (ovocito) en el ovario de los mamíferos.

Una 'célula del cúmulo' es una célula presente en el disco prolífero (grupo de células) que rodea al ovocito tanto en el folículo ovárico como después de la ovulación.

Dentro de los métodos de la presente invención, la referencia a "un ovocito" significa que incluye células de la granulosa y/o células del cúmulo asociadas con un ovocito maduro y/o un ovocito inducido por la ovulación. Así, en una modalidad de la presente invención, los ovocitos usados se refieren a células del cúmulo, donde dichas células del cúmulo pueden analizarse mediante el uso de los métodos de la presente invención antes o después del desencadenante de la ovulación.

Por la frase "determinación del nivel de expresión del marcador" se entiende una evaluación del grado de expresión de un marcador en una muestra a nivel de ácido nucleico o proteína, mediante el uso de tecnología disponible para el experto en la técnica para detectar una porción suficiente de cualquier producto de expresión del marcador (que incluye ácidos nucleicos y proteínas). El 'nivel de expresión génica de marcadores' puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso de micromatrices de ácidos nucleicos, transferencia Northern, PCR de transcripción inversa, transferencia Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, micromatrices de proteínas o análisis FACS. El término "expresión génica de marcadores" pretende incluir la expresión del gen de longitud completa o variantes de este, en particular variantes de corte y empalme que contienen exones específicos. Variantes de corte y empalme particularmente interesantes en el contexto de la presente invención son cualquiera de las siguientes variantes de corte y empalme o combinaciones de estas que comprenden:

- Exón 2 y/o exón 6 de HSPH1,
- Exón 1 y/o exón 9 de CAMK1D,
- Exón 1 y/o exón 2 de NCOA7,
- Exón 12 de SASH1,
- Exón 14 de MROH9,
- Exón 8 de SPTBN5,
- Exón 16 de GALNTL6, y/o
- Exón 21 de DNAH3

En un ejemplo particular, la combinación de variantes de corte y empalme usada en los métodos de la presente solicitud se selecciona de la lista que comprende: exón 2 de HSPH1 y exón 6 de HSPH1, exón 2 de HSPH1 y exón 1 o exón 9 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1 y exón 1 o exón 2 de NCOA7; exón 2 de HSPH1 y exón 12 de SASH1, exón 2 de HSPH1 y exón 14 o MROH9, exón 2 de HSPH1 y exón 8 de SPTBN5, exón 2 de HSPH1 y GALNTL6, exón 2 de HSPH1 y exón 21 de DNAH3, exón 6 de HSPH1 y exón 1 o exón 9 de CAMK1D, exón 6 de HSPH1 y exón 1 o exón 2 de NCOA7; exón 6 de HSPH1 y exón 12 de SASH1, exón 6 de HSPH1 y exón 14 o MROH9, exón 6 de HSPH1 y exón 8 de SPTBN5, exón 6 de HSPH1 y GALNTL6, exón 6 de HSPH1 y exón 21 de DNAH3, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 1 de CAMK1D, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 9 de CAMK1D, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 1 de NCOA7, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 2 de NCOA7; exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 12 de SASH1, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 14 o MROH9, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 8 de SPTBN5, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y GALNTL6, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 21 de DNAH3, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 1 y exón 9 de CAMK1D, exón 2 y exón 6 de HSPH1 y exón 1 y exón 9 de CAMK1D y exón 1 y exón 2 de

5 exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y EFNB2; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y NCOA7 o exón 1 o exón 2 de NCOA7; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y DNHA3 o exón 21 de DNHA3; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y EFNB2; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6 y NCOA7 o exón 1 o el exón 2 de NCOA7; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6 y DNHA3 o exón 21 de DNHA3; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6 y DNHA3 o exón 21 de DNHA3; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6 y NCOA7 o exón 1 o el exón 2 de NCOA7 y DNHA3 o el exón 21 de DNHA3; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6 y NCOA7 o exón 1 o el exón 2 de NCOA7 y EFNB2; exón 12 de SASH1 y HSPH1 o exón 2 o exón 6 de HSPH1 y MROH9 o exón 14 de MROH9 y SPTBN5 o exón 8 de SPTBN5 y CAMK1D o exón 1 o exón 9 de CAMK1D y GALNTL6 o exón 16 de GALNTL6 y NCOA7 o exón 1 o el exón 2 de NCOA7 y DNHA3 o el exón 21 de DNHA3 y EFNB2.

25 En otro ejemplo, los modelos usados en los modelos in vitro de acuerdo con la solicitud se basan en la determinación de EFNB2 o del exón 1 o del exón 9 de CAMK1D en combinación con uno o más genes marcadores seleccionados de STC1, SASH1, PGR, GSTA4, GSTA3, GPX, NCOA7, HSPH1, MROH9, DNHA3, GALNTL6 y SPTBN5; en particular con uno o más genes seleccionados de STC1, SASH1, PGR, GSTA4, GSTA3, GPX, NCOA7 y HSPH1. En un ejemplo adicional, los modelos usados se basan en la determinación de EFNB2, exón 1 o exón 9 de CAMK1D en combinación con una o más variantes de corte y empalme seleccionadas del exón 12 de SASH1, exón 1 de NCOA7, exón 2 de NCOA7, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, exón 14 de MROH9, exón 21 de DNHA3, exón 16 de GALNTL6 y exón 8 de SPTBN5; en particular con una o más variantes de corte y empalme seleccionadas del exón 12 de SASH1, el exón 1 de NCOA7, el exón 2 de NCOA7, el exón 2 de HSPH1 y el exón 6 de HSPH1.

35 El control es al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada a un ovocito, del que se conoce la competencia. A este respecto, un control positivo es al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con un ovocito competente para conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación y/o a conducir a la fecundación. En otro ejemplo, un control positivo puede ser un ovocito cromosómicamente normal.

40 En determinados ejemplos se determina el nivel de expresión de al menos 2 genes marcadores de la Tabla 13. En un ejemplo particular, el nivel de expresión génica de biomarcadores se determina para una de las siguientes combinaciones;

45 EFNB2, GSTA4 y PGR;
EFNB2, GSTA4, PGR, GPX3 y GSTA3;
EFNB2, y NCOA7;
EFNB2, y SASH1;
EFNB2, CAMK1D exón 1, CAMK1D exón 9, SASH1, MROH9, NCOA7, DNHA3, exón 2 de HSPH1, HSPH1 exón 6, GALNTL6 y SPTBN5;
50 EFNB2, exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, NCOA7, y SASH1;
exón 9 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1 y NCOA7;
exón 9 de CAMK1D, exón 6 de HSPH1 y NCOA7;
exón 1 de CAMK1D, y SASH1;

55 Estos nuevos modelos demostraron ser capaces de clasificar los ovocitos según su potencial para embarazo y nacimiento vivo. Como es evidente a partir de los modelos anteriores, el exón 1 o el exón 9 de CAMK1D y el EFNB2 se confirman como genes de control positivo en el análisis intra e interpacientes, mediante combinación de estos marcadores con otros genes seleccionados de GSTA4, GSTA3, PGR, GPX3, NCOA7, SASH1, MROH9, DNHA3, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, GALNTL6 y SPTBN5, resulta en modelos que son predictivos para determinar la competencia de un ovocito para el embarazo y el nacimiento vivo. Como es evidente a partir de los ejemplos siguientes, mediante el uso de estas combinaciones de genes, el PPV, el NPV y la exactitud de la predicción superaron el 60 %. En otro ejemplo, los modelos in vitro de la presente solicitud, ver por ejemplo el modelo 3 en la Tabla 6 más abajo, pueden comprender además parámetros del paciente y/o del ciclo tal como, por ejemplo, edad, días de estimulación y estradiol relativo (E2), niveles de la hormona antimülleriana (AMH), niveles de hormona estimulante del foliculo en el día 3 (FSH en el día 3) y similares; en un ejemplo particular los parámetros de paciente y del ciclo usados en los modelos in vitro de la presente solicitud son días de estimulación, E2 relativo y edad.

En un ejemplo y partiendo del conjunto de genes anterior, la presente solicitud proporciona un modelo in vitro para predecir la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al embarazo y al nacimiento vivo; dicho método comprende las etapas de:

- determinar la expresión génica de marcadores de EFNB2, GSTA4 y PGR en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito
- comparar el nivel de expresión génica de marcadores con un control del que se conoce la competencia; o normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes y

evaluar la competencia del ovocito para conducir al embarazo y nacimiento vivo en base a dicha comparación o a dichos niveles de expresión normalizados.

En un ejemplo del método anterior, la competencia del ovocito se basa en determinar la probabilidad de embarazo (P) dada por la ecuación $P = -a + b \cdot \text{EFNB2} + c \cdot \text{GSTA4} - d \cdot \text{PGR}$; en donde a es un número entre 1,00 y 4,00; b es un número entre 0,00 y 2,00; c es un número entre 0,00 y 2,00; d es un número entre 0,00 y 2,00; EFNB2 es el nivel de expresión normalizado de EFNB2; GSTA4 es el nivel de expresión normalizado de GSTA4; y PGR es el nivel de expresión normalizado de PGR. En un ejemplo particular, a es un número entre 2,00 y 3,00; b es un número entre 0,00 y 1,00; c es un número entre 0,00 y 1,00; d es un número entre 0,00 y 1,00, en la ecuación anterior. En otro ejemplo, a es 2,26; b es 0,79; c es 0,095; y d es 0,096 en la ecuación anterior.

En un ejemplo del modelo anterior en base a EFNB2, GSTA4 y PGR, el método in vitro incluye además determinar el nivel de expresión génica de marcadores de GPX3 y GSTA3 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito, y usar dicho marcador adicional de expresión génica en la evaluación de la competencia del ovocito. En un ejemplo adicional del modelo anterior en base a EFNB2, GSTA4 y PGR, la competencia del ovocito se basa en la determinación de la probabilidad de embarazo (P) dada por la ecuación $P = -a + b \cdot \text{EFNB2} + c \cdot \text{GSTA4} - d \cdot \text{PGR} - e \cdot \text{GPX3} - f \cdot \text{GSTA3}$; en donde a es un número entre 1,00 y 4,00 ; b es un número entre 0,00 y 2,00 ; c es un número entre 0,00 y 2,00 d es un número entre 0,00 y 2,00; e es un número entre 0,00 y 2,00; f es un número entre 0,00 y 2,00; EFNB2 es el nivel de expresión normalizado de EFNB2; GSTA4 es el nivel de expresión normalizado de GSTA4; PGR es el nivel de expresión normalizado de PGR; GPX3 es la expresión normalizada de GPX3; y GSTA3 es el nivel de expresión normalizado de GSTA3. En el ejemplo particular a es un número entre 1,00 y 2,00; b es un número de y entre 0,00 y 1,00; c es un número de y entre 0,00 y 1,00; d es un número de entre 0,00 y 1,00; e es un número de entre 0,00 y 1,00; f es un número de y entre 0,00 y 1,00; y f es un número de entre 0,00 y 1,00 en la ecuación anterior. Más en particular, a es 1,02, b es 0,63, c es 0,27, d es 0,11, e es 0,43 y f es 0,51 en la ecuación anterior.

En un ejemplo de los modelos anteriores basados en EFNB2, GSTA4 y PGR, el método in vitro incluye además determinar la edad del paciente y las características del ciclo, los días de estimulación y el E2 Rel (E2 Relativo), y usar dichas características adicionales del paciente y del ciclo para evaluar la competencia del ovocito. En un ejemplo adicional del modelo anterior en base a EFNB2, GSTA4 y PGR, la competencia del ovocito se basa en la determinación de la probabilidad de embarazo (P) dada por la ecuación $P = -a + b \cdot \text{EFNB2} + c \cdot \text{GSTA4} - d \cdot \text{PGR} - e \cdot \text{GPX3} - f \cdot \text{GSTA3} + g \cdot \text{días de estimulación} + h \cdot \text{E2 Rel} + i \cdot \text{edad}$; en donde a es un número de y entre 5,00 a 15,00 ; b es un número de y entre 0,00 y 2,00 ; c es un número de y entre 0,00 y 2,00; d es un número de entre 0,00 y 2,00 e es un número de y entre 0,00 y 2,00; f es un número de y entre 0,00 y 2,00; g es un número de y entre 0,00 y 2,00; h es un número de y entre 0,00 y 2,00; i es un número de y entre 0,00 y 2,00; EFNB2 es el nivel de expresión normalizado de EFNB2; GSTA4 es el nivel de expresión normalizado de GSTA4; PGR es el nivel de expresión normalizado de PGR; GPX3 es la expresión normalizada de GPX3; y GSTA3 es el nivel de expresión normalizado de GSTA3. En el ejemplo particular a es un número de y entre 9,00 a 13,00; b es un número de y entre 1,00 y el 2,00; c es un número de y entre 0,00 y 1,00; d es un número de y entre 0,00 y 1,00; e es un número de y entre 0,00 y 1,00; y f es un número de entre 0,00 y 1,00; g es un número de y entre 0,00 y 1,00; h es un número de y entre 0,00 y 1,00; i es un número de y entre 0,00 y 1,00 en la ecuación anterior. Más en particular a es 11,27, b es 1,35, c es 0,46, d es 0,24, e es 0,66, f es 0,86, g es 0,0,50, h es 0,009 e i es 0,14 en la ecuación anterior.

En un ejemplo y partiendo del conjunto de genes anterior, la presente solicitud proporciona un modelo in vitro para predecir la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al embarazo y al nacimiento vivo; dicho método comprende las etapas de:

- determinar el nivel de expresión génica de marcadores de EFNB2 y NCOA7 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito
- comparar el nivel de expresión génica de marcadores con un control del que se conoce la competencia; o normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes y

evaluar la competencia del ovocito para conducir al embarazo y nacimiento vivo en base a dicha comparación o a dichos niveles de expresión normalizados.

En un ejemplo del método anterior, la competencia del ovocito se basa en la determinación de la probabilidad de embarazo (P) dada por la ecuación $P = a + b \cdot \text{EFNB2} + c \cdot \text{NCOA7}$; en donde a es un número de y entre 2,00 a 5,00; b es un número de y entre 2,00 y 4,00; c es un número de y entre 1,00 y 3,00; EFNB2 es el nivel de expresión normalizado de EFNB2; y NCOA7 es el nivel de expresión normalizado de NCOA7. En un ejemplo particular la

probabilidad de embarazo (P) viene dada por la ecuación $P = a + b \cdot \text{EFNB2} + c \cdot \text{NCOA7}$; en donde a es un número entre 3,00 y 4,00; b es un número entre 2,00 y 3,00; c es un número entre 1,00 y 2,00. Incluso en un ejemplo adicional, a es 3,23; b es 2,57 y c es 1,87 en la ecuación anterior.

5 En un ejemplo y apartándose del conjunto de genes anterior, la presente solicitud proporciona un modelo in vitro para predecir la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al embarazo y a un nacimiento vivo en un sujeto pretratado con un antagonista de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y con rFSH (hormona foliculoestimulante recombinante); dicho método comprende las etapas de:

- 10 • determinar el nivel de expresión génica de marcadores de exón 9 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1, y NCOA7 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito
- comparar el nivel de expresión génica de marcadores con un control del que se conoce la competencia; y normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes; y

15 evaluar la competencia del ovocito para conducir al embarazo en base a dicha comparación o a dichos niveles de expresión normalizados.

20 En un ejemplo del método anterior, la competencia del ovocito se basa en determinar la probabilidad de embarazo (P) dada por la ecuación $P = a + b \cdot \text{exón 9 de CAMK1D} + c \cdot \text{exón 2 de HSPH1} + d \cdot \text{NCOA7}$; en donde a es un número de y entre -3,00 y -1,00; b es un número de y entre 2,00 y 4,00; c es un número entre 0,00 y 3,00; d es un número entre 0,00 y 2,00; exón 9 de CAMK1D es el nivel de expresión normalizado del exón 9 de CAMK1D; exón 2 de HSPH1 es el nivel de expresión normalizado del exón 2 de HSPH1; NCOA7 es el nivel de expresión normalizado de NCOA7; y en donde un valor positivo se refiere a embarazo y un valor negativo a ausencia de embarazo. En un ejemplo particular, la probabilidad de embarazo (P) viene dada por la ecuación $P = a + b \cdot \text{exón 9 de CAMK1D} + c \cdot \text{exón 2 de HSPH1} + d \cdot \text{NCOA7}$; en donde a es un número de y entre -2,00 a -1,00; b es un número de y entre 1,00 y 2,00; c es un número de y entre 0,00 y 1,00; d es un número de y entre 0,00 y 1,00. Incluso en un ejemplo adicional, a es -1,37; b es 1,79; c es 0,89; y d es 0,74.

30 En un ejemplo y apartándose del conjunto de genes anterior, la presente solicitud proporciona un modelo in vitro para predecir la competencia de un ovocito de mamífero para conducir al embarazo y al nacimiento vivo en un sujeto pretratado con un antagonista de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y HP-hMG (gonadotropina menopáusica humana altamente purificada); dicho método comprende las etapas de:

- determinar el nivel de expresión génica de marcadores de exón 1 de CAMK1D y SASH1 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo asociada con el ovocito
- comparar el nivel de expresión génica de marcadores con un control del que se conoce la competencia; o normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes y

35 evaluar la competencia del ovocito para conducir al embarazo en base a dicha comparación o a dichos niveles de expresión normalizados.

40 En un ejemplo del método anterior, la competencia del ovocito se basa en la determinación de la probabilidad de embarazo (P) dada por la ecuación $P = a + b \cdot \text{SASH1} - c \cdot \text{exón 1 de CAMK1D}$; en donde a es un número de y entre 0,00 a 2,00; b es un número de y entre 0,00 y 2,00; c es un número de y entre 0,00 y 2,00; exón 1 de CAMK1D es el nivel de expresión normalizado del exón 1 de CAMK1D; SASH1 es el nivel de expresión normalizado de SASH1; y en donde un valor positivo se refiere a embarazo y un valor negativo a ausencia de embarazo. En un ejemplo particular, la probabilidad de embarazo (P) viene dada por la ecuación $P = a + b \cdot \text{SASH1} - c \cdot \text{exón 1 de CAMK1D}$; en donde a es un número de y entre 0,00 a 1,00; b es un número de y entre 0,00 y 1,00; c es un número de y entre 0,00 y 1,00. Incluso en un ejemplo adicional, a es 0,47; b es 0,91; y c es 0,023.

50 La comparación de los niveles de expresión génica de acuerdo con los métodos de la presente solicitud se realiza preferentemente después de que los niveles de expresión génica obtenidos hayan sido corregidos tanto por las diferencias en la cantidad de muestra analizada como por la variabilidad en la calidad de la muestra utilizada (por ejemplo, cantidad y calidad de ARNm probado). La normalización de los niveles contra los genes de referencia en la misma muestra puede llevar a cabo la corrección. Típicamente, para esta normalización se usan "genes de mantenimiento", tales como UBC, B2M, actina, GAPDH, HPRT, CPB, G6PD, histona H2A o el gen S 18C de la proteína ribosómica mitocondrial, en particular UBC o B2M. Los niveles de expresión de un gen marcador se normalizan mediante corrección del nivel de expresión absoluto de un marcador, mediante comparación de su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen de mantenimiento que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes de mantenimiento tales como UBC, B2M, actina, GAPDH, HPRT, CPB, G6PD, histona H2A o el gen de la proteína ribosómica mitocondrial S18C. Esta normalización permite, entre otras cosas, la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de prueba con una muestra de control.

60 Las diferencias en la expresión génica de marcadores en células del cúmulo o células de la granulosa asociadas con un ovocito dado, en comparación con el nivel de expresión de células del cúmulo o de la granulosa asociadas con otros ovocitos en un grupo, permite clasificar los ovocitos en un grupo de ovocitos de acuerdo con la calidad relativa. Así, en un ejemplo de la solicitud, una pluralidad de ovocitos de un individuo, o grupo de individuos, se agrupan y

65

seleccionan en un solo ensayo; los ovocitos caracterizados con las puntuaciones de probabilidad de calidad más altas se seleccionan después para la fecundación y/o la implantación.

5 La identificación de los marcadores y la determinación de la asociación entre el cambio en la expresión génica de
 10 marcadores en las células del cúmulo y la calidad concomitante de los ovocitos proporciona la base para los kits de
 diagnóstico clínico basados en la expresión de ARNm o proteína. Los materiales y reactivos básicos necesarios para
 la determinación de la calidad de los ovocitos de acuerdo con la invención pueden ensamblarse en un kit. En
 determinados ejemplos, el kit comprende al menos un reactivo que detecta específicamente los niveles de expresión
 15 de al menos un gen como se describe en la presente descripción e instrucciones para usar el kit de acuerdo con uno
 o más métodos de la invención. Cada estuche necesariamente comprende los reactivos que rinden el procedimiento
 específico. Así, para detectar el ARNm expresado por al menos un gen marcador del conjunto, el reactivo
 comprenderá una sonda de ácido nucleico complementaria al ARNm, tal como por ejemplo un ADNc o un
 oligonucleótido. La sonda de ácido nucleico puede o no ser inmovilizada sobre una superficie de sustrato (por
 20 ejemplo, un micromatriz). Para detectar un producto polipeptídico codificado por al menos un gen del conjunto, el
 reactivo comprenderá un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido. Dependiendo del procedimiento, el
 estuche puede comprender además uno o más de: tampón de extracción y/o reactivos, tampón de amplificación y/o
 reactivos, tampón de hibridación y/o reactivos, tampón de inmunodetección y/o reactivos, tampón de marcaje y/o
 reactivos, y medios de detección. Los protocolos para el uso de estos tampones y reactivos para llevar a cabo
 25 etapas diferentes del procedimiento pueden, además, incluirse en el kit. Los reactivos pueden ser suministrados en
 una forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquido. Los kits de la presente solicitud pueden comprender
 opcionalmente diferentes recipientes (por ejemplo, frasco, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada
 tampón y/o reactivo individual. Otros recipientes adecuados para llevar a cabo ciertos pasos para los métodos
 descritos también se pueden proporcionar. En determinados ejemplos, los kits de la presente solicitud comprenden
 30 además muestras de control. Las instrucciones para usar el kit de acuerdo con uno o más métodos de la aplicación
 pueden incluir instrucciones para procesar las muestras de células del cúmulo o células de la granulosa y/o realizar
 la prueba, e instrucciones para interpretar los resultados, es decir, para decidir sobre la competencia del ovocito para
 conducir al nacimiento, a la implantación, a formar un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o a conducir a
 la fecundación. En un ejemplo, un kit para determinar la expresión de ARNm de genes marcadores mediante RT-
 PCR cuantitativa incluiría cebadores estándar y otros reactivos para realizar RT-PCR cuantitativa, con componentes
 35 de reacción formulados para optimizar el éxito en la detección de cada gen que se va a analizar. Los cebadores de
 amplificación pueden seleccionarse en función de la secuencia de nucleótidos del gen o genes marcadores
 relevantes, en dependencia de la especie de ovocito de mamífero que se esté evaluando. Cualquier combinación de
 los genes marcadores podría incorporarse al kit. Para brindar a los usuarios opciones para elegir el equilibrio entre la
 cobertura y el costo, diferentes kits podrían proporcionar diferentes colecciones de cebadores para los genes
 marcadores objetivo del análisis.

Posibles aplicaciones del método de acuerdo con esta invención

40 En ejemplos preferidos, los métodos de la invención pueden usarse además para identificar sujetos mujeres que
 producen o no producen ovocitos competentes para el embarazo en base a los niveles de expresión de un conjunto
 de genes expresados diferencialmente. Sin embargo, los métodos inventivos son aplicables además a animales no
 humanos, por ejemplo, otros mamíferos, aves, anfibios, reptiles y otros. Por ejemplo, la presente invención puede
 usarse para derivar modelos animales para el estudio de supuestos tratamientos de fertilidad femenina.

45 Además, la presente invención se puede usar para identificar mujeres que tienen una anomalía que impide o inhibe
 su capacidad para producir ovocitos aptos para el embarazo, por ejemplo, exposición a medicamentos, exposición a
 sustancias tóxicas, factores ambientales, disfunción ovárica, quiste ovárico, premenopausia o condición
 menopáusica, cáncer, trastorno autoinmunitario, disfunción hormonal, trastorno de proliferación celular u otra
 50 condición de salud que inhiba o impida el desarrollo de ovocitos aptos para el embarazo. Por ejemplo, los sujetos
 que no expresan genes distintivos de embarazo específicos en niveles de expresión característicos pueden ser
 evaluados para evaluar si tienen una condición de salud subyacente que les impide producir ovocitos aptos para el
 embarazo. En particular, dichos sujetos pueden ser evaluados para evaluar si muestran signos de menopausia, si
 tienen cáncer, enfermedad autoinmunitaria o anomalía ovárica, por ejemplo, quiste ovárico, o si tienen otra
 55 condición de salud, por ejemplo, trastorno hormonal, trastorno alérgico, etc., que pueden impedir el desarrollo de
 ovocitos "competentes para el embarazo".

Adicionalmente, los métodos en cuestión pueden usarse para evaluar la eficacia de los tratamientos de fertilidad
 femeninos putativos en sujetos femeninos humanos o no humanos. Esencialmente, dichos métodos pueden
 comprender el tratamiento de un sujeto femenino, preferentemente una mujer, con un tratamiento putativo de mejora
 60 de la fertilidad, aislar al menos un ovocito y las células foliculares o de la granulosa circundantes asociadas de dicha
 mujer después del tratamiento, opcionalmente aislar además al menos un ovocito y las células circundantes
 asociadas antes del tratamiento, aislar al menos una célula del cúmulo de cada uno de dichos ovocitos aislados;
 detectar los niveles de expresión de al menos un gen que se expresa o no se expresa a niveles característicos por
 las células del cúmulo que se asocian con (rodean) los ovocitos competentes para el embarazo; y evaluar la eficacia
 65 de dicho tratamiento de fertilidad putativo en base a si da lugar a células del cúmulo que expresan al menos un gen
 característico del embarazo a niveles más característicos de las células del cúmulo que rodean a los ovocitos

competentes para el embarazo (que sin tratamiento). Como se indicó, si bien se prefieren sujetos humanos femeninos, los métodos en cuestión pueden usarse para evaluar la eficacia de los tratamientos de fertilidad putativos en animales hembra no humanos, por ejemplo, primates hembra no humanos u otros modelos animales adecuados para la evaluación de la fertilidad humana putativa.

Aún más, la presente invención puede usarse para mejorar la eficacia de los tratamientos de fertilidad in vitro o in vivo. En particular, los ovocitos que se encuentran "incompetentes para el embarazo" o que son inmaduros, pueden cultivarse en un medio que contiene uno o más productos génicos que están codificados por genes identificados como genes "firma del embarazo", por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento, factores de diferenciación y similares, antes, durante o después de la fecundación in vivo o in vitro. Esencialmente, la presencia de estos productos génicos debería suplir una deficiencia en los productos génicos nutricionales que normalmente se expresan en las células del cúmulo y/o de la granulosa que rodean a los ovocitos "competentes para el embarazo", y que normalmente nutren a los ovocitos y, por lo tanto, facilitan la capacidad de estos ovocitos para producir embarazos viables después de la fecundación.

Alternativamente, pueden administrarse uno o más productos génicos codificados por dichos genes característicos del embarazo a un sujeto que se descubre que no produce ovocitos aptos para el embarazo de acuerdo con los métodos de la invención. Tal administración puede ser parenteral, por ejemplo, por inyección intravenosa, intramuscular, intravaginal, subcutánea o por administración oral o transdérmica. Alternativamente, estos productos génicos pueden administrarse localmente en un sitio diana, por ejemplo, un entorno ovárico o uterino femenino. Por ejemplo, a un sujeto femenino se le puede implantar en el útero o el ovario un dispositivo de administración de fármacos que proporciona la administración sostenida de uno o más productos génicos codificados por genes de "firma de embarazo".

Como se detalló anteriormente, las diferencias en la expresión génica de marcadores en células del cúmulo o células de la granulosa asociadas con un ovocito dado, en comparación con el nivel de expresión de células del cúmulo o de la granulosa asociadas con otros ovocitos en un grupo, permite clasificar los ovocitos en un grupo de ovocitos de acuerdo con la calidad relativa. Así, en un ejemplo de la invención, una pluralidad de ovocitos de un individuo, o grupo de sujetos femeninos humanos o no humanos, se agrupan y seleccionan en un solo ensayo; los ovocitos caracterizados con las puntuaciones de probabilidad de calidad más altas se seleccionan después para la fecundación y/o la implantación.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Análisis QPCR

Materiales y Métodos

Población de pacientes

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de UZBrussel y se obtuvo el consentimiento por escrito de los pacientes. Se seleccionaron cuarenta y siete pacientes de ICSI en base a la política de transferencia de embriones (transferencia de embrión único) y el protocolo de estimulación ovárica prescrito: Antagonista de GnRH en combinación con hormona estimulante del folículo recombinante (FSH) (Gonal-f, Merck-Serono, Ginebra, Suiza; n= 4 o Puregon, MSD, Oss, Países Bajos; n= 43). Las causas de infertilidad fueron: solo factor masculino (n=19), solo factor femenino (trastorno de ovulación n=3 e infertilidad tubárica n=2), combinación de factor masculino y femenino (OAT y endometriosis n=3) e idiopática (n=20). Veinte pacientes tuvieron transferencia de un solo embrión el día 3 de cultivo, de estos 10 quedaron embarazadas. Veinte y siete pacientes tuvieron transferencia el día 5, de estas 9 quedaron embarazadas.

Recolección de células de cúmulos humanos y cultivo de embriones

Se usó ultrasonido vaginal para monitorear el desarrollo folicular. El perfil endocrino se controló mediante análisis de 17β-estradiol (E2), progesterona, FSH y LH en suero mediante electroquimioluminiscencia en un inmunoanálisis de COBAS 6001 (Roche, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) mediante el uso de ensayos validados con sensibilidades respectivamente de 5 ng/l, 0,03 µg/l, <0,1 UI/l, 0,1 UI/l e imprecisiones totales (%CV) de respectivamente <6, <7, <6 y <6. Se indujo la maduración folicular final con una dosis de 10 000 UI de hCG cuando se observaron por ecografía transvaginal al menos tres folículos de 17 mm de diámetro. La recuperación de ovocitos se realizó 36 h después. La recolección de CC se realizó como se describe en (Wathlet y otros 2011). Brevemente, la denudación de ovocitos individuales se realizó en gotitas de 40 µl de HTF-SSS que contenían 80 UI/ml de Cumulase (MediCult, Lyon, Francia) durante no más de 30 s y se lavaron secuencialmente en gotitas sin enzima. En cualquier momento, los ovocitos se manipularon individualmente a partir de este momento para permitir el análisis retrospectivo de las CC por ovocito. Después de la denudación, las CC se sumergieron directamente en nitrógeno líquido. ICSI se realizó como se describió anteriormente (Van Landuyt y otros 2005) y los embriones se cultivaron en medios secuenciales de SAGE (CooperSurgical, Leisegang Medical, Berlín). Los embriones se vitrificaron el día 3 o

el día 5/6 del cultivo de embriones como se describió anteriormente (Van Landuyt y otros 2011) y se usó en un ciclo FRET posterior.

Para las 47 pacientes, solo se analizó las CC relacionadas con los ovocitos que resultaron en embriones seleccionados para la transferencia. Se hizo la excepción de 7 de las 28 pacientes no embarazadas, 1 muestra de CC adicional (excepto para 1 paciente, 2 muestras de CC) relacionada con un embrión vitrificado que dio lugar a un embarazo tras un ciclo de transferencia de un solo embrión congelado (8 CC adicionales en total de 7 pacientes). La Figura 1 muestra las diferentes muestras usadas para cada análisis.

Selección de genes

Este estudio es el 3ro consecutivo en evaluar el valor predictivo de la expresión de genes de las CC para la calidad de los ovocitos mediante QPCR. A lo largo de los 3 estudios, seguimos una estrategia precisa para elegir qué genes analizar con respecto a la calidad de los ovocitos en pacientes ICSI. El primer estudio identificó 4 genes principales, 2 predictivos para la morfología del embrión (inositol-trifosfato 3-cinasa A (ITPKA) y canal de cationes de potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 7 (TRPM7)) y 2 para el resultado del embarazo (sindecano 4 (SDC4) y versicano (VCAN)). Se optó por incluir esos 4 genes en el próximo estudio (Wathlet y otros 2012). ITPKA y TRPM7 se relacionaron nuevamente con el desarrollo del embrión, pero SDC4 y VCAN no se mantuvieron esta vez en los modelos de embarazo y fueron reemplazados por EFNB2, CAMK1D y STC1 cuando se usó el análisis de regresión múltiple paso a paso. Como varios estudios no mostraron relación entre los genes predictivos del desarrollo embrionario y el resultado del embarazo (Gebhardt y otros 2011; Wathlet y otros 2012), se decidió repetir solo los 3 genes relacionados con el embarazo en este tercer estudio. Nuestra hipótesis es que mediante esta estrategia de prueba en "cascada", los genes predictivos de embarazo más fuertes pueden filtrarse a través de estudios consecutivos (Tabla 2). Los otros 9 genes analizados en este estudio fueron: GSTA3, GSTA4, GPX3, GSR, ITPR1, SLC2A1, THBS1, TGFB1 y PGR (Tabla 1).

Tabla 1: Genes analizados en células del cúmulo para predicción de embarazo.

Símbolo del gen (nombre)	Función general	Previamente descrito como marcador de calidad de ovocitos en CC humanas	Referencias
EFNB2 (efrina-B2)	Las efrinas de clase B son proteínas transmembrana posiblemente involucradas en eventos de luteinización.	Mayor en las CC de pacientes ICSI embarazadas	(Egawa y otros 2003)(A) (Wathlet y otros 2012)(B)
CAMK1D (ID de proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina)	Miembro de la subfamilia de serina/treonina quinasas proteína quinasa 1 dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina	Mayor en las CC de pacientes ICSI embarazadas	(Verploegen y otros 2000)(A) (Wathlet y otros 2012)(B)
STC1 (estanniocalcina 1)	Disminuye la producción de progesterona inducida por FSH en cultivos de células de granulosa de rata	Tendía a ser menor en pacientes ICSI embarazadas	(Luo y otros 2004; Luo y otros 2005)(A) (Wathlet et 2012)(B) <i>Alabama</i> .
RSG (glutación reductasa)	Enzima de defensa antioxidante celular	Aún no descrito	(Pastoreo y otros 2003)(A)
GPX3 (glutación peroxidasa 3)	Ayuda en la desintoxicación del peróxido de hidrógeno.	Predictor negativo para embriones de escisión temprana	(Pastoreo y otros 2003)(A) (van Montfoot y otros 2008)(B) <i>Alabama</i> .
GSTA3 (glutación S-transferasa alfa 3)	Función de desintoxicación junto a una función en la producción de progesterona	Aún no descrito	(Pastoreo y otros 2003; Raffalli-Mathieu y otros 2008) (A) <i>Alabama</i> .
GSTA4 (glutación S-transferasa alfa 4)	Función de desintoxicación	Aún no descrito	(Pastoreo y otros 2003)(A)

(continuación)

	Símbolo del gen (nombre)	Función general	Previamente descrito como marcador de calidad de ovocitos en CC humanas	Referencias
5				
10	TGFB1 (factor de crecimiento transformante, beta 1)	Puede desempeñar un papel en la proliferación y diferenciación celular. Se demostró que estaba relacionado con el desarrollo de folículos en ratones adultos.	Aún no descrito	(Govinden y Bhoola 2003; Liu y otros 1999; Verploegen y otros 2000) (A)
15	PGR (receptor de progesterona)	Efecto antiapoptótico mediante la unión de progesterona en células de la granulosa humana cultivadas	Menor expresado en blastocistos de buena morfología. Regulado por aumento en células foliculares de pacientes embarazadas (resultados del arreglo)	(Makrigiannakis) y otros 2000)(A) (Hamel y otros 2010b; Hasegawa y otros 2005)(B)
20				
25	ITPR1 (receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 1)	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, que libera calcio del retículo endoplasmático	Regulado por aumento en embriones de escisión no temprana (resultados del arreglo)	(Berridge 2009)(A) (van Montfoort y otros 2008)(B)
30				
35	SLC2A1 (familia de transportadores de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 1)	Transportador de glucosa responsable del transporte facilitado de glucosa a través de la membrana plasmática de las células de mamíferos	Aún no descrito	(Olson y Pessin 1996)(A)
40	THBS1 (trombospondina 1)	Puede mediar en interacciones célula-célula y célula-matriz. Puede activar TGFB1	Aún no descrito	(Adams 1997; Hayashi y otros 2012)(A) y otros
45	SASH1 (Dominio SAM y SH3 que contiene 1)	1.1. Actúa aguas abajo de TLR4,	Aún no descrito	(Dauphinee y otros 2013) (A)
50		Receptor tipo Toll implicado en la producción de citocinas		
55	SPTBN5 (espectrina, beta, no eritrocítica 5)	1.2. Relaciona la respuesta del factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Aún no descrito	
60	ADNH3 (dineína, axonemal, cadena pesada 3)	La función exacta es actualmente desconocida	Aún no descrito	
65	GALNTL6 (UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa similar a 6)	La función exacta es actualmente desconocida	Aún no descrito	
	NCOA7 (coactivador del receptor nuclear 7)	Regula la señal del receptor de estrógeno	Aún no descrito	
	MROH9 (miembro de la familia de repetición similar al calor maestro 9)	La función exacta es actualmente desconocida	Aún no descrito	

Tabla 2: Estrategia sobre 3 estudios para obtener los genes relacionados con la calidad más fuerte en células del cúmulo almacenadas de pacientes con ICSI

	Wathlet y otros 2011	Wathlet y otros 2012	Estudio actual
5	Genes probados con QPCR	<i>SDC4, VCAN, ITPKA, TRPM7, PTGS2, GREM1, CALM2, ALCAM</i>	<i>CAMK1D, EFNB2, STC1, GSTA4, GSTA3, GSR, GPX3, PGR, THBS1, SLC2A1, ITPR1, TGFB1</i>
10	Protocolo de estimulación	antagonista rFSH (25 pacientes) agonista HP-hMG (20 pacientes)	Antagonista rFSH (33 pacientes)
15	Medio de cultivo de embriones	Sistema BlastAssist (Medicult)	Vitrolife G7 (Vitrolife)
20	Criterios de valoración	Morfología embrionaria (75 CC para rFSH y 67 CC para HP-hMG de 2 x 10 pacientes). Embarazo clínico (42 pacientes de ambos protocolos de estimulación de las cuales 19 embarazadas = 19 COC)	Morfología embrionaria (99 CC). Embarazo bioquímico y nacido vivo (16 embarazadas, 17 no embarazadas = 33 COC)
25	Mejores genes retenidos para el siguiente estudio	Predicción de embarazo: <i>SDC4</i> y <i>VCAN</i> . Predicción de la morfología del embrión: <i>ITPKA</i> y <i>TRPM7</i>	Predicción de embarazo: <i>CAMK1D, EFNB2</i> y <i>STC1</i>
30	La expresión génica de las células del cúmulo (CC) relacionadas con diferentes morfologías embrionarias o resultados del embarazo de los ovocitos correspondientes en la ICSI se evaluó para tres paneles de genes en tres conjuntos de muestras diferentes. Los genes que se encontraron más predictivos en cada conjunto de muestras se probaron en el conjunto de muestras de pacientes independientes posteriores. Los genes marcados en negrita se retuvieron como los mejores genes predictivos del estudio anterior. Mil: ovocitos en metafase II; COC: complejo del cumulus oophorus; rFSH: hormona estimulante del foliculo recombinante; HP-hMG: Gonadotropina menopáusica humana altamente purificada		
35			

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo como se describió anteriormente (Adriaenssens y otros 2010) mediante el uso del kit RNeasy Micro (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Bajos) que incluye una etapa de ADNasa y la adición de 5 ng/μl de poli(dA) (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) antes de la extracción. La extracción fue seguida por un segundo tratamiento con ADNasa (ADNasa libre de ARNasa RQ1, Promega, Leiden, Países Bajos).

La transcriptasa inversa (RT) se realizó como se describió anteriormente (Adriaenssens y otros 2010) con el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad Laboratories, Ghent, Bélgica). Los controles negativos se generaron mediante omisión de la enzima o el ARN en la reacción de RT.

PCR en tiempo real

Secuencias de cebadores para *CAMK1D*, *STC1* y *EFNB2* se enumeran en Wathlet y otros, 2012. Los cebadores para *GPX3*, *GSTA3*, *GSTA4*, *PGR*, *THB1*, *ITPRA*, *SLC2A1*, *GSR* y *TGFb1* pueden encontrarse en la Tabla 3. Tanto beta-2-microglobulina (*B2M*) como la ubiquitina C (UBC) se validaron y usaron antes como factor de normalización (Wathlet y otros 2011). Condiciones del ciclo, controles negativos, curvas estándar y normalización (con *B2M* y UBC) son como se describieron anteriormente (Wathlet y otros 2011), pero todas las reacciones de PCR se adaptaron a reacciones de 10 μl. Todos los valores mencionados a continuación son los valores normalizados a la media de ambos *B2M* y UBC para cada muestra.

60

65

Tabla 3: Secuencias de cebadores.

Símbolo del Gen	Secuencia de referencia del gen	Nombre del gen	Cebador directo e inverso 5'→3'	SEQ ID No
5	GPX3	NM_002084	ggggacaagagaagtcgaaga gccagcatactgcttgaagg	1
				2
10	GSR	NM_000637	caatgatcagcaccaactgc agtcttttaacctcctgacctg	3
				4
15	GSTA3	NM_000847	gatgccaagattgccttgat ttgcatggctctgtaacct	5
				6
20	GSTA4	NM_001512	cctcaaggagagaacctgat ggatgcatgataagcagttcc	7
				8
25	ITPR1	NM_002222	taccagcggctgctaac tgcaaatcctgctcctctgt	9
				10
30	PGR	NM_000926	gtcatagacccccgttgcta gctaagccagcaagaaatgg	11
				12
35	SLC2A1	NM_006516	gtctggcatcaacgctgtc acgataccggagccaatg	13
				14
40	TGFB1	NM_000660	agtggttgagccgtggag gcagtggttatccctgctg	15
				16
45	THBS1	NM_003246	aatgctgtcctcgctgttg gccacagctcgtagaacagg	17
				18

Estadística

Análisis interpacientes

En un primer análisis, se usó una prueba t bilateral (GraphPad Prism versión 4.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, Estados Unidos) para comparar complejos de cúmulos de ovocitos que resultaron en embarazo o no (19 nacidos vivos, 28 no embarazadas). Todos los datos se transformaron a LOG para obtener una distribución normal. Dado que se probaron múltiples genes, la corrección de Bonferroni nos permitió considerar que solo los valores de P <0,0042 se consideraron significativos después de la corrección de Bonferroni.

En un segundo análisis, se construyó un modelo mediante el uso del análisis de regresión múltiple paso a paso como se describió anteriormente (Wathlet y otros 2011). Brevemente, se construyó un modelo de regresión lineal, con una ecuación como salida 'y = a + bx + cz + ds + et + fu + gv + hw', con variables de respuesta (x, z, s, t, u, v, w) de expresión génica y/o características del paciente y del ciclo (todas se enumeran en la Tabla 3). 'b-h' son los índices respectivos de las variables incluidas y 'a' es la intersección de la ecuación. Se añadió una variable al modelo si el valor P de tipo III de la variable fue <0,3 y si se mejoraba el valor P del modelo. Al final del modelo se realizó una etapa de regresión hacia atrás para excluir variables redundantes. Se construyeron cuatro modelos diferentes para predecir el embarazo. En dos modelos, solo se permitieron valores de expresión génica (primero, el modelo se restringió a 3 genes, después, todos los genes se permitieron en los modelos siempre que mejoraran el valor P del modelo). En otros dos modelos, se evaluó la necesidad de corrección por características del ciclo y del paciente, al permitir todas las características del ciclo y del paciente en los modelos compuestos solo por genes, cuando esas variables adicionales pudieran mejorar el modelo. Al introducir esos factores adicionales, la posible variabilidad interpacientes en la expresión génica podría nivelarse y aumentar las diferencias relacionadas con la calidad de los ovocitos.

Para todos los modelos, precisión ((Verdadero positivo + verdadero negativo) / (verdadero positivo + falso positivo + falso negativo + verdadero negativo)) y valores predictivos positivos y negativos (PPV= Verdadero positivo / (verdadero positivo + falso negativo) y NPV = Se calculó verdadero negativo / (verdadero negativo + falso positivo). La potencia de todos los modelos se representó mediante la característica operativa del receptor (ROC) y se calculó el área bajo la curva (AUC).

Análisis Intrapacientes

Finalmente, el estudio permitió comparar 2 (o 3) ovocitos provenientes de un ciclo de recuperación de ovocitos con resultado de embarazo conocido por ovocito, ya que todos los embriones fueron transferidos individualmente en ciclos consecutivos. Para ello, de 7 de las 28 pacientes que no estaban embarazadas en ciclo fresco, se compararon las CC de los embriones que fueron reemplazados en un ciclo posterior de transferencia simple de embrión congelado que resultó en embarazo con los transferidos en el ciclo fresco. Para un paciente, se analizaron dos ciclos consecutivos de reemplazo de embriones congelados ya que el primer embrión no terminó en un embarazo. Se eligieron siete genes para este análisis en función de su presencia en uno de los modelos mencionados anteriormente o su valor de P de adición, cuando se añadieron por primera vez a un modelo de embarazo. Se realizó una prueba t pareada para cada gen y se calculó la posibilidad de embarazo con los modelos definidos anteriormente del análisis interpacientes, que contenían solo genes y se basaron en las muestras de 47 CC (19 nacidos vivos), pero se excluyeron las 8 CC muestras de los ciclos congelados.

Resultados

15 Población de pacientes

No se encontraron diferencias estadísticas entre las características de las pacientes y del ciclo de los grupos de embarazo y ausencia de embarazo (Tabla 3). La edad media y el IMC para ambos grupos de pacientes fueron bajos pero comparables. Los niveles de progesterona fueron bajos en ambos grupos. El número medio de intentos de ciclo no fue diferente en ambos grupos: respectivamente en el grupo de embarazos y ausencia de embarazos 12 y 17 pacientes se sometieron a su primer ciclo, 6 y 10 a su segundo ciclo y 1 para ambos grupos a su tercer ciclo. Los porcentajes de madurez ovocitaria y fecundación fueron normales en ambos grupos, y el porcentaje de embriones de buena calidad en el día 3 fue superior a 50 %. La puntuación de la calidad de embriones en el momento de la transferencia no fue diferente para ambos grupos. Diecinueve ciclos de SET frescos resultaron en nacimiento vivo.

Tabla 3: Características del paciente y del ciclo.

Variable	Unidad	Embarazo			Ausencia de embarazo			Prueba t
		promedio	SD	n	promedio	SD	n	
Edad	Año	30	4	19	31	5	28	ns
BMI	kg/m ²	23	4	17	23	4	25	ns
Días de estimulación	#	9	2	19	8	1	28	ns
Dosis de gonadotrofina	U/día	167	34	19	169	36	28	ns
FSH ^a	U/l	11	3	16	12	4	26	ns
LH ^a	U/l	1,88	1,46	10	1,18	0,86	24	ns
E2 Relativo	ng/l	150	98	16	162	87	26	ns
Progesterona ^a	µg/l	0,79	0,26	16	0,77	0,42	26	ns
COC recuperado en la recogida	#	10	5	19	9	5	28	ns
Respuesta Ovárica	#	6	3	19	6	3	28	ns
Madurez de los ovocitos	%	89	10	19	80	15	28	ns
2PN	%	82	15	19	87	16	28	ns
≥7cel día3	%	74	25	19	72	29	28	ns
Fragmentación baja	%	65	30	19	73	29	28	ns
Embriones de buena calidad	%	58	17	19	53	29	28	ns

COC: complejo de ovocito del cúmulo; E2 Relativo: E2/COC recuperado; Respuesta ovárica: (COC recuperado/dosis de gonadotrofina) x 100; Madurez de ovocitos: proporción de MII/COC recuperada; 2PN: proporción de 2PN/ovocitos intactos tras ICSI; ≥7células día3 = proporción de embriones con al menos 7 células el día3/2PN; Fragmentación baja: proporción de embriones con <10 % de fragmentación en el día 3/2PN; Embriones de buena calidad: proporción de embriones en el día 3 con <10% de fragmentación y al menos 7 células/2PN; ^a Valores séricos medidos el día de la hCG; ns: P>0,05; DE= desviación estándar.

Predicción de embarazo:

Validación de genes predictivos (CAMK1D, EFNB2 y STC1) mediante el uso de un modelo construido sobre un conjunto de muestras anterior

5 Un modelo de predicción de embarazo compuesto por 3 genes, considerado en un estudio previo (Wathlet y otros 2012), se probó en la serie actual de pacientes independientes. Los valores de expresión génica de CAMK1D, EFNB2 y STC1 de las CC de las 47 pacientes se introdujeron en la ecuación obtenida anteriormente y dieron un valor predictivo de la probabilidad de embarazo para cada uno de los 47 ovocitos. Los PPV y NPV obtenidos con las 47 muestras de este estudio fueron de 62 % y 86 %, con una precisión de 72 %.

10 Análisis interpacientes: prueba t de los 12 genes en el conjunto de muestras actual

Los complejos de cúmulos de 28 ovocitos que no resultaron en un embarazo se compararon con 19 CC de ovocitos que dieron como resultado un nacimiento vivo. Solo EFNB2 fue estadísticamente superior en el grupo de embarazo. CAMK1D, GSTA4 y GSR solo mostraron una tendencia de mayor expresión en el grupo de embarazo (valores P respectivos: 0,0068, 0,0123 y 0,0507). Los gráficos para todos los genes pueden encontrarse en la Figura 2.

Análisis interpacientes: Análisis de regresión múltiple paso a paso

20 En una primera etapa para construir un modelo de embarazo, se calculó el valor de P de la suma cuando se añadió como primera variable para todos los genes y puede encontrarse en la Tabla 4.

Tabla 4: Valor de P de adición para los diferentes genes probados.

Variable	Valor de P de adición	Variable	Valor de P de adición
EFNB2	0,01	STG1	0,38
GSTA4	0,01	TGFB1	0,43
GPX3	0,04	ITPR1	0,50
CAMK1D	0,05	SLC2A1	0,61
GSR	0,06	THBS1	0,68
PGR	0,16	GSTA3	0,75

35 El valor de P de adición se obtiene cuando cada gen se inserta como primera variable en un modelo de embarazo. Los genes están ordenados con un valor de P creciente.

Primero, el modelo se restringió a la inclusión de 3 de los 12 genes (Modelo 1). EFNB2, GSTA4 y PGR fueron retenidos y dieron un modelo con un valor de P de 0,0015, un PPV de 68 %, un NPV de 79 %, una exactitud de 73 % y un AUC de 0,82. Al intentar mejorar este modelo al permitir además las características del paciente y del ciclo (de la Tabla 3), no se encontró ninguna mejora con respecto al modelo anterior (Modelo 1 bis). En una siguiente etapa, se permitieron más de 3 genes en el modelo si se mejoraba el valor de P (Modelo 2). Cinco de los 12 genes se mantuvieron en este modelo (es decir, EFNB2, GSTA4, PGR, GPX3 y GSTA3), lo que produjo un valor de P < 0,0001 con un PPV de 78 %, un NPV de 83 %, una exactitud de 81 % y un AUC de 0,93. Añadir las características del paciente y del ciclo mejoró el modelo (Modelo 3). Los parámetros retenidos fueron: días de estimulación, E2 relativo y edad. El PPV, el NPV y la exactitud del modelo ampliado aumentaron al 93 % y el AUC a 0,95 (Tabla 5). Los modelos matemáticos completos pueden encontrarse en la Tabla 6. Las curvas ROC se muestran en la Figura 3.

50

55

60

65

	#Total de pacientes	# de pacientes embarazadas	GPX3	GSTA3	GSTA4	PGR	EFNB2	AGE	Rel E2	# Días de estim.	Modelo de P	PPV (%)	NPV (%)	Exactitud (%)	AUC
Modelo 1 (3 genes)	47	19			X ^a	X	X ^a				0,0015	68	79	73	0,82
Modelo 1 bis (Modelo 1 + parámetros del ciclo y el paciente)	Los parámetros del ciclo y el paciente no pudieron mejorar el primer modelo														
Modelo 2 (número ilimitado de genes)	47	19	X ^a	X ^a	X ^a	X	X				0	78	83	81	0,93
Modelo 3 (Modelo 2 + parámetros del ciclo y el paciente)	42*	16	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X	X	X	0	93	93	93	0,95

Tabla 5: Vista esquemática de los modelos multiparamétricos para la predicción de nacidos vivos.

Se enumeran solamente los genes y factores que se retuvieron al menos una vez. En el Modelo 1 se retuvo un máximo de tres genes hasta finalizar el modelo. En el Modelo 2 se permitió un número ilimitado de genes, si estos podían mejorar el valor de p del modelo. Para tratar de mejorar el Modelo 1 y el Modelo 2, se permitió en el modelo las características del ciclo y del paciente de la Tabla 3. Solamente el Modelo 2 pudo mejorarse y resultó en el Modelo 3. x: factor que mejora significativamente el modelo; # número; 'ilimitado' se refiere al hecho de que se permitieron en el Modelo los 12 genes, si estos podían mejorar el modelo; estim: estimulación ovárica; PPV: valor predictivo positivo; NPV: valor predictivo negativo; AUC: área bajo la curva; a: valor de p<0,01 tipo III final en el modelo; * se incluyeron solamente 42 pacientes para construir este modelo ya que los valores de E2 en el día de hCG se perdieron para 5 pacientes.

Tabla 6: Modelos matemáticos para la predicción del embarazo. Modelos matemáticos completos usados para predecir el resultado del embarazo mediante el uso de los valores de expresión génica de las células del cúmulo y las características del paciente y el ciclo. #: número

Modelo 1 (máx. 3 genes) =	$-2,25846 + 0,79256 \times EFNB2 + 0,09491 \times GSTA4 - 0,09632 \times PGR$
Modelo 1bis (máx. 3 genes + parámetros Tabla 3) =	<i>los parámetros del ciclo y del paciente no pudieron mejorar el primer modelo</i>
Modelo 2 (# ilimitado de genes) =	$- 1,02049 + 0,63484 \times EFNB2 + 0,27346 \times GSTA4 - 0,10864 \times PGR - 0,43395 \times GPX3 - 0,51067 \times GSTA3$
Modelo 3 (# ilimitado de genes + parámetros Tabla 3) =	$- 11,26732 + 1,3462 \times EFNB2 + 0,45884 \times GSTA4 - 0,2423 \times PGR - 0,65786 \times GPX3 - 0,85875 \times GSTA3 + 0,49709 \times \text{días de estimulación} + 0,0092 \times E2 \text{ Rel} + 0,13864 \times \text{edad}$

Predicción intrapacientes de embarazo

Para siete pacientes, se analizaron muestras de las CC crioalmacenas relacionadas con embriones crioconservados que habían dado lugar a un embarazo clínico después de la transferencia en un ciclo de transferencia posterior. Este material se usó para analizar los genes presentes en los modelos multiparamétricos obtenidos anteriormente (Tabla 6) y/o los 5 genes con el valor de P de adición más pequeño (Tabla 4), es decir, CAMK1D, EFNB2, GPX3, GSR, GSTA4, GSTA3 y PGR. Como primer método exploratorio, se realizó una prueba t pareada para esos siete genes y puede encontrarse en la Figura 4. Cinco genes tuvieron una tendencia ascendente en las CC de un ovocito que resultó en un embarazo (valor P <0,05; solo los valores de P <0,07 son significativos después de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples): EFNB2 (única diferencia significativa entre embarazo y ausencia de embarazo), CAMK1D, GSR y PGR. GSTA4, GPX3 y GSTA3 tenían todos los valores de P > 0,05. Se calculó el factor de cambio entre las CC del mismo paciente y se hizo un promedio por gen (de 1,1 a 2,5) (Tabla 7). Para los cinco genes con un valor P <0,1 en la prueba t pareada, el porcentaje de CC estimado

correctamente fue de 71 % al 88 %, según el nivel esperado (por ejemplo, se espera una mayor expresión en las CC relacionadas con embarazo en comparación con las no relacionadas con embarazo) de la prueba t pareada. En una siguiente etapa, se usó el poder predictivo de los modelos multiparamétricos (el modelo de 3 genes (=Modelo 1) y el modelo de 5 genes (=Modelo 2)) obtenidos en el análisis interpacientes (47 muestras de CC) para clasificar las CC de cada paciente (Tabla 6) por su posibilidad de embarazo. Como todas las características de los pacientes y del ciclo son idénticas para los ovocitos dentro de un solo ciclo de recuperación, obviamente no tiene sentido usar modelos que contengan esas variables. Todas las CC, excepto para el paciente 4, se clasificaron correctamente (Tabla 7) por su probabilidad de embarazo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Resultado fresco/FRET		Análisis génico simple										Multiparamétrico	
		EFNB2	CAMK1D	GSR	PGR	GSTA4	GSTA3	GPX3	Modelo 1	Modelo 2	Clasificación	Clasificación	
Paciente 1	Fresco	relación	3,4	3,5	1,8	2,1	1,4	5,4	0,7	2	2		
	FRET	embarazo clínico								1	1		
Paciente 2	Fresco	relación	4,9	4,9	2,3	4,0	2,6	0,0	2,9	2	2		
	FRET	embarazo clínico								1	1		
Paciente 3	Fresco	relación	1,8	1,8	1,6	1,8	1,4	0,0	0,6	2	2		
	FRET	embarazo clínico								1	1		
Paciente 4	Fresco	relación	1,6	1,8	1,4	3,6	0,7 ^a	1,1	1,0	1 ^b	1 ^b		
	FRET	embarazo clínico								2 ^b	2 ^b		
Paciente 5	Fresco	relación	4,1	3,2	4,1	1,5	1,2	1,2	1,0	2	2		
	FRET	Nacido vivo								1	1		
Paciente 6	Fresco	relación	1,4	1,3	1,3	1,0 ^a	1,3	1,2	0,8	3	3		
	FRET	ausencia de embarazo								2	2		
	FRET	embarazo clínico								1	1		
Paciente 7	Fresco	relación	2,3	2,8	2,9	2,8	3,1	1,6	1,3	2	2		
	FRET	Nacido vivo								1	1		
en base a la prueba t pareada esperada más alta en:			embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	embarazo	
Promedio:			2,5	2,5	2,0	2,0	1,6	1,6	1,1				
Mín:			1,0	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6					
Máx:			4,9	4,9	4,1	4,1	3,1	3,1	2,9				
% nivel correcto: ed predicciones basadas en la expresión			86	86	86	86	71	na	na	86 %	86 %		
Prueba t pareada del valor de P:			0,006	0,026	0,037	0,033	0,074	ns	ns				

Tabla 7: Comparación de los niveles de expresión génica de ciclos frescos que no resultan en embarazo con ciclos de transferencia congelada que resultan en embarazo (Análisis intrapaciente).

Esta tabla ofrece una visión general de los análisis intrapaciente. Cada línea representa un complejo de cúmulos. Se analizaron 2 o 3 complejos de cúmulos de 1 ciclo de recuperación por paciente. Las relaciones de los niveles de expresión génica siempre están las de embarazo respecto a en ausencia de embarazo. Para el paciente 6, el complejo de cúmulos del ciclo de FRET con embarazo se comparó con los complejos de cúmulos del ciclo fresco y en ausencia de embarazo de FRET. Los modelos 1 y 2 son respectivamente los modelos construidos con 3 y 5 genes de la Tabla 5. La clasificación se obtuvo mediante inserción de los valores de expresión en los modelos matemáticos de la Tabla 6. El número en la clasificación de '1' es el ovocito con la mayor probabilidad de lograr el embarazo. ns: no significativo; na: no aplicable; nlr: sin relación lineal. ^a: el valor de expresión no es mayor o menor entre embarazos y ausencia de embarazos como se esperaba en base a los resultados anteriores. ^b: la clasificación no es correcta con el uso de los modelos multiparamétricos. FRET: ciclo de transferencia de embriones congelados.

Discusión

En el presente estudio se analizó la expresión de 12 genes en las CC y su capacidad para predecir el potencial de embarazo del ovocito que rodea. Tres genes (*CAMK1D*, *EFNB2* y *STC1*) fueron incluidos de un estudio previo (Wathlet y otros 2012), donde se perfilaban como los más predictivos para la predicción del embarazo. *EFNB2* además se reguló significativamente en el estudio actual en las CC de los ovocitos que dieron embarazo y *CAMK1D* mostró la misma tendencia ($P= 0,0068$). El modelo compuesto por genes solo del conjunto de datos del paciente anterior, mediante el uso de *CAMK1D*, *EFNB2* y *STC1*, fue validado en este grupo de pacientes independientes y produjo un rendimiento general similar del modelo, con precisiones de 72 % en el estudio actual y de 79 % en el estudio anterior. Además de *EFNB2* y *CAMK1D* provenientes de nuestro estudio anterior, dos genes recientemente estudiados, *GSTA4* y *RSG*, mostraron además una tendencia de regulación por aumento en las CC del grupo de embarazo.

Un enfoque multiparamétrico probó si sería posible predecir un nacimiento vivo mediante el uso de solo 3 de los 12 genes probados en el conjunto de muestras actual (análisis interpacientes). Los 3 genes más predictivos fueron *GSTA4*, *PGR* y *EFNB2* y resultaron en una precisión similar a la del modelo anterior con *EFNB2*, *CAMK1D* y *STC1* (73 % contra 72 %). Mediante el uso de tres genes, ninguna de las características del paciente o del ciclo pudo mejorar el modelo, lo que sugiere que la expresión de los tres genes estuvo mínimamente influenciada por los factores del paciente y del ciclo. El modelo de nacidos vivos podría mejorarse al incluir dos genes más (*GPX3* y *GSTA3*), lo que aumentó la exactitud hasta en 81 % y resultó en un AUC de 0,93. Este modelo de 5 genes se mejoró con tres características del paciente y del ciclo (edad, E2 relativo y días de estimulación) y resultó en un modelo optimizado con un PPV, un NPV y una exactitud de 93 %, pero un AUC similar a la del modelo que solo contiene genes. Idealmente, la predicción de embarazo basada en la expresión génica debería ser posible con un conjunto limitado de genes para reducir el tiempo y el costo del análisis. De los 12 genes probados en esta población de pacientes, los 2 genes más recurrentes son *GSTA4* y *EFNB2* (ver la Tabla 5). Estos 2 genes están presentes en los 3 modelos de embarazo y tienen respectivamente en 3 de 3 y en 2 de 3 modelos predictivos un valor de P de tipo III $<0,01$. Los modelos también mostraron que los valores de expresión génica son siempre más importantes que las características del ciclo y del paciente, ya que los valores de P de tipo III en los modelos solo son significativos para los genes y no para las características del ciclo y del paciente. Además, los resultados de AUC son comparables entre el modelo que contiene solo genes y el modelo que combina genes y características del ciclo y del paciente.

Para 7 pacientes, se analizaron 2 (o 3) CC de ovocitos que dieron embriones con una buena morfología y se transfirieron consecutivamente (análisis intrapaciente). Para todos los ovocitos, se conoció el resultado del embarazo ya que todas las transferencias de embriones se realizaron en ciclos de SET posteriores. Al haber evaluado la expresión de 7 genes (*EFNB2*, *CAMK1D*, *RSG*, *PGR*, *GSTA4*, *GSTA3* y *GPX3*), fue fácil estimar, en base a genes individuales o en una combinación de ellos en un modelo, qué ovocito de los dos considerados tendría la mayor probabilidad de embarazo. Las mejores predicciones, al observar cada gen individualmente, se encontraron para *CAMK1D*, *RSG*, *EFNB2*, *PGR* y *GSTA4* con 71 % a 86 % de estimaciones correctas. Al combinar 3 o 5 genes, de acuerdo con los modelos anteriores, 6 de las 7 pacientes tenían los complejos de cúmulo que predecían correctamente la posibilidad de embarazo. Esta predicción fue la misma cuando se usó el modelo de 3 o 5 genes. Sorprendentemente, el modelo multiparamétrico falló en un paciente diferente al del análisis de un solo gen. El enfoque multiparamétrico parece más fuerte que los genes individuales, ya que todos los genes predijeron incorrectamente el resultado del embarazo para la segunda comparación de la paciente 6, pero el modelo multiparamétrico predijo con éxito, especialmente porque las CC de los ovocitos que resultaron en embarazo no se consideraron para construir el modelo predictivo. La predicción fallida del enfoque multiparamétrico para la paciente 4, en la que los genes individuales eran correctos en 4 de 5, podría deberse a otros factores (por ejemplo, el estado del endometrio en el momento de la transferencia). Aunque este análisis todavía está limitado en el número de pacientes, estos resultados son alentadores. Este es el primer estudio que confirma que algunos genes que predicen el embarazo interpacientes pudieran además clasificar la calidad de los ovocitos dentro de las pacientes mediante el uso de un enfoque multiparamétrico y brindar una posibilidad de embarazo para cada ovocito. El análisis de la expresión génica de las CC pudiera convertirse en una herramienta valiosa en el laboratorio de las ART, pero obviamente no tiene en cuenta la influencia eventual de la mala calidad del esperma y el endometrio fuera de fase.

Este estudio podría confirmar el uso de genes predictivos encontrados anteriormente en una nueva población de pacientes, con el mismo protocolo de estimulación, pero con diferentes medios de cultivo. Este dato sugiere que *EFNB2* y *CAMK1D*, los únicos genes que analizamos en dos estudios que usaron dos medios de cultivo diferentes, no se vieron afectados por los medios de cultivo. Para probar la validez de los modelos actuales, un análisis futuro debería involucrar a pacientes con diferentes protocolos de estimulación y diferentes medios de cultivo. Las razones por las que los genes específicos de este estudio son importantes para la predicción del embarazo permanecen especulativas. Como se mencionó anteriormente (Wathlet y otros 2012), *CAMK1D* puede, entre otras vías, estar relacionado con la esteroidogénesis por su fuerte correlación con genes relacionados con esteroides (*CYP11A1*, *STC2* y *HSD3B1*). En este conjunto de datos *CAMK1D* se correlacionó además fuertemente con un gen relacionado con esteroides, es decir *PGR* junto a *EFNB2* y *GSTA4* (todos $P < 0,0001$ con análisis de correlación de Pearson) lo que aún deja abiertas las posibilidades para más de una vía con la cual *CAMK1D* podría estar asociado. La presencia de *PGR* en los modelos de embarazo y su poder predictivo dentro de los pacientes pudiera indicar que los genes relacionados con los esteroides podrían ser útiles en la predicción del embarazo. *PGR* se ha descrito antes, pero no pudo confirmarse ninguna diferencia entre embarazo y ausencia de embarazo con PCR cuantitativa (Hamel y otros 2010b). *GSTA3* que estuvo presente en algunos de los modelos de embarazo tiene además un vínculo con la producción de progesterona (Raffalli-Mathieu y otros 2008) lo que reitera la importancia de la vía de la esteroidogénesis. La función de *EFNB2* en el ovario aún no se conoce, pero se propuso que las efrinas de clase B están relacionadas con el proceso de luteinización (Egawa y otros 2003) y el receptor de efrina B2 se expresó de manera diferente entre las CC de ovocitos normales en comparación con ovocitos aneuploides (Fragouli y otros 2012b). De los otros genes probados, solo los miembros de la familia del glutatión se retuvieron en los modelos o fueron significativos en la prueba t. Las enzimas de glutatión son importantes para las acciones de desintoxicación (de radicales libres) en las células mediante el uso del glutatión. La hipoxia conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas y daño celular, lo que resulta en apoptosis (Buttke y Sandstrom 1994) no solo en las CC, sino también en el ovocito (Tatemoto y otros 2000). Otros grupos ya han informado que el estrés oxidativo es una posible diana para evaluar la calidad de los ovocitos (Lee y otros 2010; Van Montfoort y otros 2008). Una de las razones por las que algunos transcritos de esas vías son más altas en las CC de los ovocitos que dan embarazo pudieran ser que esos ovocitos están mejor protegidos contra un entorno estresante si es necesario.

Conclusión

Al probar genes presumiblemente importantes por lotes en tres estudios consecutivos en diferentes grupos de pacientes para los cuales los complejos de cúmulos se congelaron individualmente por ovocito, tuvimos los genes más predictivos para el embarazo y los confrontamos cada vez a nuevos genes candidatos. Esta estrategia de "cascada" intentó aumentar el poder de predicción de embarazo mediante el uso de la expresión génica de las CC como marcador de calidad de los ovocitos en la ART. La estrategia demostró ser efectiva como el modelo con *EFNB2*, *CAMK1D* y *STC1*, del segundo estudio (Wathlet y otros 2012) podría confirmarse en un conjunto de muestras de pacientes independientes. En un intento de mejorar aún más los modelos de predicción para nacidos vivos, se construyeron modelos (análisis interpacientes), que aún retienen *EFNB2* junto con *PGR* y genes relacionados con el metabolismo del glutatión. Estos nuevos modelos demostraron ser capaces de clasificar los ovocitos según su potencial para embarazo y nacidos vivos (Análisis intrapacientes). La validez de nuestros modelos actuales, para la aplicación de rutina, aún necesita una evaluación prospectiva en una población de pacientes más grande y diversa que permita el análisis intrapacientes.

Ejemplo 2 - Análisis a nivel de exones

Se realizaron tres experimentos de micromatrices y los datos resultantes resultaron en 4 análisis de micromatrices. Denominados respectivamente más abajo análisis de micromatrices 1, 2, 3 o 4 (ver la tabla 14 más abajo). Los experimentos de arreglos 1 y 2 se usaron para la extracción de datos (para encontrar genes o exones de genes que predican la competencia de los ovocitos) y el experimento del arreglo 3 se usó para filtrar los genes predictivos recurrentes (encontrar genes o exones que son de aplicación más general en tanto son predictivos en diferentes centros de fertilidad y después de tratamientos ligeramente diferentes). El análisis más novedoso se basa en el experimento 2 de micromatrices, que comprende un análisis intrapaciente e intraciclo para nacidos vivos (ovocitos de la misma cohorte de estimulación).

Material:

Para los tres experimentos de micromatrices, se recolectaron células del cúmulo como se describió anteriormente (Wathlet y otros 2011). El ARN se extrajo mediante el uso del micro kit Qiagen Rneasy como se describe en Wathlet y otros, 2011. La calidad y cantidad del ARN se verificó mediante el Bioanalizador (Agilent) y el Nanodrop (Thermo Scientific).

Para los micromatrices en el primer conjunto, la amplificación se realizó a partir de 100 ng de ARN total y una amplificación basada en T7 de 1 ronda (Message Amp II-Biotin Enhanced, Ambion). Se verificó ARN de buena calidad (distribución de tamaño, relación 3'/5' y % de llamadas presentes) y se realizaron arreglos del genoma

humano U133 Plus 2.0 de Affymetrix en el Instituto Salk (Estados Unidos, San Diego). Se realizó un análisis adicional de las lecturas de salida de genes mediante el uso de Genesifter (Perkin Elmer). Para el experimento de los Arreglos 2 y 3, se extrajo, midió y evaluó el ARN como se mencionó anteriormente, pero la amplificación se realizó mediante el uso del kit Nugen V2. Los arreglos fueron, tanto para el experimento del arreglo 2 como para el 3, los arreglos de genes humanos ST de Affymetrix. Los datos se analizaron principalmente en Microsoft Excel.

Método:

La comparación intrapaciente comprende que tanto la muestra positiva (CC de un ovocito que resultan en un embarazo en una transferencia de un solo embrión) como la muestra negativa (CC de un ovocito que no resulta en un embarazo después de la transferencia de un solo embrión) provienen de la misma paciente y la misma estimulación y ciclo de recogida.

Se realizó la comparación o análisis uniparamétrico con prueba t regular o pareada y multiparamétrico mediante el uso del análisis de multirregresión paso a paso. El enfoque multiparamétrico resultó en combinaciones de genes o exones que aumentan el poder predictivo.

Objetivo:

Encontrar genes o variantes de corte y empalme de genes (exones) predictivos de nacidos vivos después del tratamiento de las ART. Esto se hace en una comparación intrapaciente,

Configuración y primeros resultados (Análisis de arreglos 1 y 2):

El experimento del arreglo 1, realizado en 2006, comprendió una comparación interpacientes para nacidos vivos y una comparación intrapaciente para el desarrollo del embrión. El pretratamiento del paciente fue un agonista de GnRH combinado con HP-hMG. Esto resultó en 2 listas de calidad: que comprenden más de 500 genes ("Q1" = genes predictivos para el desarrollo exitoso de ovocitos y embriones, "Q3" = genes predictivos para nacidos vivos)

El análisis del arreglo 2 se realizó en enero de 2012 y consistió en un análisis intrapaciente para nacidos vivos y desarrollo retrasado para 5 pacientes y 15 arreglos, y resultó en varias listas con genes regulados diferencialmente. En este caso, los pacientes fueron pretratados con antagonista de GnRH y FSH recombinante. El experimento del arreglo 3 solo se usó como un conjunto de datos de confirmación en el análisis de micromatrices 4 y se describe con más detalle más abajo.

Tabla 14: Experimentos de micromatrices por FOBI

Análisis	Tiempo	Ajuste	Pretratamiento del paciente	Parámetros	Resultado
1	2006	comp. intra e interpacientes	Agonista de GnRH + HP-hMG	sin desarrollo >< Nacido vivo >< ausencia de embarazo	Q1 y Q3
2	Enero de 2012	comparación intrapacientes	Antagonista de GnRH + rFSH	retraso en el desarrollo >< nacido vivo >< ausencia de embarazo	lista de 1246, ...
3	Agosto de 2012	comparación interpacientes	Antagonista de GnRH + rFSH y HP-hMG	Nacido vivo >< ausencia de embarazo	
4	Diciembre de 2012	nuevo análisis de exp. 2+3 a nivel de exón	Antagonista de GnRH + rFSH y HP-hMG	retraso en el desarrollo >< nacido vivo >< ausencia de embarazo	Lista de genes 35 y 11

Análisis del arreglo 4: Nuevo análisis de los datos del micromatriz del experimento del arreglo 2+3 a nivel de exones

En la búsqueda de genes expresados en las células del cúmulo predictivas de embarazo, sorprendentemente encontramos que, para algunos genes, combinaciones específicas de variantes de corte y empalme para estos genes fueron predictivos. Este hallazgo no es evidente con los 2 métodos de análisis más estándar, micromatrices y Q RT-PCR, actualmente disponibles en el laboratorio, como se explica más abajo.

En este campo de investigación, el análisis de micromatrices más comúnmente aplicado (arreglos de Genoma Humano U133 Plus 2 de Affymetrix y Genes Humanos ST de Affymetrix) evalúa/considera un valor de expresión generalizado (promedio) obtenido por gen, en base a 4 o más sondas que reconocen alguna parte del ARN codificante y no codificante relacionado con un gen específico. Este número refleja la abundancia o ausencia de una gran cantidad de moléculas de ARN relacionadas con un gen específico, pero no brinda información sobre la regulación de variantes de corte y empalme específicas.

La técnica de análisis "estándar" alternativa, la PCR cuantitativa después de la transcripción inversa (RT-QPCR), por otro lado, normalmente solo, analiza la abundancia de 1 exón, lo que corresponde para la mayoría de los genes a evaluar solo una fracción específica de las variantes de corte y empalme de este gen específico.

La investigación específica de más de 1 variante de corte y empalme es relevante, ya que las variantes de corte y empalme específicas podrían codificar formas específicas de tejido (por ejemplo, específicas de células del cúmulo) o secretadas o formas más activas de la proteína. Las variantes de corte y empalme alternativas (a menudo formas más cortas) pueden además tener una función reguladora y, de hecho, regular por disminución la cantidad o el efecto de la proteína. Por lo tanto, combinar la información de diferentes variantes de corte y empalme para un gen específico contiene más información, pero además requiere más tiempo y recursos para investigar y no se hace comúnmente.

No obstante, en el presente estudio volvimos a analizar los experimentos de arreglos anteriores a nivel de exones. En este experimento, los genes que predicen una fecundación exitosa, el desarrollo del embrión y la implantación a nivel de exones se seleccionaron en el experimento del arreglo 2 como se describe más abajo.

Las muestras:

Se realizaron quince micromatrices de Affymetrix en 15 muestras de cúmulos de cinco pacientes de ICSI. Las CC se originaron a partir de ovocitos que resultaron en 3 categorías de resultados: 1. un embrión con una puntuación morfológica alta (calidad de embrión 1) que se transfirió y resultó en un embarazo (P-CC) 2. un embrión con una puntuación morfológica alta (calidad de embrión 1) que se transfirió, pero no resultó en un embarazo (NP-CC) y 3. un embrión que se desarrolló demasiado lento para ser considerado para la transferencia (NT-CC).

Las pacientes consideradas para este estudio fueron estimuladas con antagonista de GnRH y rFSH y no estaban embarazadas desde la primera transferencia de un solo embrión y regresaron para la transferencia de un solo embrión congelado que resultó en un embarazo. Como tales, las muestras de CC de la categoría 1, 2 o 3 se originaron en 1 ciclo de recogida y esto permitió un análisis intrapaciente.

El análisis:

Este análisis se realizó a nivel de exones. Se realizaron cuatro comparaciones, 3 veces una ANOVA que comparó las 3 condiciones, 1 vez 2 pruebas t se realizaron mediante comparación de la mejor condición, el P-CC con el NP-CC y el P-CC con el NT-CC. La variable paciente se consideró como variable aleatoria en la comparación de la prueba t, y fue una vez aleatoria y otra fija en el análisis ANOVA de 5 pacientes y se consideró aleatoria en la comparación del ANOVA de 3 de los 5 pacientes (al considerar solo los pacientes que se transfirieron el día 5 y no los 2 pacientes que se transfirieron el día 3).

Los genes se consideraron potencialmente interesantes si estaban: a) expresados diferencialmente entre P-CC y tanto en NP-CC como NT-CC, b) en la misma dirección diferente (por ejemplo, hacia abajo en las 2 muestras de control negativo), c) al menos uno de la diferencia fue $>1,5$ con $aq < 0,1$ (tasa de descubrimiento falso) y d) se retuvo más de un exón de ese gen.

Los resultados:

Esto resultó en una lista de 34 genes que fue objeto de esta solicitud de patente. Estos fueron después complementados con los hasta ahora once genes más fuertes de las listas anteriores (Q1 + 2 + 1246 - tabla 14 anterior) lo que resultó en la lista de 45 (Tabla 13). Estos se filtraron a nivel de exón en el experimento del arreglo 3 mediante el uso de un análisis de regresión múltiple paso a paso. En resumen, en el experimento del arreglo 3, 112 micromatrices estaban disponibles de CC individuales de 112 pacientes que estaban embarazadas o no después de un ciclo de transferencia de un solo embrión (ciclo SET). Todos los valores de exones de los genes de la tabla 13 en estos 112 pacientes se consideraron para la construcción del modelo de predicción mediante el uso de un análisis de regresión múltiple paso a paso. Esto se hizo en varias rondas para compensar un número demasiado alto de variables y se realizó mediante validación cruzada para evitar un ajuste excesivo. Esto condujo a la retención de las combinaciones más potentes de genes, lo que dio lugar a la "lista de 11 genes" (SASH1, MROH9, NCOA7, DNAH3, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, GALNTL6, SPTBN5, exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D, EFN2). (Tabla 8)

La "lista de 11 genes" consiste en las combinaciones de genes a nivel de exones más predictivas y, por lo tanto, es el núcleo de la presente solicitud. La "lista de 45 genes" original contiene otros genes que están relacionados con ellos y finalmente podrían reemplazar uno o más de los 11 genes si es necesario. Un ejemplo de esto se da más abajo y se discute con más detalle en la Tabla 11. En resumen, se encontró que un fuerte modelo de predicción de competencia de ovocitos para pacientes estimuladas con antagonistas de GnRH y rFSH contenía exón 9 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1 y NCOA7 (Exactitud = 73 % ROC-AUC = 0,733), pero para las mismas pacientes un

modelo con exón 9 de CAMK1D, exón 6 de HSPH1 y NCOA7 además predijeron la competencia de los ovocitos, aunque fue un poco menos potente (Precisión = 68 % ROC-AUC = 0,714).

Tabla 8

Gen	Exón	Secuencia de referencia:Región	SEQ ID No
SASH1	Exón 12	NT_025741.15: 53010140-53010486	19
NCOA7	Exón 1	NT_025741.15: 30271764-30271974	20
NCOA7	Exón 2	NT_025741.15: 30276740-30276816	21
CAMK1D	Exón 1	NT_008705.16: 12331541-12331909	22
CAMK1D	Exón 9	NT_008705.16: 12798249-12798327	23
SPTBN5	Exón 8	NT_010194.17: 12966103-12966241	24
MROH9	Exón 14	NT_004487.19: 22454290-22454427	25
HSPH1	Exón 2	NT_024524.14: 12715613-12716117	26
HSPH1	Exón 6	NT_024524.14: 12705084-12707088	27
DNAH3	Exón 21	NT_010393.16: 21057811-21057995	28
GALNTL6	Exón 16	NT_016354.19: 98420909-98421130	29
EFNB2	- ---	a nivel de gen	
NCOA7* además a nivel de gen. Puede usarse cualquiera de los exones.			

Conclusiones:

Varios genes y exones específicos de genes se han relacionado con éxito con nacidos vivos vivo y el desarrollo de embriones en experimentos de arreglos que incluyen pacientes que se someten a diferentes tratamientos previos y estos se confirmaron además en un conjunto de datos de arreglos independiente (experimento del arreglo 3). La fortaleza del 3^{er} experimento de arreglo radica en el hecho de que se realizó en muestras de tres sitios europeos diferentes. Como tal, el subconjunto final de genes retenidos debería tener una aplicación más universal que cualquier combinación de genes conocida hasta ahora. Para probar esto, se realizaron dos experimentos de confirmación con la partida de este subconjunto de 11 genes, para demostrar la capacidad de los genes anteriores para predecir la competencia de los ovocitos. El primer experimento de confirmación ha sido un estudio retrospectivo, que incluye un análisis intra e interpaciente y el segundo estudio ha sido un estudio prospectivo en 3 grupos de pacientes.

Ejemplo 3 - Estudio retrospectivo

El estudio retrospectivo se realizó con muestras recolectadas de 107 pacientes en dos centros clínicos. La QPCR se realizó específica de exones para 7 marcadores de calidad de ovocitos, de la lista de 11 genes (exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D, EFNB2, NCOA7, SASH1) y 2 controles endógenos (UBC y B2M) en tres lotes diferentes (Tabla 9).

Tabla 9: Las muestras disponibles para los estudios de prueba de concepto... B1/2/3= lote 1/2/3, sitio 1+2 = centro de fertilidad europeo y americano, pretratamiento del paciente= antagonista de GnRH combinado con rFSH o HP-hMG y el resultado de embarazo = embarazo al menos 2 semanas después de la transferencia, ausencia de embarazo. = ausencia de embarazo después de la transferencia, retrasado = desarrollo lento del embrión y no considerado para la transferencia

	análisis interpacientes				intrapaciente
Conjunto de muestra	B1	B2	B3A	B3B	B1+2+3
Sitio	1	1	1	2	1+2
# Pacientes	60	26	14	7	11
Anta+rFSH	X	x	x	x	x
Anta+HP-hMG		x	x	x	
Embarazo	37	15	15	14	8
Ausencia de embarazo	27	17	8	9	7
Retraso	34	12	4	14	8
Total	98	44	27	37	23

Colección de células del cúmulo:

Las muestras de células del cúmulo se recolectaron en un Centro de Fertilidad europeo y otro estadounidense (Tabla 9) y provienen de pacientes que recibieron un embrión por transferencia (SET = Transferencia de un solo embrión) y demostraron estar embarazadas o no. Esto permitió la comparación retrospectiva de las CC de ovocitos competentes y menos competentes. Este es el enfoque más obvio, pero los ovocitos se originan en diferentes pacientes (= análisis interpacientes) y esto resulta en alguna variación interpacientes que no se controla. Además, hubo un subgrupo de pacientes que obtuvieron 2 o más transferencias consecutivas de un solo embrión a partir de un solo procedimiento de recolección de ovocitos (recogida), que resultó en un embarazo o no y, por lo tanto, permitió además en el estudio retrospectivo una comparación intrapaciente de las CC.

Se han recolectado tres tipos de muestras de células del cúmulo: muestras de ovocitos cuyo embrión se transfirió y condujo a un embarazo, muestras de embriones de buena calidad que se transfirieron, pero no resultaron en un embarazo y muestras de cúmulo de embriones retrasados. Los embriones retrasados son embriones que se desarrollan más lentamente, lo que se considera indicativo de una competencia deficiente de los ovocitos y, por lo tanto, estos embriones no se consideran para la transferencia. Las células del cúmulo de embriones retrasados se usaron como control negativo intrapaciente para aquellas pacientes que tenían un ovocito que dio un embarazo. La distinción entre las CC de embriones morfológicamente idénticos que resultan en embarazo y no (más adelante denominado como embarazo contra ausencia de embarazo) se considera más importante que la distinción entre las CC de ovocitos que conducen a un embarazo o a un embrión retrasado durante el desarrollo in vitro (más adelante denominado además "desarrollo embrionario retrasado contra embarazo") ya que esta última información ya está disponible para los laboratorios que realizan cultivos de embriones extendidos.

Todas las pacientes se sometieron a estimulación ovárica con antagonista de GnRH y rFSH o HP-hMG y se analizaron inicialmente por grupo de tratamiento.

Estadísticas:

Durante el análisis estadístico, primero se usó un enfoque uniparamétrico con pruebas t de Student (pareadas y no pareadas). En segundo lugar, se construyó un modelo multiparamétrico de validación cruzada con el uso de análisis de regresión múltiple paso a paso para una respuesta binaria.

Resultados 1.: análisis intrapaciente

a) uniparamétrico: Desarrollo embrionario retrasado contra embarazo

En el análisis uniparamétrico (prueba t pareada) entre las CC de ovocitos que resultaron en un embarazo o un retraso en el crecimiento del embrión (n=8), estudiamos 7 genes y encontramos una regulación por aumento constante en 4 de los 7 genes (Tabla 10). El exón 1 de CAMK1D y NCOA7 aumentaron en 88 % de los casos, mientras que el exón 9 de CAMK1D y SASH1 aumentaron en 75 % de los pacientes. Sin embargo, no se alcanzaron diferencias significativas (los valores de p de la prueba t pareada oscilaron entre 0,14 y 0,24), debido a la gran variación interpacientes.

b) Uniparamétrico: Embarazo contra ausencia de embarazo

En la comparación entre las CC de los ovocitos que resultaron en un embarazo o no de la misma paciente (n=7), 3 de los 7 genes que se estudiaron mostraron una regulación por aumento constante en 71 a 86 % de las pacientes: EFNB2, exón 1 de CAMK1D y exón 9 de CAMK1D. Se alcanzó significación con exón 1 de CAMK1D (p 0,021). Un gen, exón 6 de HSPH1, mostró una regulación por disminución constante en 71 % de las pacientes.

Este primer análisis intrapaciente confirma una regulación por aumento de un gen marcador de calidad de ovocitos conocido, CAMK1D, en las CC de los ovocitos que resultan en un embarazo en comparación con las CC de los ovocitos que resultarán en embriones de buena morfología que no conducirán a un embarazo o a embriones retrasados de la misma paciente. Estos resultados confirman además la relevancia de tres nuevos genes: NCOA7, SASH1 y HSPH1.

Tabla 10: n= número de pacientes, #ok= % de pacientes que tienen una regulación por aumento o por disminución, en embarazo= en pacientes embarazadas el gen se regula por aumento o disminución

Embarazo>< retrasado				Embarazo>< ausencia de embarazo			
n	gen	#ok	en embarazo valor de p	n	gen	#ok	en embarazo valor de p
8	HSPH1 ex2	50%		7	HSPH1 ex2	57%	
8	HSPH1 ex6	63%	por disminución 0,22	7	HSPH1 ex6	71%	por disminución 0,45
8	EFNB2	50%		7	EFNB2	71%	por aumento 0,14
8	CAMK1D ej1	88%	por aumento 0,17	7	CAMK1D ex1	86%	por aumento 0,021
8	CAMK1D ej9	75%	por aumento 0,14	7	CAMK1D ex9	71%	por aumento 0,27
8	NCOA7	88%	por aumento 0,24	7	NCOA7	57%	por aumento
8	SASH1	75%	por aumento 0,27	7	SASH1	43%	por aumento 0,31

Los resultados anteriores en un entorno similar indicaron que un enfoque multiparamétrico aumenta el número de muestras pronosticadas correctamente (Wathlet y otros, 2013). Por lo tanto, realizamos además un análisis intrapaciente multiparamétrico en las mismas muestras.

c) Multiparamétrico: Embarazo contra desarrollo embrionario retrasado o ausencia de embarazo

El análisis multiparamétrico más sofisticado resultó en un sólido modelo predictivo de embarazo con EFNB2 y NCOA7, que mostró una exactitud de 73 % y un ROC-AUC de 0,772. Más abajo se proporcionan resultados más detallados (Tabla 11 y Figura 5). Esto confirmó aún más la calidad predictiva de los genes de las CC, nuevos y conocidos, como marcadores de calidad de los ovocitos.

Resultados 2: Análisis interpacientes

Para aumentar el tamaño de la muestra, se realizaron además análisis interpacientes en muestras de 2 sitios. Este análisis adicional debería proporcionar modelos de aplicación más general.

Mientras que los mismos genes predicen la competencia de los ovocitos en pacientes estimuladas con antagonista de GnRH y rFSH o HP-hMG, la relación es inversa para algunos genes (por ejemplo, CAMK1D en las Figuras 6 y 7). Para facilitar la interpretación, aquí se construyeron y describieron modelos específicos de pretratamiento. Posteriormente, estos se combinarán en un modelo matemático con índices específicos de tratamiento (aplicados anteriormente en Adriaenssens y otros 2010).

a) Pacientes estimuladas con antagonistas de GnRH y rFSH, embarazo contra desarrollo embrionario retrasado

El análisis intrapaciente indicó que cuatro de los siete genes analizados aquí podrían usarse para distinguir las CC de un ovocito que conducen a un embarazo o a un embrión retrasado en el desarrollo. Sin embargo, en las pacientes estimuladas con antagonistas de GnRH y FSHr actuales, la varianza interpacientes parece impedir la construcción de un modelo matemático sólido. La adición de un gen extra de la lista de 45 podría evitar esto.

b) Pacientes estimuladas con antagonistas de GnRH y rFSH, embarazo contra ausencia de embarazo

Para las pacientes estimuladas con antagonista de GnRH y rFSH en los lotes 1, 2 y 3 (n = 34 pacientes embarazadas y 29 no embarazadas), se obtuvo un modelo predictivo sólido de calidad de ovocitos que contenía 3 genes. Dos genes, exón 9 de CAMK1D y exón 2 de HSPH1, se correlacionaron positivamente con el embarazo y NCOA7 se correlacionó negativamente. Más abajo se proporcionan resultados más detallados (Tabla 11 y Figura 6). La exactitud de este modelo fue de 73 % y AUC de 0,733. Este modelo se usa actualmente en el estudio prospectivo para pacientes estimuladas con antagonistas de GnRH y rFSH.

c) Pacientes estimuladas con antagonistas de GnRH y HP-hMG, embarazo contra desarrollo embrionario retrasado

Se encontró que el modelo multiparamétrico para pacientes con antagonista de HP-hMG que distingue las CC de los ovocitos que conducen a un embarazo de las CC de los ovocitos que conducen a un embrión con un desarrollo retrasado (n=20), tuvo una alta exactitud (80 %) y AUC (0,8081). SASH1 se correlacionó positivamente con el embarazo y exón 1 de CAMK1D se correlacionó negativamente con el embarazo. Más abajo se proporcionan resultados más detallados (Tabla 11 y Figura 7). La expresión de SASH1 se correlacionó además con la expresión de exón 9 de CAMK1D, NCOA7. La expresión de exón 1 de CAMK1D se correlacionó con la expresión de exón 9 de CAMK1D.

d) Pacientes estimuladas con antagonista de GnRH y HP-hMG, embarazo contra ausencia de embarazo

El modelo multiparamétrico de embarazo contra ausencia embarazo en pacientes con agonistas de GnRH y HP-hMG (n = 24) fue además sólido (Exactitud = 75 % y AUC = 0,8392) y mayormente, además, estaba en dependencia de la relación positiva de la expresión de SASH1 con la competencia de desarrollo del ovocito (no se muestra la figura detallada).

Tabla 11: Perspectiva general esquemática de los modelos de genes (nivel de exones donde sea relevante) y sus valores predictivos en las diferentes subpoblaciones en el estudio de QPCR retrospectivo

Pretratamiento del paciente		Antagonista rFSH	Antagonista rFSH	Antagonista* rFSH	Antagonista HP-hMG	Antagonista HP-hMG
Análisis		Intrapaciente	Interpacientes	Interpacientes	Interpacientes	Interpacientes
Criterios de valoración		Embarazo>> Sin embarazo	Embarazo>> Ausencia de embarazo	Embarazo>< Ausencia de embarazo	Embarazo>< retrasado	Embarazo>< Ausencia de embarazo
Genes en el modelo	EFNB2	X				X
	Exón 1 de CAMK1D				X	
	Exón 9 de CAMK1D		X	X		
	Exón 2 de HSPH1		X			
	Exón 6 de HSPH1			X		
	NCOA7	X	X	X		
	SASH1				X	X
Valor de p del modelo		0,0127	0,0159	0,0322	0,1988	0,0083
Genes correlacionados			Exón 9 de CAMK1D HSPH1 exón 6	Exón 1 de CAMK1D	Exón 9 de CAMK1D NCOA7	Exón 1 de CAMK1D
Ejecución del modelo	PPV	86	72	68	82	69
	NPV	63	75	68	78	81
	Sensibilidad	63	82	77	82	82
	Especificidad	86	62	59	78	69
	Exactitud	73	73	68	80	75
	AUC	0,7726	0,7333	0,714	0,8081	0,8392

*Los genes correlacionados son los genes que mostraron una fuerte correlación con los genes en el modelo y que por tanto no se seleccionaron por el análisis de regresión múltiple. Algunos de estos tienen además fuerte poder predictivo y podrían usarse como genes "adicionales" en la prueba. Esto se demuestra mediante el modelo alternativo de embarazo respecto a ausencia de embarazo interpacientes con el antagonista/rFSH, con reemplazo del exón 2 de HSPH1 por el exón 6 de HSPH1

Conclusiones del estudio retrospectivo:

El exón 9 de CAMK1D y EFNB2, ambos elegidos como genes de control positivo, están en el conjunto de datos actual confirmado tanto en el análisis intrapaciente como interpacientes.

La relación entre la competencia de los ovocitos y la expresión de genes patentables fue confirmada además por su implicación en modelos predictivos después de diferentes tipos de pretratamiento de las ART. El exón 2 de HSPH1 y NCOA7 se retienen en el modelo final para pacientes estimuladas con antagonista/rFSH. SASH1 es un poderoso

gen predictivo para pacientes estimuladas con antagonista/HP-hMG. El hecho de que exón 6 de HSPH1 y EFNB2 no se retengan en el modelo final no implica que estos marcadores no estén relacionados con la competencia de los ovocitos; ya que están correlacionados con otros marcadores (exón 6 de HSPH1 está correlacionado con exón 2 de HSPH1 y EFNB2 está correlacionado con la expresión de CAMK1D) y, por lo tanto, se rechazan del análisis de regresión.

Ejemplo 4 - Estudio prospectivo

Se realizó un estudio prospectivo enmascarado cegado del evaluador de casos y controles mediante el uso de 2 de los modelos predictivos de competencia de ovocitos descritos anteriormente (Figuras 6 y 7). El estudio comprendió 3 grupos de pacientes: el grupo experimental con clasificación embrionaria morfológica (como se describe en Wathlet y otros, 2012) y análisis de genes de las CC y transferencia de un embrión del día 3, y los 2 grupos de control con solo clasificación embrionaria morfológica y transferencia de un embrión del día 3 o del día 5. Se incluyen los 2 controles ya que las tasas de embarazo difieren entre los dos regímenes de transferencia. La transferencia del día 5 aumenta ligeramente las tasas de embarazo clínico en el primer ciclo, pero las tasas acumuladas de embarazo son más altas en los ciclos de transferencia del día 3 (Glujovsky y otros, Cochrane review, 2012).

El objetivo:

El objetivo fue identificar dentro de la colección de ovocitos obtenidos de cada paciente el ovocito con mayor competencia mediante comparación de la expresión de genes específicos en las CC que rodeaban a cada ovocito. El embrión procedente de este ovocito se transfirió de nuevo a la paciente. Se espera que el análisis de la expresión génica de las CC combinado con la graduación morfológica, aumente la probabilidad de embarazo para estas pacientes en comparación con pacientes correspondientes sin la evaluación de las CC (es decir, la elección del embrión para transferir solo se decide en la graduación morfológica embrionaria de rutina).

Población de pacientes y genes analizados:

Este estudio comprendió 17 pacientes. Las pacientes incluidas son pacientes de la clínica de las ART programadas para tratamiento de fertilidad con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y transferencia de un solo embrión después de 3 días de cultivo embrionario (generalmente un embrión en etapa de 8 células). Los pretratamientos de pacientes permitidos son antagonistas de GnRH más rFSH o HP-hMG y los modelos de expresión génica descritos en las figuras 5 y 6 se usan para estas pacientes respectivamente.

Los genes analizados (exón 9 de CAMK1D, exón 1 de CAMK1D, exón 2 de HSPH1, NCOA7, SASH1) se originaron a partir de la lista de 11 y 45 genes presentada en esta solicitud de patente.

Las diferentes etapas del procedimiento:

Este estudio comprendió las siguientes etapas:

1. Las pacientes se informaron e incluyeron cuando firmaron el consentimiento informado,
2. Los ovocitos se recolectaron de estas pacientes como de costumbre.
3. Los ovocitos se liberaron individualmente de sus células del cúmulo mediante el uso del cúmulo como de costumbre
4. Las células del cúmulo se procesaron o congelaron inmediatamente
5. Los ovocitos se usaron además para el tratamiento de la infertilidad (en el estudio actual: ICSI y cultivo de embriones) *
6. Se evaluó la expresión de genes específicos en las células del cúmulo
7. La puntuación de las CC obtenidas indicó potencialmente el ovocito más competente (con la mayor probabilidad de nacer vivo) y se usó para seleccionar el embrión más prometedor entre los embriones con el mejor grado morfológico disponible para cada paciente.
8. Este único embrión fue transferido de nuevo a la paciente **
9. Para cada paciente que obtuvo una transferencia de embriones basada en la expresión génica de las CC, se requiere una paciente compatible (misma categoría de edad, pretratamiento similar y que tenga la misma cantidad de embriones de buena calidad disponibles para la transferencia) con transferencia de embriones en el día 3 (generalmente un embrión de 8 células) y el día 5 (generalmente un blastocisto expandido) sin análisis de expresión génica de las CC se seleccionó de manera enmascarada por el evaluador.
10. Para los 3 grupos de pacientes (el grupo experimental y los 2 grupos de control) se evalúan las tasas de implantación y de embarazo.

Anotaciones: * esta etapa podría comprender la congelación de ovocitos para su uso posterior, finalmente en medios específicos complementados con nutrientes para compensar la deficiencia que se observó en el resultado de la expresión génica de las CC.

** la puntuación de la CC podría usarse de forma independiente o combinada con métodos de evaluación morfológicos u otros de ovocitos, espermatozoides o embriones

La evaluación de la expresión génica de las células del cúmulo:

La expresión de genes específicos se cuantificó en las CC de cada ovocito. La expresión absoluta de cada gen se normalizó para la expresión de 2 genes endógenos en la misma muestra de las CC para compensar las diferencias en el número de células y la variación técnica entre las muestras. Los valores de expresión normalizados se usaron en la fórmula matemática descrita en las figuras 6 y 7 y resultaron en una puntuación para cada ovocito. Cuanto más alta sea esta puntuación mayor será la probabilidad de que este ovocito resulte en un nacido vivo.

Resultados: tasas de embarazo cuando se utiliza la evaluación de ovocitos basada en la expresión génica de las CC

De los 17 pacientes, 8 tenían un antagonista de GnRH rFSH y 9 tenían un tratamiento previo con antagonista de GnRH HP-hMG. Es evidente un efecto beneficioso de la evaluación de las CC para los regímenes de transferencia del día 3 (Figura 7). La probabilidad de embarazo fue 2 veces mayor para las pacientes con transferencia de embriones del día 3 y la prueba con CC en comparación con aquellas pacientes con transferencia de embriones del día 3 sin la prueba con CC. El número de pacientes actualmente es demasiado limitado para confirmar la importancia de un aumento en comparación con las pacientes con una transferencia de embriones del día 5.

Tabla 12: Resultados interinos en el estudio prospectivo

Gris= las 17 pacientes en el grupo de tratamiento experimental, blanco= los 2 grupos de control, Significación= basado en la prueba de Chi cuadrado que compara el grupo experimental con cada uno de los grupos de control, ns= $p > 0,05$, embarazo = al menos 2 semanas de embarazo (2 detecciones consecutivas de hCG positivas)

Pretratamiento del paciente	Grupo experimental	Transferencia	Pacientes				Significación
			Total	embarazo	Ausencia de embarazo	Posibilidad de embarazo	
			#	#	#	%	
2 Tratamientos combinados	Prueba con CC	3	17	9	8	53	p<0,05 ns
	Control (Sin la prueba con CC)	3	17	4	13	24	
	5	17	8	9	47		

Conclusiones del estudio prospectivo:

La implementación del análisis de la prueba con CC en la clínica como se describió anteriormente aumentó significativamente la posibilidad de embarazo para las pacientes involucradas en el estudio y, por lo tanto, demuestra la relevancia de los genes que son objeto de la presente solicitud de patente.

Los modelos usados en este experimento de prueba de principio contenían 2 y 3 genes. A partir de experimentos anteriores con micromatrices (con más genes y más pacientes analizados), sabemos que añadir más genes (hasta al menos 5 o 6) mejorará aún más el poder predictivo de los modelos. Este trabajo está actualmente en curso con más genes de la lista en la patente actual.

Conclusión general:

La lista de 45 genes marcadores de calidad de los ovocitos se origina a partir de 2 experimentos de arreglos con pacientes de UZBrussel y se validó de forma cruzada con datos de un 3er experimento de arreglo independiente que contenía más de 100 pacientes de 3 centros de fertilidad europeos diferentes. Este enfoque debería proporcionar genes marcadores sólidos y combinaciones/modelos de genes para predecir el resultado del tratamiento.

Como prueba de concepto, se analizó un subconjunto de 7 genes, que contenían 4 genes nuevos, mediante el uso de una técnica alternativa (QPCR) en muestras de CC de pacientes nuevas, recolectadas en 2 centros de fertilidad. Los 4 genes se confirmaron como valiosos marcadores de calidad de los ovocitos. Esto confirma que la lista de genes propuesta contiene genes válidos para predecir la calidad de los ovocitos.

Finalmente, los modelos de genes se probaron en un estudio prospectivo en el que las tasas de embarazo aumentaron en las pacientes en las que los embriones se seleccionaron en función de la expresión de los genes marcadores de calidad de los ovocitos descritos anteriormente en las CC.

Este último estudio se realizó en pacientes de la clínica de las ART sometidas a un tratamiento estándar mediante ICSI y, por lo tanto, confirma la aplicabilidad de los marcadores de calidad de los ovocitos en un entorno clínico.

Referencias:

Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Jul 11;7

Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Janssens R, Coucke W, Devroey P y Smitz J, New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression, *Fertil Steril* 98, 432-439, 2012.

5 Bitton Danny y otros: Exon level integration of proteomics and microarray data. *BMC Bioinformatics*, Vol. 9, núm. 1, 25 February 2008, pág. 118.

Pohl y otros: Affy exon tissues: exon levels in normal tissues in human, mouse and rat. *Bioinformatics*. Vol. 25, núm. 18, 1 de julio de 2009, páginas 2442-2443.

10

ES 2 920 753 T3

Listado de secuencias

<110> Vrije Universiteit Brussel
<120> GENES MARCADORES PARA LA COMPETENCIA DE OVOCITOS
5 <130> VUB-001
<150> EPEP13155633.4
<151> 2013-02-18
<160> 29
<170> BiSSAP 1.2
10 <210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <221> fuente
<222> 1..21
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GPX3" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 1
ggggacaaga gaagtgaag a 21
20 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GPX3" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 2
gccagcatat tgctgaagg 20
30 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GSR" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 3
caatgatcag caccaactgc 20
40 <210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
45 <221> fuente <222> 1..24
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GSR" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 4
agtctttta acctcctga cctg 24
50 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
55 <222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GSTA3" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 5
gatgccaaga tgccttgat 20
60 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
65 <222> 1..22
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GSTA3" /tipo_mol="otro ADN"

ES 2 920 753 T3

<400> 6
ttgtccatgg ctctgtaaca ct 22
<210> 7
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GSTA4" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 7
cctcaaggag agaaccctga t 21
<210> 8
<211> 21
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
20 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GSTA4" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 8
ggatgcatga taagcagttc c 21
<210> 9
<211> 18
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..18
30 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo ITPR1" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 9
taccagcgg ctgctaac 18
<210> 10
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
40 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso ITPR1" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 10
tgcaaactct gctcctgt 20
<210> 11
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
50 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo PGR" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 11
gtcatagacc cccgttgcta 20
<210> 12
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
60 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GPR" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 12
gtcatagacc cccgttgcta 20
<210> 13
<211> 19
65 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 920 753 T3

<220>
<221> fuente
<222> 1..19
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo SLC2A1" /tipo_mol="otro ADN"
5 <400> 13
gtctggcatc aacgctgtc 19
<210> 14
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso SLC2A1" /tipo_mol="otro ADN"
15 <400> 14
acgataccgg agccaatg 18
<210> 15
<211> 18
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo TGFB1" /tipo_mol="otro ADN"
25 <400> 15
agtgggtgag ccgtggag 18
<210> 16
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso TGFB1" /tipo_mol="otro ADN"
35 <400> 16
gcagtggtt atccctgctg 20
<210> 17
<211> 19
<212> ADN
40 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..19
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo THBS1" /tipo_mol="otro ADN"
45 <400> 17
aatgctgtcc tcgctgtg 19
<210> 18
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso THBS1" /tipo_mol="otro ADN"
55 <400> 18
gccacagctc gtagaacagg 20
<210> 19
<211> 347
<212> ADN
60 <213> Homo sapiens
<220>
<221> fuente
<222> 1..347
<223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 12 de SASH1" /tipo_mol="ADN no asignado"
65 <400> 19

ES 2 920 753 T3

gtggggagga gcacgtgttt gagaattcgc cggctctgga tgaacgggtcc gccctctact 60
 ctggcgtgca caagaagccc ctttctttg atggctctcc tgagaacct cccgaagatg 120
 actcagactc tctaccacg tctccatct ccagcagcct ggacacctgg ggggctggcc 180
 5 ggaagtggg caaaccttc agcaaaggag agagccgggg cctgattaag ccccccaaga 240
 agatggggac attctctcc taccagaag aagaaaaggc ccagaaagtg tcccgctccc 300
 tcaccgaggg ggagatgaag aagggtctcg ggtcctaag ccacggg 347
 <210> 20
 <211> 211
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..211
 15 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 1 de NCOA7" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 20
 agaaaccctc ataaagtaga tgcagagggc agtaagatat aactcaactt tgaaaatgic 60
 agccgttata gttgaagaaa tctgaccaa gagacttcgc tccgctgcaa gatggaagga 120
 20 agcttaagta agacataaat ttgtaatgaa ctgtctcaca acatccgccc ccactgtgac 180
 ttgcagtcat catcattac cacaaaatta g 211
 <210> 21
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..77
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 2 de NCOA7" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 21
 30 ttgcaggatg gctactcgta tcctccaca catgatcadc agtattgcc tctgtgtccc 60
 caaccggcct gactcaa 77
 <210> 22
 <211> 369
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..369
 40 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 1 de CAMK1D" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 22
 aagaaagtag cagaaagta ggctggcagg cggcggcaaa ggagccggcg cgcggcggcg 60
 gcaggaagtc tgtcccagag aacagcagaa ataagagcca gggagggacc gcggcccggg 120
 45 cggcggcggc gagagcgaag gaggaaactg cagaggagga agctgcgccc cagcccagagc 180
 cgcccggcat ccccgccc tctgcgccc cgccgcgccc ccggcgcccc ctcccagcg 240
 cgccccggc cgtcctccg cgccgcgctc gtcggccatg gcccgggaga acggcgagag 300
 cagctcctcc tggaaaagc aagctgaaga catcaagaag atcttcgagt tcaaagagac 360
 cctcggaac 369
 50 <210> 23
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 55 <222> 1..79
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 9 de CAMK1D" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 23
 caaaagactt cattcggaac ctgatggaga aggaccgaa taaaagatac acgtgtgagc 60
 aggcagctcg gcacccatg 79
 60 <210> 24
 <211> 139
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 65 <221> fuente

ES 2 920 753 T3

<222> 1..139
 <223> /organismo="Homo sapiens"
 /nota="Exón 8 de SPTBN5" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 24

5 gcaggaggaa gttaccgtgc gctggcagag gctccttcag catctacagg gacagaggaa 60
 gcagggtggca gacatgcagg ctgtgctgag cctgctgcag gagggtggagg ctgcctccca 120
 ccagctggag gagctgcag 139

<210> 25
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..138

15 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 14 de MROH9" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 25

20 gtatgccag gatgccctga gaggttctct gaattgttct ggactgcaac aggtggatat 60
 tactctaag aaggagaatt tctgggacca gttatctgaa gatctgtgtt actatcatgg 120
 agtctgcttt attgctaa 138

<210> 26
 <211> 505
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..505

25 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 2 de HSPH1" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 26

30 tgagtaaag cgcagattc tggaaagttc tgatcagtc gatacataag gctgaggaag 60
 tgggacctcc cctttgggt cggtagtca gcgcggcgc cgggtgcca gccgcggcag 120
 agtgaggcag gcaaccgag gtgcggagcg acctgcggag gctgagcccc gcttctccc 180
 agggttctt atcagccagc cgcgctgtc cccgggggag taggaggctc ctgacaggcc 240
 gcggctgtct gtgtgtcctt ctgagtgtca gaggaacggc cagaccccc gggccggagc 300

35 agaacgcggc cagggcagaa agcggcggca ggagaagcag gcagggggcc ggaggacgca 360
 gaccgagacc cgaggcggag gcggaccgag agcggccat gtcggtggtg gggttggacg 420
 tgggctcgca gagctgtac atgcggtag cccgggcccgg gggcatcgag accatcgcca 480
 atgagttcag cgaccggtgc acccc 505

<210> 27
 <211> 2005
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..2005

45 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 6 de HSPH1" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 27

50

55

60

65

ES 2 920 753 T3

gtcccctct tctttacaga tgctgagagg cgatctgtgt tagatgctgc acagattgtt 60
 ggccctaaact gtttaagact tatgaatgac atgacagctg gtaaggaaaa ggcattgtg 120
 5 tggaagtgaa tatactatca gaactaaaga tgttctcagt gctattactt tcttatagat 180
 acagaaacac agcctgttaa aaagtcaagt cagatttgaa aacaaaagtc tacctcttaa 240
 aatgcttatg gtaaatgaga aattggattt ttatcaaac tatraatctg ctctcattag 300
 agaattcttt tcatgttttt taatcctttg aaaatgtagg ttggatttag ctgtgtttcc 360
 ttacattgca tttatagtta ggaagcaatt ttcccacaa tcttaaaatt ctgggcttca 420
 aaactacctt ggcttataag taaatgattt agtttaaaaa atttttttt atctactgaa 480
 10 ctgtagatag gtgatcattt atcaaatatt gcttaagcc tgaactattt gaatgtgtta 540
 ggctagggat tgggatata cagaggatgac tacagcatct ctctctgag ctgttggtag 600
 tttattatga ttacagatga acaaaaaaac agttaaggaa aaaaatcagt tttatgctg 660
 aaaagtttta ctcatatttc tgttaggttt ttggaaaact gttaaatatt ggtaaaaaata 720
 15 tgttttagg tatacatggt tagaaataca gttgtttaa gttcagaaaa aaactttta 780
 aggttgatca gctatttagc tcagatctaa aaattgtag gaactatagt tgctgtagtt 840
 gtatattaaa ttcttaattt tttggataa gcggtgtcct agcaggtgtt gtttaaaatg 900
 taagtattgc ataatgagtc tgatactgc tgtgatacgt ggttatgttt cactgtattc 960
 acgcatatg tttgtctag cacatctcca tatattgaaa agtgatagag cattgttctg 1020
 20 aaatcagaaa gagagtaata attaattcca agaaaatcag tgaagatca ggtataaaag 1080
 gaatgtaatg tttcacctt taattgtttc aagtaaatag tcaagcttcc tgcattgtga 1140
 atttatgta acagttagat tcttaagaaa atgtgaacca aagaattgaa acatacttat 1200
 ttttttagt tgctttgaat tacggaattt ataagcagga tctcccaagc ctggatgaga 1260
 aacctcggat agtgggtttt gttgataggg gacattcagc tttcaagtg tctgctgtg 1320
 25 ctfttaacaa gggaaaattg aaggtaaagt cacaattgg aactcagtgt ccaaaacacg 1380

ttaagtgttg tgactttaag ctactgagcc tctttactag gcttttctt ctggtaatg 1440
 aagagtttta ttttaggtaa agatgttaac aggaaacggg tgctaagggt gagctccata 1500
 30 aagatgatgt aattgtctta gcatactctt aagtgttctt gtttaggaaa gaaaaggctt 1560
 tttacagtta ttttctatgt agtcatttaa aagtcaaaaa tatcttagag atttattcct 1620
 gactgatttg gatttcattt tataatttaa atatagctct gagtctctta gcttttctt 1680
 gtttgagttag taatatttaa gattctagtt acaaatgtga ttgaaaataa ccagactatt 1740
 35 tgtgtttca accaaattag gtactgggaa cagcttttga tctttctta ggaggaaaaa 1800
 acttcgatga aaagttagtg gaacattttt gtgcagaatt taaaactaag tacaagtgg 1860
 atgcaaaatc caaaaatcga gcaactctac gctgtatca ggaatgtgaa aaactgaaaa 1920
 agctaatgag ctctaacagc acagaccttc cactgaatat cgaatgcttt atgaatgata 1980
 aagatgtttc cggaaagatg aacag 2005

<210> 28
 <211> 185
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 45 <222> 1..185
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 21 de DNAH3" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 28

catttgaat cagtacagcc acatcgcaga caaagtcagt gagggtcctg ccaacactaa 60
 50 ggagctggta tcctcattg aattcctaaa gaaatccagt gctgctactg tgtcaaact 120
 caggaggcaa ctagagatg caagtgaacg gctggagttc ctgatggact atgcagact 180
 gccgt 185

<210> 29
 <211> 222
 55 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..222
 60 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 16 de GALNTL6" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 29

aacctgaagc gggtagctga gacctggatg gatgaatttg ccgagtacat ttaccagcgg 60
 cggccggagt acaggcatct ctccacgggg gacatctctg cccagaagga gctgcgcaag 120
 65 cagctcaagt gcaaggactt caaatggttc atggctgctg tggcctggga cgtgcctaaa 180
 tactaccctc cagtggagcc cccgcctgct gcctgggggg ag 222

ES 2 920 753 T3

Tabla 13: Lista de genes

	Abreviatura	Nombre Completo	ID de gen NCBI
5	HSPH1	proteína 1 de choque térmico 105kDa/110kDa	10808
	CAMK1D	proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina 1D	57118
	PTGS2	prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)	5743
10	EFNB2	efrina-B2	1948
	GSTA4	glutación S-transferasa alfa 4	2941
	STC1	estaniocalcina 1	6781
15	STC2	estaniocalcina 2	8614
	VCAN	versicano	1462
	PGR	receptor de progesterona	5241
20	GSTA3	glutación S-transferasa alfa 3	2940
	GPX3	glutación peroxidasa 3 (plasma)	2878
	MROH9	miembro 9 de la familia con repeticiones similar al calor maestro	80133
25	RABGAP1L	RAB GTPasa activadora de proteína similar a 1	9910
	SLC7A11	familia de transportadores de solutos 7 (cadena ligera transportadora de aminoácidos aniónicos, sistema xc), miembro 11	23657
	ALDH1L2	miembro L2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1	160428
30	ASNS	asparagina sintetasa (hidrolizante de glutamina)	440
	BTNL3	similar a la butirifilina 3	10917
	TICRR	Regulador de replicación y punto de control que interactúa con TOPBP1	90381
35	CHTOP	diana de cromatina de PRMT1	26097
	CDC42EP3	Proteína efectora CDC42 (aglutinante de Rho GTPasa) 3	10602
	CEBPG	CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP), gamma	1054
40	DNAH3	dineína, axonemal, cadena pesada 3	55567
	DOCK9	dedicante de citocinesis 9	23348
	GALNTL6	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: similar al polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6	442117
45	GATS	GATS, hebra opuesta del antígeno estromal 3	352954
	GOT1	transaminasa glutámico-oxalacética 1, soluble (aspartato aminotransferasa 1)	2805
	HINT3	proteína 3 de unión a nucleótidos de la tríada de histidina	135114
50	KLF10	Factor 10 similar a Kruppel	7071
	MBD3	proteína 3 del dominio de unión a metil-CpG	53615
	MOCOS	cofactor de molibdeno sulfurasa	55034
55	MSR1	receptor 1 depurador de macrófagos	4481
	NCOA7	coactivador 7 del receptor nuclear	135112
	NPHP4	nefronoptisis 4	261734
60	NPR1	receptor A del péptido natriurético/guanilato ciclasa A (receptor A del péptido atrionatriurético)	4881
	PAK7	quinasa 7 activada por proteína p21 (Cdc42/Rac)	57144
	PHGDH	fosfoglicerato deshidrogenasa	26227
65	RNF166	proteína 166 con dedo de cinc	115992

ES 2 920 753 T3

(continuación)

	Abreviatura	Nombre Completo	ID de gen NCBI
5	ROBO2	homólogo 2 del receptor guía de axones de rotonda (Drosophila)	6092
	SASH1	Proteína 1 que contiene dominios SAM y SH3	23328
	SLC6A9	familia 6 portadora de solutos (transportador de neurotransmisores, glicina), miembro 9	14664
10	SLIT2	homólogo 2 de slit (Drosophila)	9353
	SPTBN5	espectrina 5, beta, no eritrocítica	51332
	TSC22D3	Familia de dominios TSC22, miembro 3	1831
15	TUBA1A	tubulina, alfa 1a	7846
	UNC80	homólogo de unc-80 (C. elegans)	285175

20 Listado de secuencias

<110> Vrije Universiteit Brussel
 <120> GENES MARCADORES PARA LA COMPETENCIA DE OVOCITOS
 <130> VUB-001
 <150> EPEP13155633.4
 <151> 2013-02-18
 <160> 29
 <170> BiSSAP 1.2
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GPX3" /tipo_mol="otro ADN"
 <400> 1
 ggggacaaga gaagtgaag a 21
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GPX3" /tipo_mol="otro ADN"
 <400> 2
 gccagcatac tgctgaagg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GSR" /tipo_mol="otro ADN"
 <400> 3
 caatgatcag caccaactgc 20
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GSR" /tipo_mol="otro ADN"

ES 2 920 753 T3

<400> 4
agtcctttta acctccttga cctg 24
<210> 5
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GSTA3" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 5
gatgccaaga tgccttgat 20
<210> 6
<211> 22
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..22
20 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GSTA3" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 6
ttgtccatgg ctctgaaca ct 22
<210> 7
<211> 21
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
30 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo GSTA4" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 7
cctcaaggag agaaccctga t 21
<210> 8
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
40 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GSTA4" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 8
ggatgcatga taagcagttc c 21
<210> 9
<211> 18
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..18
50 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo ITPR1" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 9
taccagcgg ctgtaac 18
<210> 10
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
60 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso ITPR1" /tipo_mol="otro ADN"
<400> 10
tgcaaatcct gctccttgt 20
<210> 11
<211> 20
65 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 920 753 T3

<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo PGR" /tipo_mol="otro ADN"
5 <400> 11
gtcatagacc cccgttgcta 20
<210> 12
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso GPR" /tipo_mol="otro ADN"
15 <400> 12
gtcatagacc cccgttgcta 20
<210> 13
<211> 19
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..19
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo SLC2A1" /tipo_mol="otro ADN"
25 <400> 13
gtctggcatc aacgctgctc 19
<210> 14
<211> 18
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso SLC2A1" /tipo_mol="otro ADN"
35 <400> 14
acgataccgg agccaatg 18
<210> 15
<211> 18
<212> ADN
40 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo TGFB1" /tipo_mol="otro ADN"
45 <400> 15
agtgggtgag ccgtggag 18
<210> 16
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso TGFB1" /tipo_mol="otro ADN"
55 <400> 16
gcagtgtgtt atccctgctg 20
<210> 17
<211> 19
<212> ADN
60 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..19
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador directo THBS1" /tipo_mol="otro ADN"
65 <400> 17
aatgctgtcc tcgctgttg 19

ES 2 920 753 T3

```

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
   <221> fuente
   <222> 1..20
   <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador inverso THBS1" /tipo_mol="otro ADN"
   <400> 18
10 gccacagctc gtagaacagg 20
   <210> 19
   <211> 347
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens
15 <220>
   <221> fuente
   <222> 1..347
   <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 12 de SASH1" /tipo_mol="ADN no asignado"
   <400> 19
20          gtggggagga gcacgtgttt gagaattcgc cggctcctgga tgaacgggtcc gccctctact      60
          ctggcgtgca caagaagccc cttttctttg atggctctcc tgagaaacct cccgaagatg      120
          actcagactc tctcaccacg tctccatcct ccagcagcct ggacacctgg ggggctggcc      180
25          ggaagttggt caaaaccttc agcaaaggag agagccgggg cctgattaag ccccccaaga      240
          agatggggac attcttctcc taccagaag aagaaaaggc ccagaaagtg tcccgtcccc      300
          tcaccgaggg ggagatgaag aagggtctcg ggtccctaag ccacggg      347
30 <210> 20
   <211> 211
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens
   <220>
35 <221> fuente
   <222> 1..211
   <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 1 de NCOA7" /tipo_mol="ADN no asignado"
   <400> 20
          agaaaccctc ataaagtaga tgcagagggc agtaagatat aactcaactt tgaaaatgtc      60
40          agccgttata gttgaagaaa tctgacccaa gagacttcgc tccgtgcaa gatggaagga      120
          agcttaagta agacataaat ttgtaatgaa cttgctcaca acatccgccg ccaactgtgac      180
          ttgcagtcac catccattac cacaaaatta g      211
45 <210> 21
   <211> 77
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens
   <220>
50 <221> fuente
   <222> 1..77
   <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 2 de NCOA7" /tipo_mol="ADN no asignado"
   <400> 21
          ttgcaggatg gctactcgta tccctccaca catgatcatc agtatttgcc tcctgtgtcc      60
55          caaccggcct gagtcaa      77
   <210> 22
   <211> 369
   <212> ADN
60 <213> Homo sapiens
   <220>
   <221> fuente
   <222> 1..369
   <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 1 de CAMK1D" /tipo_mol="ADN no asignado"
65 <400> 22

```

ES 2 920 753 T3

aagaaagtag cagaaagtga ggctggcagg cggcggcaaa ggagccggcg cgcggcggcg 60
 gcaggaagtc tgtgcccag aacagcagaa ataagagcca gggagggacc gcgcccgagg 120
 5 cgcggcggcg gagagcgaaa gaggaaactg cagaggagga agctgcgccg cagcccagac 180
 cgcccggcat ccccgccgcc tctgcgcccg cgcgcgccc cggcgcccc ctcccagcg 240
 cgccccggc cgctcctccg cgcccgctc gtcggccatg gcccgggaga acggcgagag 300
 10 cagctcctcc tggaaaaagc aagctgaaga catcaagaag atcttcgagt tcaaagagac 360
 cctcggaac 369
 <210> 23
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..79
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 9 de CAMK1D" /tipo_mol="ADN no asignado"
 20 <400> 23
 caaaagactt cattcggaac ctgatggaga aggacccgaa taaaagatac acgtgtgagc 60
 aggcagctcg gcacccatg 79
 <210> 24
 25 <211> 139
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..139
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 8 de SPTBN5" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 24
 gcaggaggaa gttaccgtgc gctggcagag gtccttcag catctacagc gacagaggaa 60
 35 gcaggtggca gacatgcagg ctgtgctgag cctgctgcag gaggtggagg ctgcctocca 120
 ccagctggag gagctgcag 139
 <210> 25
 <211> 138
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..138
 45 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 14 de MROH9" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 25
 gtatgccag gatgccctga gagttctgct gaattgttct ggactgcaac aggtggatat 60
 tactctaag aaggagaatt tctgggacca gttatctgaa gatctgtgtt actatcatgg 120
 50 agtctgcttt attgctaa 138
 <210> 26
 <211> 505
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..505
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 2 de HSPH1" /tipo_mol="ADN no asignado"
 60 <400> 26
 65

ES 2 920 753 T3

	tgagtaaag cgcagattc tggaaagttc tgatcagtgc gatacataag gctgaggaag	60
	tgggacctcc ccttttgggt cggtagttca gcgccggcgc cgggtgtcga gccgcggcag	120
5	agtgaggcag gcaacccgag gtgcggagcg acctgcggag gctgagcccc gctttctccc	180
	agggtttctt atcagccagc cgccgctgtc cccgggggag taggaggctc ctgacaggcc	240
	gcggctgtct gtgtgtcctt ctgagtgtca gaggaacggc cagaccccgc gggccggagc	300
10	agaacgcggc cagggcagaa agcggcggca ggagaagcag gcagggggcc ggaggacgca	360
	gaccgagacc cgagggcgag gcggaccgcg agccggccat gtcggtggtg gggttgacg	420
	tgggctcgca gagctgctac atcgcggtag cccgggccgg gggcatcgag accatcgcca	480
15	atgagttcag cgaccggtgc acccc	505
	<210> 27	
	<211> 2005	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<220>	
	<221> fuente	
	<222> 1..2005	
	<223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 6 de HSPH1" /tipo_mol="ADN no asignado"	
	<400> 27	
25	gtccccctct tctttacaga tgctgagagg cgatctgtgt tagatgctgc acagattggt	60
	ggcctaaact gtttaagact tatgaatgac atgacagctg gtaaggaaaa ggcatttgtg	120
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 920 753 T3

5 tggaagtgaa tatactatca gaactaaaga tgttctcagt gctattactt tcttatagat 180
 acagaaacac agcctgtaa aaagtcaagt cagatttgaa aacaaaagtc tacctcttaa 240
 aatgcttatg gttaatgaga aattggattt ttatcaaact tatgaatctg ctttcattag 300
 agaattcttt tcatgttttt taatcctttg aaaatgtagg ttggatttag ctttgtttcc 360
 ttacattgca tttatagtta ggaagcaatt tttcccacaa tcttaaaatt ctgggcttca 420
 10 aaactacctt ggcttataag taaatgattt agtttaaaaa attttttttt atctactgaa 480
 ctgtagatag gtgatcattt atcaaatatt gctttaagcc tgtaactattt gaatgtgta 540
 ggctagggat tgtggatata cagaggtgat tacagcatct ctttcttgag cttttggtag 600
 15 tttattatga ttacagatga acaaaaaatc agttaaggaa aaaaatcagt ttttatgctg 660
 aaaagtthta ctcatatttc tgttaggttt ttggaaaact gttaaatatt ggtaaaaaata 720
 tgttttttagg tatacatggt tagaaataca gttgtttaa gttcagaaaa aaactthta 780
 20 aggttgatca gctatthtagc tcagatctaa aaattggtag gaactatagt tgctgtagtt 840
 gtatattaaa ttcttaattt ttttgataa gcggtgtcct agcaggttgt ggtaaaaatg 900
 taagtattgc ataatgagtc tgatactgtc tgtgatacgt ggttatgtht cactgtattc 960
 25 acgccatag ttttgtctag cacatctcca tatattgaaa agtgatagag cattgttctg 1020
 aaatcagaaa gagagtaata attaattcca agaaaatcag tgtgaagtca ggtataaaaag 1080
 gaatgtaatg tgttcacctt taattgttht aagttaatag tcaagcttcc tgcattgtgta 1140
 30 atthttatgta acagtgagat tcctaagaaa atgtgaacca aagaattgaa acatacttat 1200
 thttttagt tgctthgaa tacggaattt ataagcagga tctccaagc ctggatgaga 1260
 aacctcggat agtggtthtt gttgatatgg gacattcagc thttcaagtg tctgcttgthg 1320
 35 ctthtaacaa gggaaaattg aaggtaaaag catacattgg aactcagtht ccaaaacacg 1380
 ttaagtgtthg tgactthtaag ctactgagcc tctthactag gctthttctt ctthgtaatg 1440
 aagatththt thtttaggtaa agatgttaac aggaaaagggt tgctaaggth gagctccata 1500
 40 aagatgattht aattgtctta gcatactctt aagthtctt gthtaggaaa gaaaaggctt 1560
 thtacagtht thttctattht agtcatttht aagthcaaaa tatcttagag atthattctt 1620
 gactgattthg gattthcattht tataatthta atatagtht gagthctctta gctthtcatt 1680
 45 gthtgagtht taatththt gattctagtht acaaatgtht thgaaaataa ccagactatt 1740
 tgtthththt accaaattag thactgggaa cagctththt tctthctta ggaggaaaa 1800
 50 actthgattht aaagthtagth gaacaththt thgcagaatt thaaactaag tacaagththg 1860
 atgcaaaatc caaaatcga gcactcttac thctgtatca ggaatgtht aaactgaaaa 1920
 agctaatgag ctetaacagc acagacctt cactgaatat cgaatgctth atgaatgata 1980
 55 aagatgththt cggaaagatg aacag 2005

60 <210> 28
 <211> 185
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..185
 <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 21 de DNAH3" /tipo_mol="ADN no asignado"
 65 <400> 28

ES 2 920 753 T3

```

catttgaat cagtacagcc acatcgcaga caaagtcagt gaggttcctg ccaacactaa    60
ggagctggta tccctcattg aattcctaaa gaaatccagt gctgtcactg tgttcaaact    120
5   caggaggcaa cttagagatg caagtgaacg gctggagttc ctgatggact atgcagactt    180
    gccgt                                                                    185
<210> 29
<211> 222
<212> ADN
10  <213> Homo sapiens
    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..222
15  <223> /organismo="Homo sapiens" /nota="Exón 16 de GALNTL6" /tipo_mol="ADN no asignado"
    <400> 29
    aacctgaagc gggtagctga gacctggatg gatgaatttg ccgagtacat ttaccagcgg    60
    cggccggagt acaggcatct ctccacgggg gacatctctg cccagaagga gctgcgcaag    120
20  cagctcaagt gcaaggactt caaatggttc atggctgctg tggcctggga cgtgcctaaa    180
    tactaccctc cagtggagcc cccgcctgct gcctgggggg ag                        222
25

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para detectar un gen biomarcador o su variante de corte y empalme para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero no fecundado para conducir al nacimiento, implantación, formación de un blastocisto o embrión previo a la implantación y/o fecundación; dicho método comprende:
- 10 - hacer un análisis a nivel de exones de la expresión génica en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo aislada del ovocito no fecundado;
- 10 - realizar una comparación intrapaciente de dicho análisis a nivel de exones de la expresión génica; y
- 15 - usar como criterio de valoración de la selección, los nacidos vivos y el desarrollo del embrión, al considerar únicamente los valores de $p < 0,05$ en una prueba t pareada como significativos para que un gen biomarcador sea adecuado para evaluar la competencia de un ovocito no fecundado de mamífero para conducir al nacimiento, la implantación, formación de un blastocisto o embrión previo a la implantación, y/o fecundación.
- 20 2. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el análisis a nivel de exones de la expresión génica se realiza en un experimento que comprende los genes de la Tabla 13.
- 20 3. Un método *in vitro* para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero no fecundado para conducir al nacimiento, implantación, formación de un blastocisto o embrión previo a la implantación y/o fecundación; dicho método comprende las etapas de:
- 25 - determinar el nivel de expresión génica de un biomarcador al hacer un análisis a nivel de exones de la expresión génica realizado en la variante de corte y empalme de un gen seleccionado de CAMK1D, PTGS2, EFNB2, VCAN, STC1, STC2, PGR y GPX3; o el nivel de expresión génica de biomarcadores de una combinación seleccionada del grupo que comprende SASH1, MROH9, NCOA7, DNAH3, exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, GALNTL6, SPTBN5, exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D y EFNB2 en una muestra que comprende al menos una célula de la granulosa o del cúmulo aislada de dicho ovocito no fecundado; y
- 30 - evaluar la competencia del ovocito no fecundado para conducir al nacimiento, implantación, formación de un blastocisto o embrión previo a la implantación y/o fecundación; en base a dicho(s) nivel(es) de expresión.
- 35 4. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la combinación de biomarcadores se selecciona de la lista que comprende;
- 40 • EFNB2 y NCOA7;
• exón 9 de CAMK1D y exón 2 de HSPH1 y NCOA7
• exón 9 de CAMK1D y exón 6 de HSPH1 y NCOA7
• exón 1 de CAMK1D y SASH1; y
• EFNB2 y SASH1.
- 45 5. Un método *in vitro* para evaluar la competencia de un ovocito de mamífero no fecundado para conducir al nacimiento, implantación, formación de un blastocisto o embrión previo a la implantación y/o fecundación; dicho método comprende las etapas de:
- 50 - determinar la expresión génica a nivel de exones de exón 1 de CAMK1D, exón 9 de CAMK1D o EFNB2, en combinación con uno o más genes seleccionados de los genes enumerados en la Tabla 13; en particular con uno o más genes adicionales seleccionados de los genes enumerados en la Tabla 8; en particular con uno o más genes adicionales seleccionados del grupo que consiste en exón 2 de HSPH1, exón 6 de HSPH1, NCOA7 y SASH1 en una muestra que comprende al menos una célula aislada de la granulosa o del cúmulo del ovocito no fecundado; y
- 55 - evaluar la competencia del ovocito no fecundado para conducir al nacimiento, implantación, formación de un blastocisto o embrión previo a la implantación y/o fecundación; en base a dichos niveles de expresión.
- 60 6. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además la etapa de normalizar la expresión génica a nivel de exones de dichos genes.
- 65 7. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde determinar el nivel de expresión génica de marcadores de dicho uno o más genes biomarcadores comprende medir los niveles de polinucleótidos de dichos genes por medio de ensayos biológicos mediante el uso de cebadores y/o sondas capaces de hibridar específicamente con dichos polinucleótidos o con una o más regiones dentro de dichos polinucleótidos.

8. Un método in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde determinar el nivel de expresión génica de marcadores de dicho uno o más genes comprende medir los niveles de proteína de productos génicos relacionados por medio de ensayos biológicos mediante el uso de aglutinantes, anticuerpos o fragmentos de estos, para dichas proteínas, sus proformas o sus productos metabólicos.

5

9. Un método in vitro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ovocito de mamífero no fecundado es un ovocito humano no fecundado.

10

Figura 1:

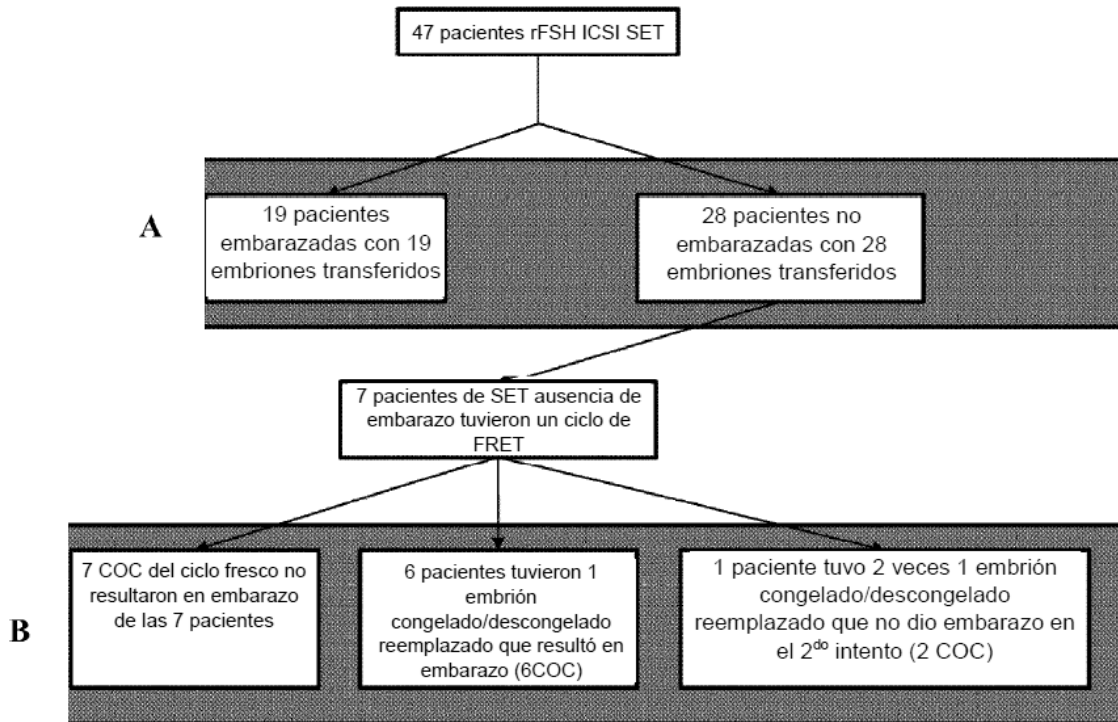


Figura 2:

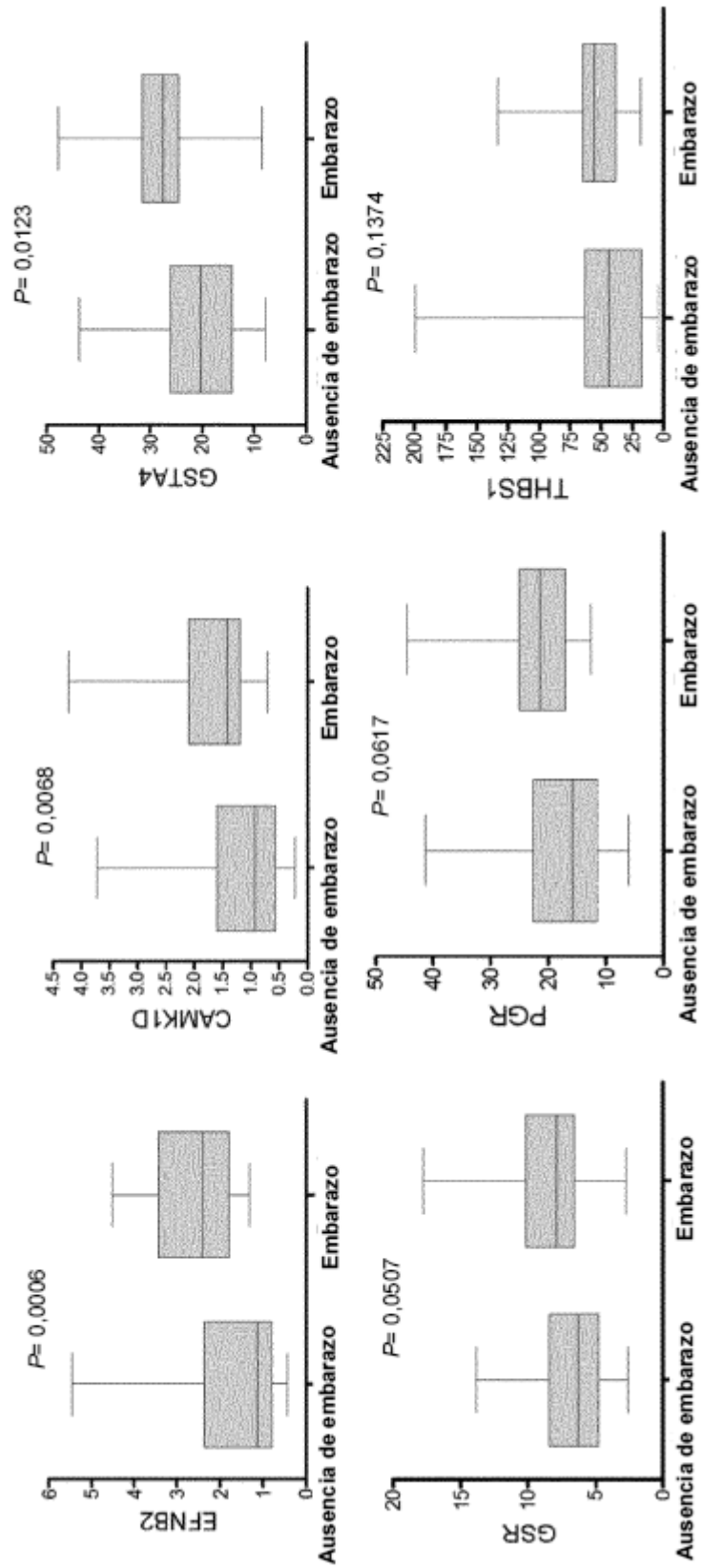


Figura 2 - continuación:

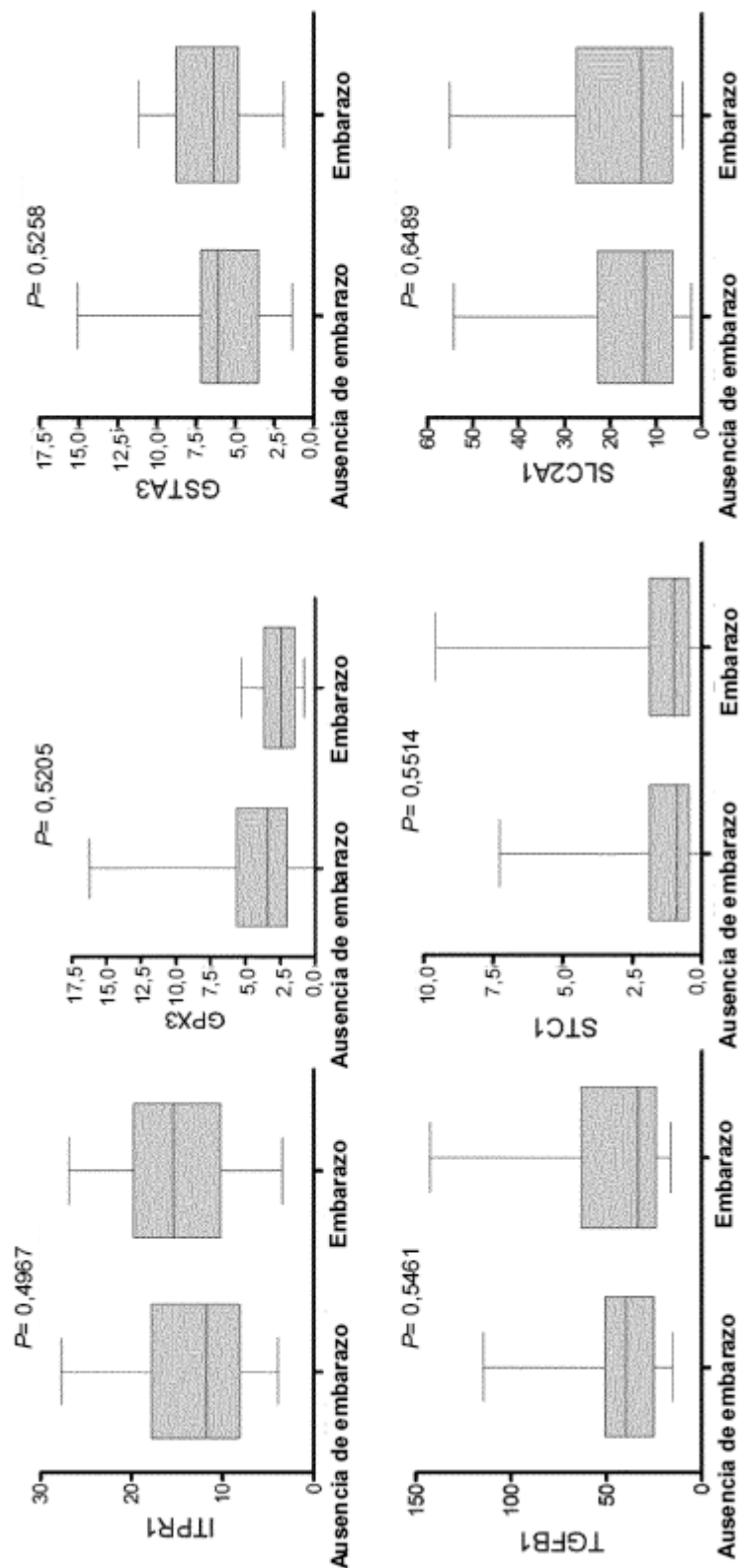


Figura 3:

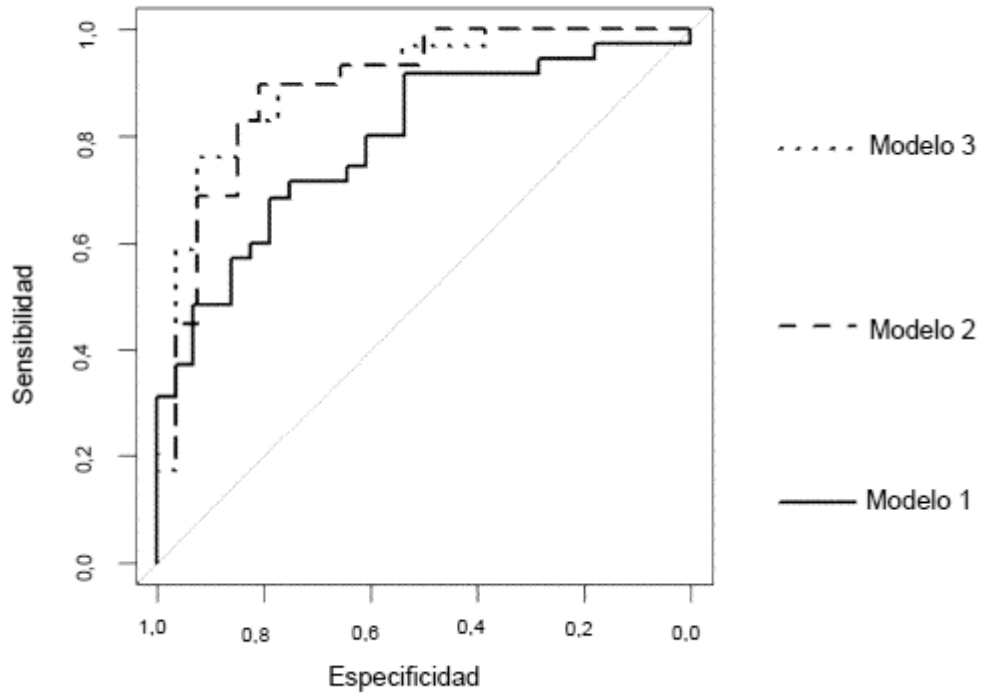


Figura 4:

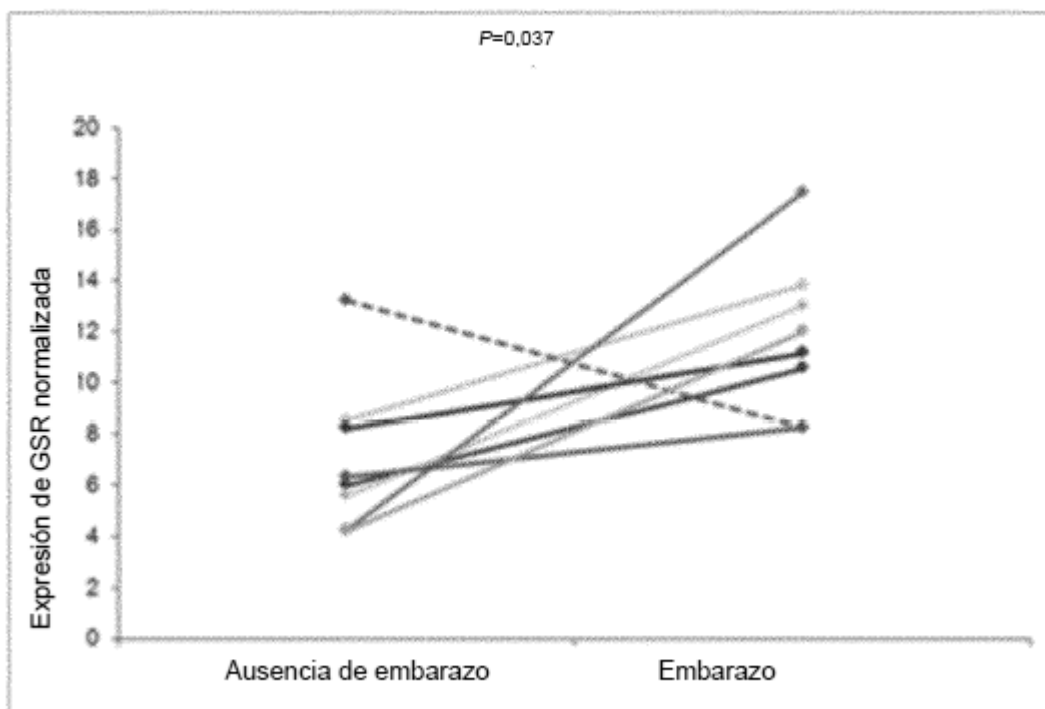
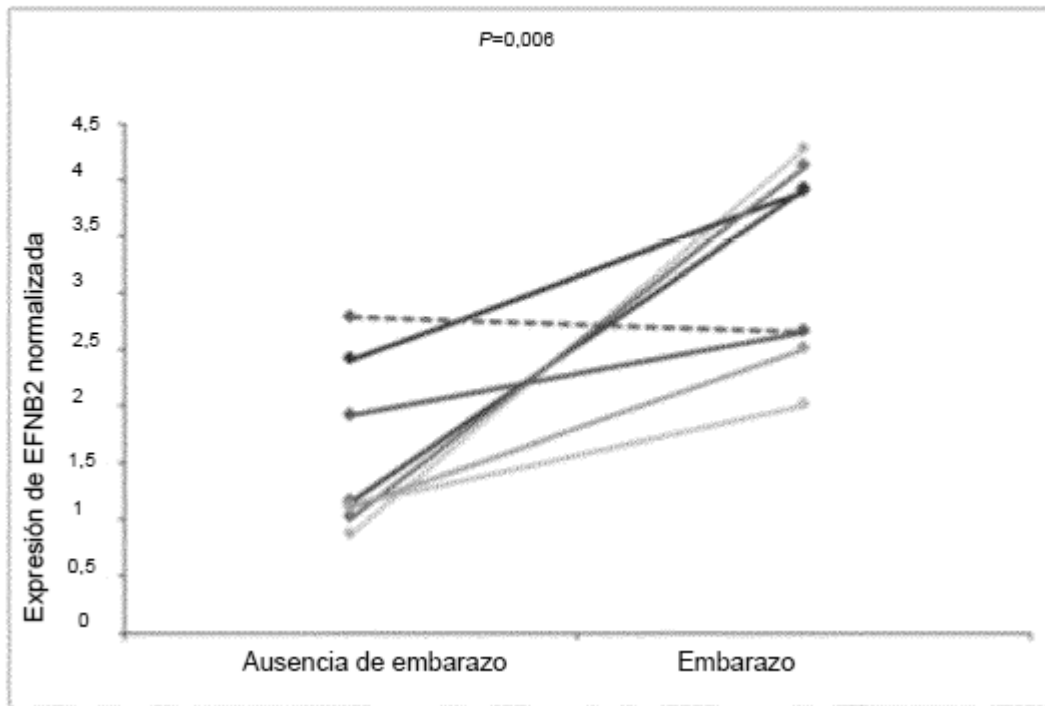


Figura 4 – Continuación

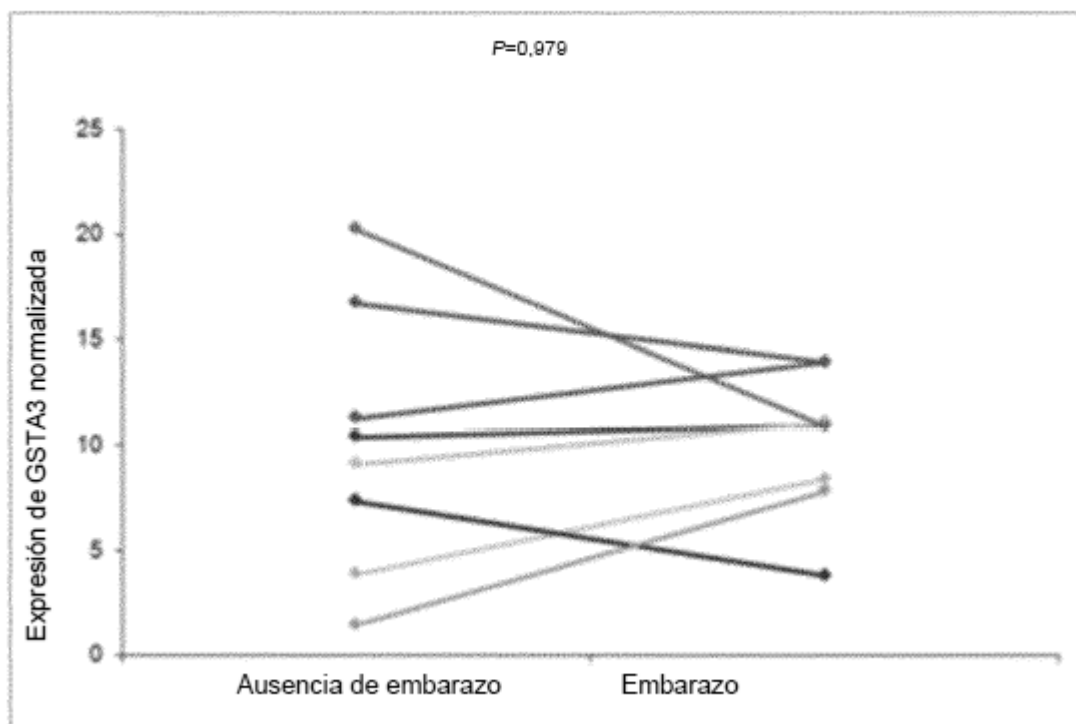
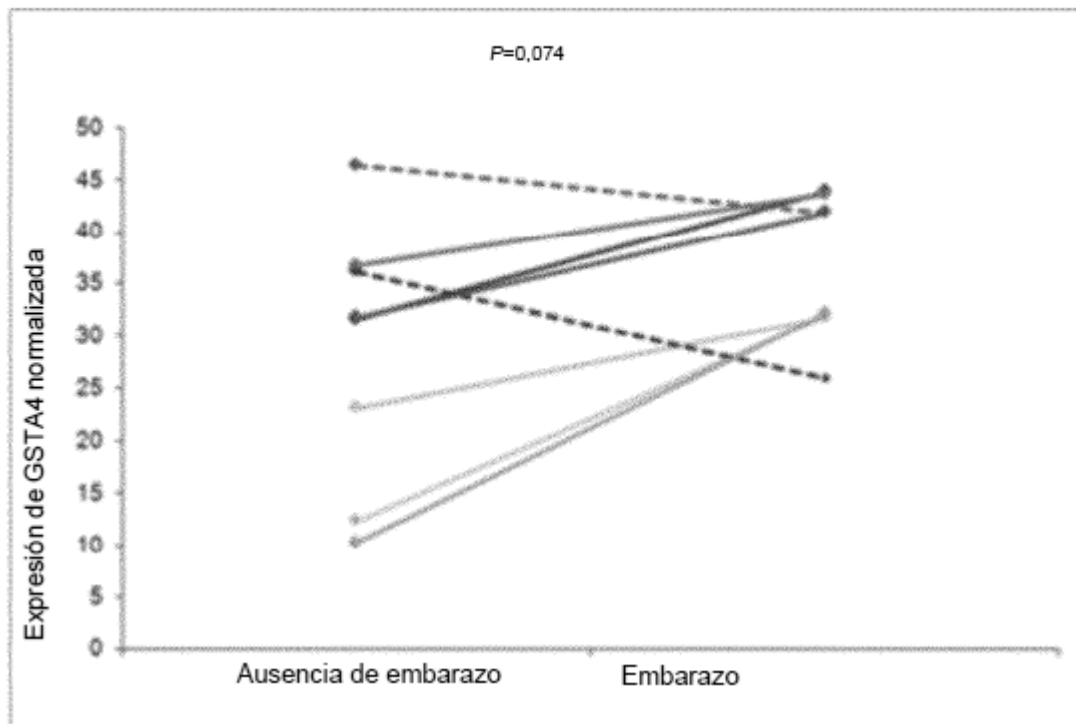


Figura 4 – Continuación

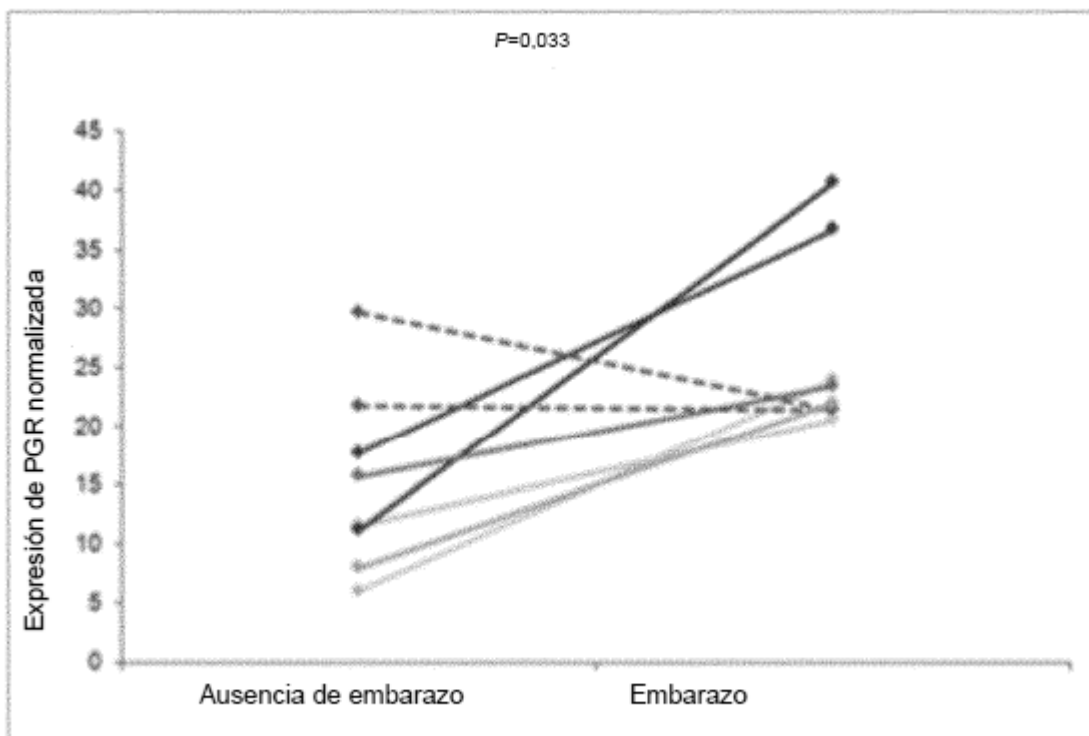
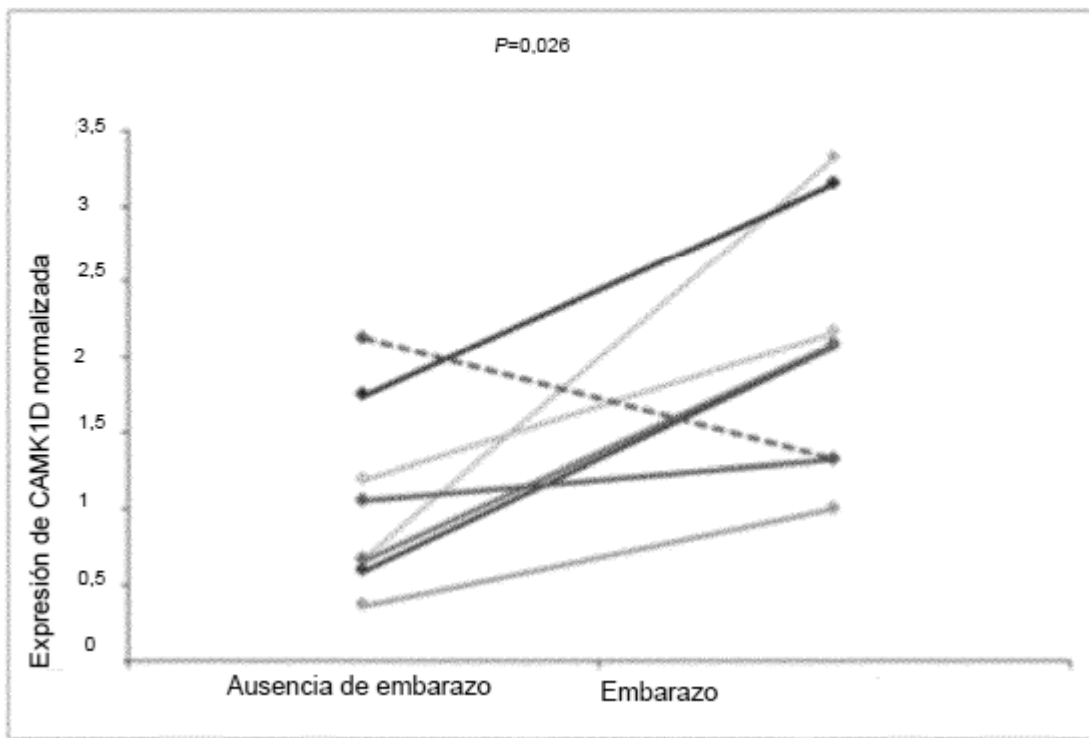


Figura 4 – Continuación:

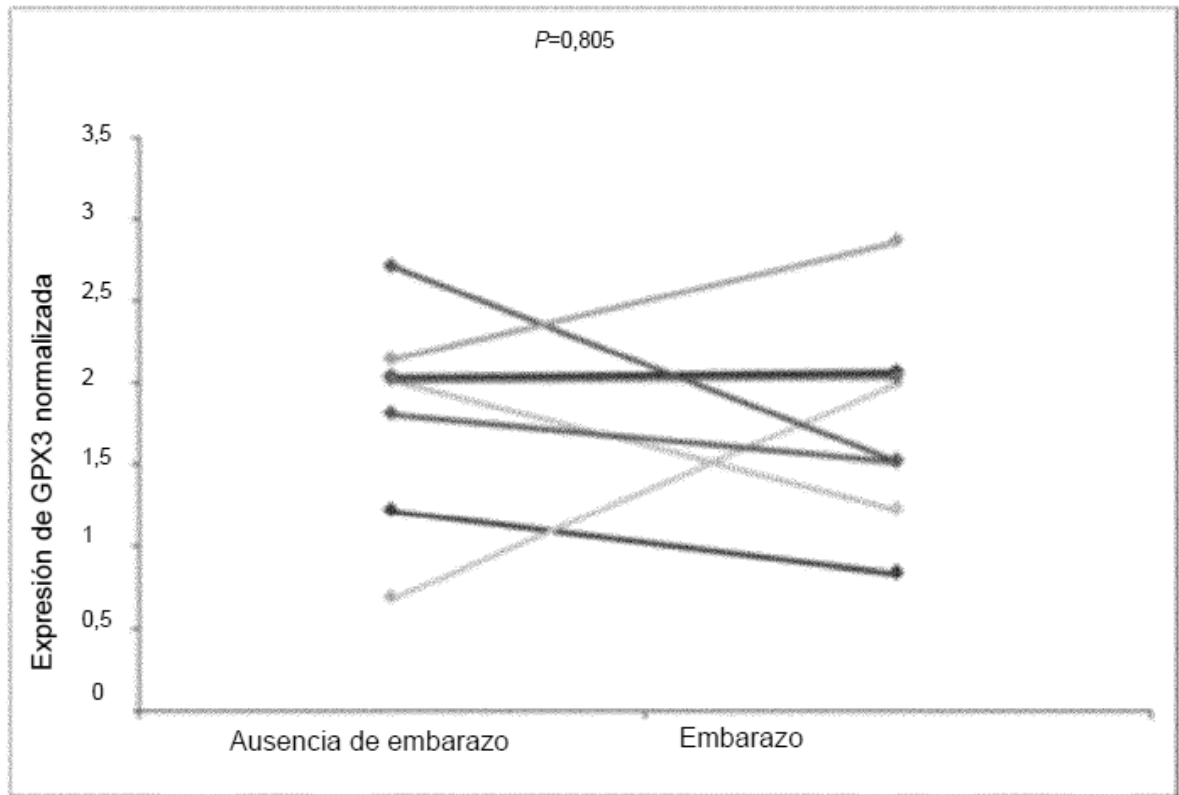
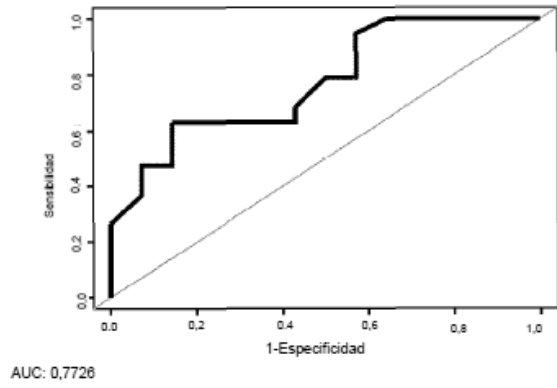


Figura 5:

Curva ROC:



Relación de la expresión génica para predecir embarazo

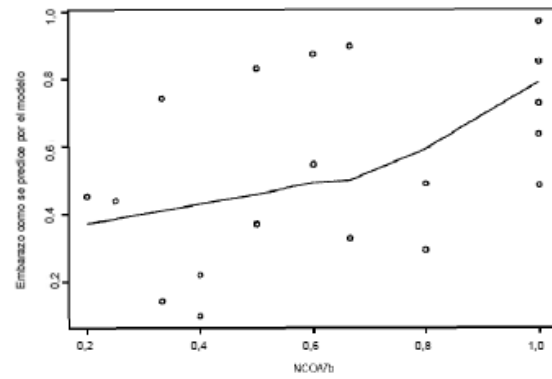
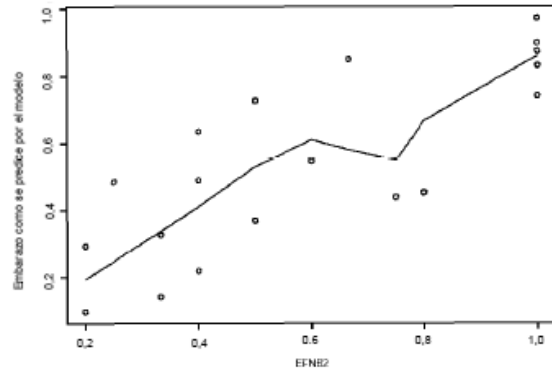
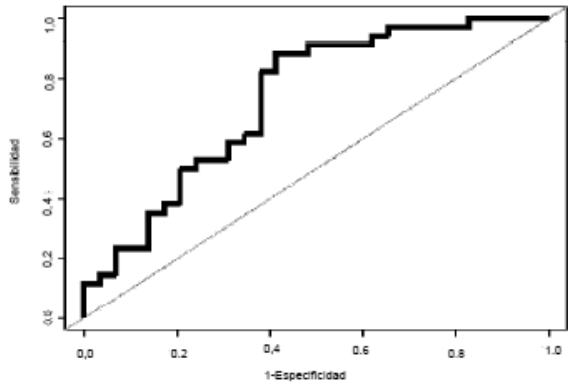


Figura 6:

Curva ROC:



AUC: 0.7333

Relación de la expresión génica para predecir embarazo

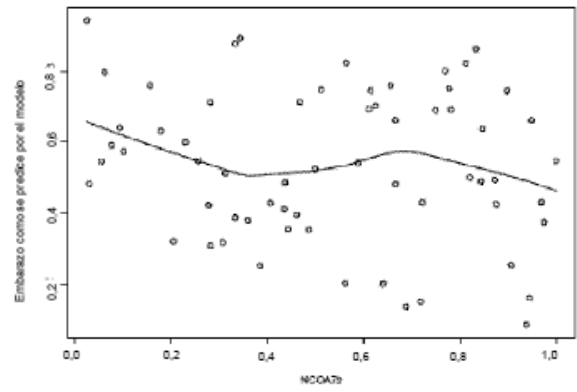
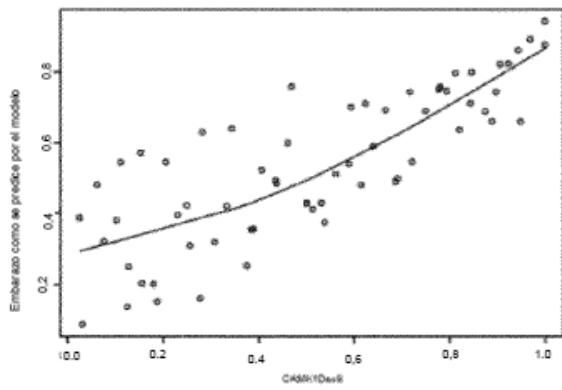
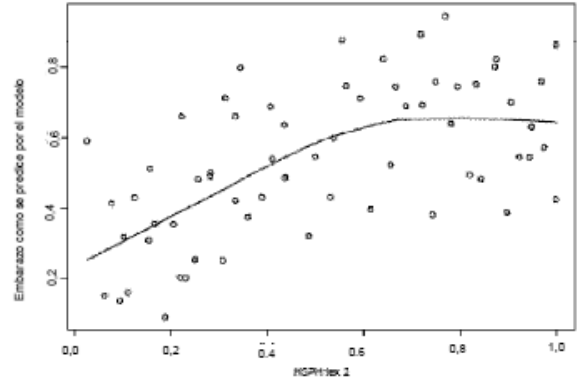
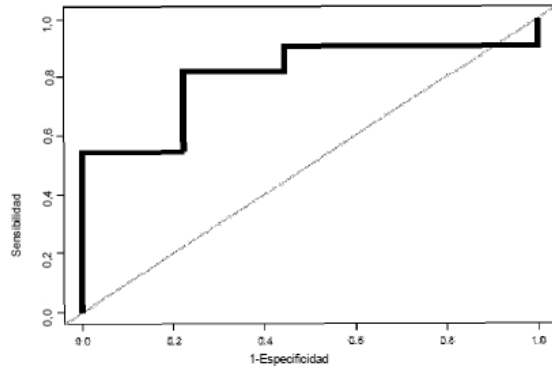


Figura 7:

Curva-ROC



AUC: 0,8081

Relación de la expresión génica para predecir embarazo

