

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 548**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G16H 50/30** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2013 PCT/EP2013/065355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013079**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2013 E 13740258 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2877856**

54 Título: **Método para aumentar el éxito de implantación en fertilización asistida**

30 Prioridad:

**20.07.2012 EP 12177377**

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

**05.02.2020**

73 Titular/es:

**MATRICELAB INNOVE (100.0%)  
29 rue du Faubourg Saint-Jacques  
75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEDEE, NATHALIE y  
PETITBARAT, MARIE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 740 548 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para aumentar el éxito de implantación en fertilización asistida

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para determinar el perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina en un sujeto femenino, de este modo determinar un tratamiento personalizado para dicho sujeto para aumentar el éxito de implantación.

Antecedentes de la invención

10 La fertilización asistida, tal como la fertilización in vitro (IVF), se ha utilizado con éxito en sujetos humanos con problemas de infertilidad durante tres décadas. A pesar de la extensa investigación, sigue siendo un procedimiento difícil y costoso. De hecho, menos del 5% de los ovocitos recolectados y solo el 20-25% de los embriones transferidos dan lugar a un nacimiento. La optimización de la competencia embrionaria y la correspondiente receptividad uterina es un requisito absoluto para mejorar el éxito en la tecnología de reproducción asistida (ART). El éxito de la implantación implica un diálogo cruzado entre un endometrio receptivo y un blastocisto funcional. Este fenómeno solo puede tener lugar durante la ventana de implantación, un período autolimitado de receptividad endometrial que se extiende entre los días 19 y 23 del ciclo menstrual (mujeres). En los ciclos menstruales normales, esto se logra a través de los efectos locales de los estrógenos ováricos y la progesterona, que inducen una serie de eventos celulares y moleculares en el endometrio que conducen a una receptividad endometrial apropiada.

20 Se han divulgado métodos para determinar la receptividad endometrial descrito en la técnica: por ejemplo, el documento US7,175,990 divulgó un método basado en la determinación del nivel de L-selectina producido por las células epiteliales uterinas, en el que un aumento en el nivel de L-selectina en comparación con un nivel de control indica una mayor probabilidad de éxito de la implantación. Otro método para determinar la receptividad endometrial divulgado en el documento EP2348318 se basa en la determinación del nivel de prostaglandina E2 o F2 alfa en el fluido endometrial. Otro enfoque emergente, como la matriz Receptiva del Endometrio (sistema ERA), exploró 238 genes expresados específicamente durante la ventana de implantación (WO2010/010213). Estos métodos solo son útiles para determinar la receptividad endometrial a la implantación de embriones. Sin embargo, en el caso de la determinación de una receptividad inapropiada del endometrio, estos métodos no son útiles para restaurar una receptividad endometrial.

30 Lédée et al. (J. Reprod. Immunol., 2011, 88(2): 118-123) describe biomarcadores previos a la concepción, que incluyen ambos biomarcadores de la competencia de ovocitos tales como el G-CSF y biomarcadores de la receptividad uterina tales como IL-15, IL-18. Tweak, Fn14 y células CD56+ uNK. Petitbarat et al. (Fertil. Steril., 2010, 94(3): 1141-1143) describe la cuantificación del ARNm de Tweak, Fn14, IL-15 e IL-18, en relación con el reclutamiento de células CD56+, notablemente en el contexto de la falla de implantación inexplicable. Lédée-Bataille et al. (Fertil. Steril., 2005, 83(3): 598-605) describe la medida de los niveles de ARNm de IL-12, IL-15 e IL-18 en el contexto de la falla de la implantación recurrente. Vandermolen et al. (Am. J. Reprod. Immunol., 1996, 36(5): 278-284) describe la evaluación de la expresión endometrial in vivo de G-CSF y G-CSF.

35 Sin embargo, ninguno de estos documentos describe un método para determinar con precisión el estado endometrial de un sujeto femenino, indicativo del perfil de receptividad uterina de dicho sujeto femenino.

40 Los inventores han observado que la receptividad inapropiada de un endometrio se puede explicar por dos estados diferentes: un estado de baja activación o un estado de sobreactivación. La determinación de un estado endometrial permite de esta manera explicar su no receptividad, lo que lleva a un tratamiento adaptado y personalizado para restaurar un estado de receptividad.

Por consiguiente, es de interés proporcionar un método que permita la determinación del estado endometrial de un sujeto femenino, siendo esta información útil para optimizar su tratamiento para restaurar una receptividad endometrial.

45 Resumen

Un objeto de la invención es un método para determinar en un sujeto femenino el perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina, que comprenden:

determinar sobre una muestra de endometrio el estado endometrial al medir:

50 - en una primera etapa, el estado de actividad de las células uterinas NK (uNK), en la que dicho estado de actividad de las células uNK se determina al medir la expresión de IL-18 y Tweak, calcular un valor de la relación IL-18/Tweak y comparar dicho valor con un valor de referencia; y

- en una segunda etapa, el reclutamiento y estado de maduración de las células uNK, en la que dicho reclutamiento de células uNK se determina al cuantificar el número de células CD56+ uNK y/o medir la expresión de CD56 y comparar dichos valores con los valores de referencia, y en la que dicho estado de mutación de células uNK se

determina al medir la expresión de IL-15 y Fn14, calcular un valor de la relación IL-15/Fn14 y comparar dicho valor con un valor de referencia; de este modo determinar un estado endometrial que es indicador de un perfil de receptividad uterina apropiado o inapropiado.

En otra realización, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto femenino fértil.

5 Otro objeto de la invención es un método para aumentar la tasa de éxito de un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (ART) en un sujeto femenino, que comprenden: determinar el perfil de receptividad uterina de dicho sujeto durante la ventana de implantación uterina como se describió en este documento anteriormente, y

10 determinar una recomendación personalizada para dicho sujeto dependiendo del perfil de receptividad uterina determinado en la etapa previa, en la que el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad que corresponde a un estado endometrial subactivado o es inapropiado debido a una receptividad anormal que corresponde a un estado endometrial sobreactivado.

15 En una realización, cuando el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad que corresponde a un estado endometrial subactivado, por lo menos se aplica una de los siguientes: una estimulación mecánica del endometrio en la fase luteal que precede al ciclo IVF; una reducción del nivel de la estimulación de hormona; o una administración de hormona gonadotropina coriónica humana durante la ventana de implantación.

20 En otra realización, cuando el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal que corresponde un estado endometrial sobreactivado, por lo menos se aplica una de los siguientes: un alto nivel de estimulación ovárica; alta dosis de progesterona después de la recuperación de ovocitos; fármacos dirigidas a controlar el entorno local proinflamatorio desde el inicio de la estimulación tal como, por ejemplo, corticosteroides, una combinación de baja dosis de ácido acetil salicílico con heparinas de bajo peso o intralípidos; o una cantidad terapéuticamente efectiva de agente oxidante.

Otro objeto de la invención es un método para evaluar un sujeto femenino para un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (ART), que comprenden:

25 - obtener elementos de información del sujeto femenino para proporcionar un perfil para dicho sujeto femenino, en el que dichos elementos de información son proporcionados por el sujeto femenino con base en un cuestionario o solicitado, transcrito, o registrado de otro modo por un profesional de la salud; en el que dichos elementos de información comprenden datación histológica, características del endometrio, edad, etiología de la infertilidad, datos de infertilidad, evaluación hormonal de reserva ovárica y tipo de ART; y en el que uno de dichos elementos de información es el perfil de receptividad uterina como se describió en este documento anteriormente,

30 - comparar dicho perfil para dicho sujeto femenino con una biblioteca patrones de perfiles conocidos por ser indicativo de capacidad de respuesta a un procedimiento de tecnología de reproducción asistida utilizando un algoritmo basado en dichas variables del sujeto preseleccionadas,

35 - en las que dicha comparación proporciona una evaluación de dicho sujeto femenino para un procedimiento de ART.

Otro objeto de la invención es un kit que comprende:

40 - reactivos para medir la expresión de IL-18, IL-15 y CD56, dicho reactivo es específico para IL-18, IL-15 y CD56, respectivamente;

- reactivos para medir la expresión de Tweak y Fn-14, dicho reactivo es específico para Tweak y Fn-14, respectivamente;

- reactivos para medir la expresión de GCSF-R, dicho reactivo es específico para GCSF-R;

- opcionalmente reactivos para medir la expresión de genes de referencia, dicho reactivo es específico para dichos genes de referencia.

#### Definiciones

45 En la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

50 - El término "reproducción asistida" se refiere a las técnicas clínicas y de laboratorio utilizadas para mejorar la fertilidad en humanos o animales, que incluyen, pero no se limitan a, la fertilización in vitro (IVF), transferencia de embriones congelados (FET), inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), inyección de espermatozoides con selección morfológica intracitoplásmica (IMSI), transferencia de gameto en tubo intrafalopiano (GIFT), inseminación intrauterina (IUI) y transferencia de cigoto en tubo intrafalopiano (ZIFT).

- 5 - El término "falta de implantación" se refiere a la falta de pocos embriones producidos por la reproducción asistida o por inseminación artificial para implantar o implantar normalmente en el útero de un sujeto receptor. Los ejemplos de casos de falta de implantación de embriones incluyen, pero no se limitan a, falta de implantación después de 8 transferencias de embriones, falta de implantación después de 4 transferencias de embriones, falta de implantación después de 2 transferencias de embriones en J5, o falta de implantación después de la transferencia de 2 embriones después de la donación de ovocitos exógenos. En una realización, el mínimo de embriones transferidos con fallas de implantación posteriores para definir una falta de implantación es por lo menos cuatro embriones en el Día 2 o -3 con una morfología óptima, seis embriones en el Día 2 o 3 con una morfología media o 2 Embriones en el Día-5.
- 10 - El término "insuficiencia ovárica" se refiere a la pérdida de la función de los ovarios en mujeres menores de 40 años. Los sujetos afectados por este trastorno presentan también rechazo fisiológico del embrión. Estos trastornos incluyen, pero no se limitan a, fallas ováricas prematuras, hipogonadismo hipergonadotrópico, disgenesia gonadal, menopausia prematura o menopausia temprana.
- 15 - El término "ventana de implantación uterina" se refiere a un período muy corto que comienza aproximadamente 4 a 5 días después de la ovulación y dura aproximadamente 4 días. Esta ventana definida como la ventana de implantación define el período en el ciclo menstrual de la receptividad uterina al embrión. Durante la fase luteal leve, los eventos de remodelación uterina requeridos para un embarazo exitoso comienzan antes de la implantación con la decidualización del endometrio, que se produce incluso en ausencia de un concepto fertilizado en humanos.
- 20 - El término "sujeto" se refiere a un mamífero, preferiblemente un mamífero femenino, más preferiblemente un humano femenino. En una realización, el sujeto se refiere a una mujer que sufrió fallas de implantación. En otra realización, el sujeto se refiere a una mujer que está afectada por insuficiencia ovárica.
- 25 - El término "valor de referencia", como se utiliza en este documento, abarca ampliamente cualquier valor adecuado que pueda utilizarse como base para la comparación con respecto a la variable medida. Preferiblemente, el valor de referencia se obtiene de un sujeto femenino fértil.
- 30 - El término "expresión" se refiere indistintamente a la expresión de un gen que incluye transcripciones del gen, ARNm, productos de traducción de polipéptidos de tales transcripciones de ARN, ya sea que, si o no dicho producto se modifique de manera transcripcional, o expresión de producto génico, que incluye el polipéptido o proteína codificado. La expresión de un producto génico se puede determinar, por ejemplo, mediante inmunoensayo utilizando uno o más anticuerpos que se unen con el polipéptido. Alternativamente, la expresión de un gen se puede determinar mediante la medición de los niveles de ARNm, por ejemplo, mediante RT-PCR, qPCR.
- 30 - El término "nivel normalizado" se refiere a un nivel de expresión de un gen en relación con un nivel de expresión de un gen de referencia.

Descripción detallada

35 Como se muestra en los Ejemplos, cuando solo se utiliza la determinación de uno de (1) el estado de actividad de las células NK uterinas o del entorno endometrial de las citoquinas, (2) el estado de maduración de las células NK uterinas o (3) el estado de reclutamiento de las células NK uterinas, más del 40% de las mujeres analizadas se clasifican como que presentan un estado endometrial normal o un perfil apropiado de receptividad uterina.

40 Al implementar el método de la invención, los inventores han descubierto que entre el 42% de los sujetos clasificados como que presentan un endometrio normal según se determina solo al utilizar la determinación del estado de actividad de las células NK uterinas o el entorno endometrial de las citoquinas, casi el 25% no de hecho presentan un estado endometrial normal.

Además, entre el 43% de los sujetos clasificados como que presentan un endometrio normal según se determina solo al utilizar la determinación del estado de maduración de las células NK uterinas, casi el 75% de hecho no presenta un estado endometrial normal.

45 Adicionalmente, entre el 47% de los sujetos clasificados como que presentan un endometrio normal según se determina solo al utilizar la determinación del estado de reclutamiento de las células NK uterinas, el 80% de hecho no presenta un estado endometrial normal.

50 Por lo tanto, subsiste la necesidad de un método que permita una determinación más precisa del estado endometrial, permitiendo de esta manera que las mujeres que hubieran sido consideradas como "normales" se beneficien de un tratamiento personalizado y optimizado para restaurar la receptividad uterina y, por lo tanto, aumenten sus posibilidades de tener un embarazo evolutivo o un parto vivo.

La presente invención tiene como objetivo determinar la receptividad uterina/endometrial determinando el estado endometrial, con el fin de optimizar un tratamiento para restaurar una receptividad uterina.

Un objeto de la invención es un método para determinar en un sujeto femenino un perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina, que comprenden:

determinar sobre una muestra de endometrio el estado endometrial al medir:

a) biomarcadores del estado de actividad de las células asesinas naturales uterinas (uNK) o del entorno endometrial de la citoquina, y

5 b) biomarcadores del estado de reclutamiento y maduración de las células NK uterinas, comparar dichos valores con los valores de referencia,

de este modo determinar un estado endometrial que es indicador de una receptividad uterina apropiada o inapropiada.

10 Discriminar el estado endometrial de un sujeto en tres estados particulares: (1) estado subactivado, (2) estado normal y (3) estado sobreactivado, permite la clasificación del sujeto en dos categorías: receptividad uterina apropiada o inapropiada (estado endometrial normal) y receptividad uterina inapropiada, la última se divide en dos subcategorías: ausencia de receptividad (estado endometrial subactivado) y receptividad anormal (estado endometrial sobreactivado).

15 Discriminar los sujetos en estas tres categorías por lo tanto permite la monitorización de su tratamiento con el fin de restablecer una receptividad endometrial adecuada, lo que aumenta la tasa de éxito y optimiza el procedimiento ART.

Por lo tanto, un objeto de la invención es un método para determinar en un sujeto femenino un perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina, que comprenden: determinar sobre una muestra de endometrio el estado endometrial al medir:

20 a) biomarcadores del estado de actividad de las células asesinas naturales uterinas (uNK) o del entorno endometrial de la citoquina,

b) biomarcadores del estado de reclutamiento y maduración de las células NK uterinas, y

c) comparar dichos valores con los valores de referencia,

25 de este modo discriminar el estado endometrial de un sujeto en tres estados particulares: (1) estado subactivado, (2) estado normal y (3) estado sobreactivado, lo que permite la clasificación del sujeto en dos categorías: receptividad uterina apropiada (estado endometrial normal) y receptividad uterina inapropiada, la última se divide en dos subcategorías: ausencia de receptividad (estado endometrial subactivado) y receptividad anormal (estado endometrial sobreactivado).

En una realización, dicha muestra endometrial es una biopsia endometrial.

30 Como se utiliza en este documento, el estado de actividad de las células uNK se refiere al estado de actividad de las células uNK externas sobre las células endometriales circundantes.

Como se utiliza en el presente documento, el estado de actividad del entorno endometrial de las citoquinas se refiere al estado de actividad de las células inmunitarias sobre las células endometriales circundantes.

35 En una realización de la invención, el estado de actividad de las células uNK o el estado de actividad del entorno endometrial de las citoquinas se determina al medir el nivel de expresión de por lo menos uno de los siguientes biomarcadores IL-18, IL-6 e IL-12.

40 En una realización, el nivel de expresión de IL-18, IL-6 o IL-12 se puede medir al evaluar la cantidad de proteína, o de ácido nucleico correspondiente al gen que codifica IL-18, IL-6 o IL-12 (tal como, por ejemplo, la cantidad de ARN). En una realización, dicho nivel se puede normalizar al nivel de un producto de genes de referencia tales como, por ejemplo, RPL-13A, beta-2 microglobulina o proteína TBP tatabox. En otra realización, dicho nivel se puede normalizar al nivel medio geométrico de por lo menos dos productos de genes de referencia. En otra realización, dichos genes de referencia no son actina y GAPDH.

Como se utiliza en el presente documento, el término "IL-6" se refiere a interleuquina 6; el término "IL-12" se refiere a la interleuquina 12 y el término IL-18 se refiere a la interleuquina 18.

45 Los métodos para medir el nivel de expresión de IL-6, IL-12 o IL-18 en una muestra son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, bioensayos, tales como, por ejemplo, ELISA, método Luminex. (tal como, por ejemplo, el método Luminex con el kit de detección de Biorad (citoquinas humanas Bioplex pro), RT-PCR, RT-qPCR, PCR, qPCR, PGR en tiempo real, qPCR en tiempo real, chip de ADN y similares: e inmunoensayos, como, por ejemplo, la tecnología FloCytomix (Biosource) o la matriz de perlas citométricas BD (BD Bioscience).

50 De acuerdo con la invención, el estado de actividad de las células uNK o el estado de la actividad del entorno endometrial de las citoquinas se determina al medir el nivel de expresión de los biomarcadores IL-18 y Tweak y calcular una relación IL-18/Tweak.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, el término "Tweak" se refiere a una proteína codificada por el gen TNFSF12. Los métodos para medir el nivel de expresión de Tweak en una muestra son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, bioensayos, tal como, por ejemplo, ELISA, RT-PCR, RT-Qpcr, PCR Qpcr, PCR en tiempo real, qPCR en tiempo real, Chip de ADN, y similares; e inmunoensayos, tales como, por ejemplo, tecnología FloCytomix (Biosource) o matriz de perlas citométricas BD (BD Bioscience).
- En una realización de la invención, el reclutamiento de células uNK se determina mediante la cuantificación del número de células uNK.
- 10 El número de células uNK se puede cuantificar al determinar el número de células uterinas CD56+. La determinación de dicho número se puede llevar a cabo utilizando inmunohistoquímica de secciones congeladas o fijadas con parafina con anticuerpos anti-CD56 para identificar la tinción de las células NK. En una realización, las células CD56+ se cuentan en un campo de 40X. En otra realización, las células CD56+ se cuentan en cuatro campos 40X y luego se calcula el número medio.
- En otra realización de la invención, el reclutamiento de células uNK se determina al medir el nivel de expresión de CD56.
- 15 En una realización de la invención, la medición del nivel de expresión de CD56 es opcional.
- Los métodos para medir el nivel de expresión de CD56 en una muestra son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, bioensayos, tales como, por ejemplo, ELISA, RT-PCR, RT-Qpcr, PCR, qPCR, PGR en tiempo real, qPCR en tiempo real, chip de ADN y similares; e inmunoensayos, tales como, por ejemplo, tecnología FloCytomix (Biosource) o matriz de perlas citométricas BD (BD Bioscience).
- 20 Como se utiliza en el presente documento, el término "células CD56+" se refiere a las células que expresan CD56, también denominada NCAM (molécula de adhesión de células neurales).
- En una realización de la invención, el estado de maduración de las células uNK se determina al medir el nivel de expresión del siguiente biomarcador: IL-15.
- 25 En una realización, el nivel de expresión de IL-15 se puede medir al evaluar la cantidad de proteína, o del ácido nucleico correspondiente al gen que codifica IL-15 (tal como, por ejemplo, la cantidad de ARN). En una realización, dicho nivel puede normalizarse al nivel de un producto de genes de referencia tales como, por ejemplo, RPL-13A, beta-2 microglobulina o proteína TBP tatabox. En otra realización, dicho nivel puede normalizarse al nivel medio geométrico de por lo menos dos productos de genes de referencia. En otra realización, dichos genes de referencia no son actina y GAPDH.
- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "IL-15" se refiere a la interleuquina 15.
- Los métodos para medir el nivel de expresión de IL-15 en una muestra son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, pero no se limitan a, bioensayos tales como, por ejemplo, ELISA, método Luminex (tal como, por ejemplo, método Luminex que utiliza el kit de detección de Biorad (Bioplex pro Human cytokines), RT-PCR, RT-qPCR, PCR, qPCR, PCR en tiempo real, qPCR en tiempo real, chip de ADN y similares, e inmunoensayos, tales como por ejemplo, la tecnología FloCytomix (Biosource) o la matriz de perlas citométricas BD (BD Bioscience). De acuerdo con la presente invención, el estado de maduración de las células uNK se determina al medir el nivel de expresión de los siguientes biomarcadores: IL-15 y Fn-14 y calcular una relación IL-15/Fn14.
- 35 Como se utiliza en este documento, el término "Fn14" se refiere al factor de crecimiento de fibroblastos inducible-14, que es un receptor para Tweak.
- 40 Los métodos para medir el nivel de expresión de Fn-14 en una muestra son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, bioensayos, tales como, por ejemplo, ELISA, método Luminex, RT-PCR, RT-qPCR, PCR Qpcr, PCR en tiempo real, qPCR en tiempo real, chip de ADN, y similares; e inmunoensayos, tales como por ejemplo. Tecnología FloCytomix (Biosource) o matriz de perlas citométricas BD (BD Bioscience).
- 45 En una realización, un valor de referencia puede ser relativo a un número o valor derivado de estudios poblacionales, que incluyen, sin limitación, sujetos que tienen un rango de edad similar, sujetos del mismo grupo étnico o similar o sujetos en fallo de implantación de embriones o sujetos sometidos a insuficiencia ovárica.
- Un objeto de la invención es un método para determinar en un sujeto femenino un perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina, que comprenden:
- determinar sobre una muestra de endometrio el estado endometrial al
- 50 a) medir: biomarcadores del estado de actividad de las células asesinas naturales uterinas (uNK) o el entorno endometrial de la citoquina, y biomarcadores del estado de reclutamiento y maduración de las células NK uterinas,

b) clasificar el estado endometrial con base en la determinación de la relación de IL-18/Tweak al comparar dicho valor con el valor de referencia,

c) si el estado endometrial se clasifica como normal en la etapa b), clasificar el estado endometrial con base en la determinación de la relación de IL-15/Fn14 y opcionalmente la determinación de CD56, al comparar dichos valores con los valores de referencia,

5 de este modo determinar un estado endometrial que es indicador de una receptividad uterina apropiada o inapropiada.

Como se muestra en los ejemplos, si la relación de IL15/Fn14 se considera primero para clasificar el estado endometrial, el diagnóstico es inadecuado en el 14% de los casos.

10 En una realización de la invención, un valor de referencia se puede derivar de la medición del nivel de los siguientes biomarcadores: receptor de IL-18, IL-6, IL-12, IL-15, G-CSF o el cálculo de la relación de IL-18/Tweak o relación de IL-15/Fn-14 o la determinación del número de células uNK en por lo menos una muestra de control derivada de uno o más sujetos sustancialmente sanos. Como se utiliza en este documento, un "sujeto sustancialmente sano" se refiere a un sujeto que no ha experimentado una falla de implantación o un sujeto que se considera un sujeto fértil o un sujeto que tiene un estado endometrial normal.

15 En otra realización de la invención, un valor de referencia se puede derivar de la medición del nivel de los siguientes biomarcadores: receptor de IL-18, IL-6, IL-12, IL-15, G-CSF o el cálculo de la relación de IL-18/Tweak o relación de IL-15/Fn-14 o la determinación del número de células uNK en por lo menos una muestra de control derivada de uno o más sujetos que tienen un estado endometrial subactivado o sobreactivado.

20 En una realización de la invención, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

a) clasificación del estado endometrial con base en la determinación de células uNK o el valor de estado de actividad del entorno endometrial de la citoquina,

b) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en a), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del reclutamiento de células uNK,

25 c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), clasificación del estado endometrial con base en la combinación de los valores obtenidos para el estado de reclutamiento de células uNK y de mutación de células uNK.

Un objeto de la invención es un método para determinar en un sujeto femenino un perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina, que comprenden:

30 determinar sobre una muestra de endometrio el estado endometrial al:

a) medir biomarcadores del estado de actividad de las células asesinas naturales uterinas (uNK) o el entorno endometrial de la citoquina,

b) clasificar el estado endometrial como subactivado o sobreactivado al comparar dichos valores con los valores de referencia,

35 c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), medir biomarcadores del estado de reclutamiento y/o maduración de las células NK uterinas,

d) clasificar el estado endometrial con base en la determinación del reclutamiento y/o maduración de células uNK al comparar dichos valores con los valores de referencia.

En otra realización de la invención, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

40 a) clasificación del estado endometrial con base en la determinación del valor de la relación IL-18/Tweak,

b) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en a), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del número de células CD56+ uNK o del nivel de expresión de CD56,

45 c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), clasificación del estado endometrial con base en la combinación de los valores obtenidos para el número de células CD56+ uNK o para el nivel de expresión de CD56 y el valor de relación de IL-15/Fn-14.

En otra realización de la invención, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

a) medir el valor de la relación IL-18/Tweak como biomarcador del estado de actividad de las células asesinas naturales uterinas (uNK) o el entorno endometrial de la citoquina,

b) clasificar el estado endometrial como subactivado o sobreactivado al comparar dicho valor con un valor de referencia, c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), medir el valor de relación de IL-15/Fn-14 como biomarcador del estado de reclutamiento y/o maduración de las células NK uterinas,

5 d) clasificar el estado endometrial como subactivado o sobreactivado al comparar dicho valor con un valor de referencia.

En un aspecto de la divulgación, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

10 a) clasificación del estado endometrial con base en la determinación de un valor del estado de mutación de células uNK, b) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en a), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del reclutamiento de células uNK,

c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), clasificación del estado endometrial con base en la determinación de las células uNK o el valor de estado de actividad del entorno endometrial de la citoquina.

En un aspecto de la divulgación, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

15 a) clasificación del estado endometrial con base en la determinación del valor de relación de IL-15/Fn-14,

b) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en a), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del número de células CD56+ uNK o del nivel de expresión de CD56,

c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del valor de la relación IL-18/Tweak.

20 En un aspecto de la divulgación, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

a) clasificación del estado endometrial con base en la determinación de un valor del estado de mutación de células uNK,

25 b) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en a), clasificación del estado endometrial con base en la determinación de las células uNK o el valor de estado de actividad del entorno endometrial de la citoquina,

c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del reclutamiento de células uNK.

En un aspecto de la divulgación, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

a) clasificación del estado endometrial con base en la determinación del valor de relación de IL-15/Fn-14,

30 b) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado a), la clasificación del estado endometrial con base en la determinación del valor de la relación IL-18/Tweak,

c) si el estado endometrial no se puede clasificar como subactivado o sobreactivado en b), clasificación del estado endometrial con base en la determinación del número de células CD56+ uNK o del nivel de expresión de CD56.

35 En otra realización de la invención, también se puede determinar el nivel de expresión del receptor G-CSF en el endometrio.

Como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de G-CSF" se refiere al receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos.

40 Los métodos para medir el nivel de receptor G-CSF en una muestra son bien conocidos por los expertos, e incluyen, pero no se limitan a, bioensayos, tales como, por ejemplo, ELISA, métodos Luminex, RT-PCR, RT-Qpcr, PCR, qPCR, PGR en tiempo real, qPCR en tiempo real, chip de ADN y similares; e inmunoensayos, tales como, por ejemplo, tecnología FloCytomix (Biosource) o matriz de perlas citométricas BD (BD Bioscience).

La determinación del nivel de receptor G-CSF lleva a la clasificación del sujeto en dos grupos: sensibles a corticoides y no sensibles a corticoides.

45 En una realización de la invención, los métodos como se describió en este documento anteriormente pueden comprender adicionalmente una etapa en la que el sujeto se clasifica entre sensible a corticoides y no sensible a corticoides con base en la expresión del receptor G-CSF. Preferiblemente, el sujeto se clasifica en uno de estos dos grupos al presentar un endometrio sobreactivado.

En una realización de la invención, un valor de células uNK o de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, inferior a 0.5 veces un valor de referencia de uNK o del estado de actividad endometrial de citoquinas, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, es indicador de un estado endometrial subactivado.

- 5 En otra realización de la invención, un valor de células uNK o de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de la relación IL-18/Tweak, inferior a 0.45, 0.4, 0.35, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 veces un valor de referencia de uNK o del estado de actividad endometrial de citoquinas, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, es indicador de un estado endometrial subactivado.

En dichas realizaciones, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto sustancialmente sano.

- 10 En una realización de la invención, un valor de uNK o un valor de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, superior a 1.8 veces un valor de referencia del estado de actividad de uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, es indicador de estado endometrial sobreactivado.

- 15 En otra realización de la invención, un valor de uNK o un valor de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, superior a 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 veces un valor de referencia de uNK o del estado de actividad endometrial de citoquinas, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, es indicador de estado endometrial sobreactivado.

- 20 En dichas realizaciones, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto sustancialmente sano.

- 25 En una realización de la invención, un valor de uNK o un valor de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, comprende desde 0.5 veces hasta 1.8 veces un valor de referencia de uNK o del estado de actividad endometrial de citoquinas, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, y un número de células CD56+ uNK inferior a 10 por campo es indicador de un estado endometrial subactivado.

En dicha realización, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto sustancialmente sano.

- 30 En una realización de la invención, un valor de uNK o un valor de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, comprende entre 0.5 veces y 1.8 veces un valor de referencia de uNK o del estado de actividad endometrial de citoquinas, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, y un número de células CD56+ uNK comprende desde 10 hasta 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, inferior a 0.3 veces un valor de referencia del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-15/Fn-14, es indicador de un estado endometrial subactivado.

- 35 En otra realización de la invención, un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, inferior a 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 veces un valor de referencia del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-15/Fn-14, es indicador de un estado endometrial subactivado.

En dichas realizaciones, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto sustancialmente sano.

- 40 En una realización de la invención, un valor de uNK o un valor de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, comprende entre 0.5 veces y 1.8 veces un valor de referencia del estado de actividad de uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-18/Tweak, y un número de células CD56+ uNK comprende desde 10 hasta 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2 veces un valor de referencia del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-15/Fn-14, es indicador de un estado sobreactivado por hiperactivación de células uNK.

- 45 En otra realización de la invención, un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 veces un valor de referencia del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-15/Fn-14, es indicador de estado endometrial sobreactivado.

- 50 En dichas realizaciones, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto sustancialmente sano.

En una realización de la invención, un valor de uNK o un valor de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, comprende entre 0.5 veces y 1.8 veces un valor de referencia de uNK o del estado de actividad endometrial de citoquinas, preferiblemente un valor de referencia de la relación de

IL-18/Tweak, y un número de células CD56+ uNK superior a 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2 veces un valor de referencia del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-15/Fn-14, es indicador de un estado sobreactivado por hiperactivación de células uNK.

- 5 En otra realización de la invención, un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 veces un valor de referencia del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de referencia de la relación de IL-15/Fn-14, es indicador de estado endometrial sobreactivado.
- 10 En dichas realizaciones, los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto sustancialmente sano.
- En una realización de la invención, un valor de células uNK o de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, inferior a 0.03 es indicador de un estado endometrial subactivado.
- 15 En otra realización de la invención, un valor de células uNK o de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de la relación IL-18/Tweak, inferior a 0.025, 0.02, 0.015, 0.01, 0.005 es indicador de un estado endometrial subactivado.
- En una realización de la invención, un valor de célula uNK o de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de relación de IL-18/Tweak, superior a 0.11 es indicador de estado endometrial sobreactivado.
- 20 En otra realización de la invención, un valor de célula uNK o de estado de actividad endometrial de citoquina, preferiblemente un valor de la relación IL-18/Tweak, superior a 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5 es indicador de un estado endometrial subactivado.
- 25 En una realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, inferior a 10 por campo es indicador de un estado endometrial subactivado.
- En otra realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, inferior a 9, 8, 7, 6, 5, 3, 2, 1 por campo es indicador de un estado endometrial subactivado.
- 30 En una realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, comprende desde 10 hasta 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, inferior a 0.3 es indicador de un estado endometrial subactivado.
- 35 En otra realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, comprende desde 10 hasta 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, inferior a 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05 es indicador de un estado endometrial subactivado.
- En una realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, comprende desde 10 hasta 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2 es indicador de estado endometrial sobreactivado.
- 40 En otra realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, comprende desde 10 hasta 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 es indicador de estado endometrial sobreactivado.
- 45 En una realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, superior a 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2 es indicador de estado endometrial sobreactivado.
- 50 En otra realización de la invención, un valor de reclutamiento de células uNK, preferiblemente un número de células CD56+ uNK, superior a 70 por campo y un valor del estado de mutación de células uNK, preferiblemente un valor de relación de IL-15/Fn-14, superior a 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 es indicador de un estado endometrial sobreactivado.
- 50 En una realización, un valor del receptor G-CSF superior a 0.7 es indicador de un sujeto no sensible a corticoides.
- En otra realización, un valor del receptor G-CSF inferior o igual a 0.7 es indicador de un sujeto sensible a corticoides.
- En otra realización, un valor del receptor G-CSF no es indicador de sujetos sensibles a corticoides.

Otro objeto de la divulgación es un perfil de receptividad uterina, en el que dicho perfil es con base en a) el estado de actividad de las células NK uterinas (uNK) o entorno endometrial de la citoquina, y b) el estado de reclutamiento y maduración de las células NK uterinas, en una muestra de endometrio obtenida durante la ventana de implantación uterina.

- 5 En una realización, dicho perfil de receptividad uterina es con base en el nivel de expresión de por lo menos una de IL-18, IL-6 o IL-12, preferiblemente IL-18, y el nivel de expresión de IL-15 y CD56.

En otra realización, dicho perfil de receptividad uterina es con base en el nivel de expresión de por lo menos una de IL-18, IL-6 o IL-12, preferiblemente IL-18, y el nivel de expresión de IL-15 y el número de células CD56+ uNK.

- 10 En otra realización, dicho perfil de receptividad uterina es con base en el valor de relación de IL-18/Tweak y IL-15/Fn14 y el nivel de expresión de CD56.

En otra realización, dicho perfil de receptividad uterina es con base en el valor de relación de IL-18/Tweak y IL-15/Fn14 y el número de células CD56+ uNK.

En una realización, dicho perfil de receptividad uterina es con base en una determinación secuencial del estado endometrial primero con base en el valor de relación de IL-18/Tweak y luego en el valor de relación de IL-15/Fn14.

- 15 En una realización, dicho perfil de receptividad uterina se obtiene de acuerdo con el método descrito en este documento anteriormente.

En una realización, dicho perfil de receptividad uterina se clasifica entre apropiado o inapropiado (ausencia de receptividad o receptividad anormal) receptividad uterina con base en la determinación del estado endometrial (normal, subactivado o sobreactivado).

- 20 Otro objeto de la invención es un método para aumentar la tasa de éxito de un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (ART) en un sujeto femenino, que comprenden:

- determinar un perfil de receptividad uterina como se describió en este documento anteriormente, y
- determinar una recomendación personalizada para dicho sujeto dependiendo del perfil de receptividad uterina observado.

- 25 Otro objeto de la invención es un método para aumentar la tasa de éxito de un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (ART) en un sujeto femenino, que comprenden:

- determinar el estado endometrial de dicho sujeto durante la ventana de implantación uterina como se describió en este documento anteriormente, y
- determinar una recomendación personalizada para dicho sujeto dependiendo del estado endometrial observado.

- 30 En una realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado subactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad, la recomendación puede ser estimular mecánicamente en la fase luteal que precede al ciclo de IVF el endometrio creando una lesión local a través de una biopsia de endometrio. Sin estar limitado a la teoría, dicha lesión local puede inducir a las células inmunes y las citoquinas proinflamatorias para preparar el suelo para una futura implantación a través de una mejor adhesión.
- 35

En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado subactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad, la recomendación puede ser disminuir el nivel de la estimulación hormonal para disminuir la exposición de células endometriales a altas concentraciones de estradiol. Esto significa, por ejemplo, disminuir el número de unidades FSH para desencadenar la ovulación en caso de IVF (el nivel de estradiol medido en la sangre el día de activación de la ovulación debe ser inferior a 1500 pg/ml) o reemplazar el embrión congelado después de la descongelación en ciclos naturales monitorizados (y no como ciclo habitual sustituido por estrógenos y progesterona). Sin estar limitado a la teoría, una estimulación mínima o un reemplazo en el ciclo natural impedirá la agravación de la subactivación local ya presente. Los estrógenos no se introducirán en la suplementación durante la fase luteal después del reemplazo de embrión por las mismas razones.

40

45

- 50 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado subactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad, la recomendación puede ser estimular la tolerancia inmunitaria, angiogénesis y proliferación de células uNK a través de la administración de hormonas gonadotropinas coriónicas humanas (HCG) durante la ventana de implantación. Por ejemplo, se pueden inyectar 1500 UI de HCG 4, 6 y 8 días después de la recuperación de ovocitos (IVF) o 6-8-10 días después de la oleada de ovulación (reemplazo del embrión congelado en el ciclo natural). Sin limitado a una teoría, la HCG influirá profundamente en la tolerancia inmunológica, la angiogénesis en la interfaz materno-fetal y estará involucrada en la movilización de las células uNK a través de la

unión del receptor de manosa. Particularmente, la HCG inducirá la producción de VEGF por el epitelio endometrial, aumentará la proliferación de células endoteliales y la migración de las células musculares lisas que conducen a la maduración de los vasos.

5 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado subactivado o el perfil de receptividad uterina es inadecuado debido a una ausencia de receptividad, se recomienda tener relaciones sexuales después de la transferencia de embriones. Sin estar limitado a una teoría, el plasma seminal puede desempeñar un papel en la preparación del suelo para su misión de implantación mediante la regulación del reclutamiento y la activación de las células T reguladoras.

10 En una realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado sobreactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal, no se recomienda lesión local durante el ciclo que precede a la implantación de un embrión.

15 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado sobreactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal, se recomienda un alto nivel de estimulación ovárica con el fin de permitir un alto nivel de exposición se las células endometriales al estradiol. Por ejemplo, en el caso de la IVF, se utilizarán dosis normales de FSH para desencadenar la superovulación con el objetivo de recolectar de 9 a 12 ovocitos (la dosis inicial de FSH estará entre 225 y 400 UI). En caso de reemplazo de embrión congelado, se utilizará la sustitución por estrógenos y progesterona. Para aumentar la concentración local de estrógenos, se recomienda la vía de administración vaginal (estradiol 2 mg, 1 píldora tres veces al día por vía vaginal). Finalmente, en la fase luteal, después de la transferencia de embriones, se puede mantener la prescripción de estradiol (estradiol 2 mg, tres veces al día por vía oral o vaginal).

20 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado sobreactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal, se recomiendan altas dosis de progesterona después de la recuperación de ovocitos (por ejemplo, 400 mg tres veces al día por vía vaginal).

25 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado sobreactivado o el perfil de receptividad uterina no es apropiado debido a una receptividad anormal, se recomendarán fármacos dirigidos a controlar el entorno local proinflamatorio desde el comienzo de la estimulación. La elección de los fármacos dependerá de la determinación de la capacidad de respuesta de los corticoides con base en el nivel de expresión del receptor G-CSF como se describió en este documento anteriormente.

30 Por ejemplo, si el sujeto es sensible a los corticoides, los corticosteroides se pueden administrar desde el primer día del ciclo de los ciclos de IVF hasta la prueba de embarazo (un ejemplo del corticosteroide que se va a administrar es la Prednisona 20 mg desde el día 1 hasta el día de la prueba de embarazo). Si el sujeto no es sensible a los corticoides, se puede administrar una combinación de una dosis baja de ácido acetilsalicílico con heparinas de bajo peso (como Lovenox, 0.4 días de recuperación de ovocitos al día de la prueba de embarazo). Otro ejemplo de tratamiento cuando el sujeto no es sensible a los corticoides es el uso de intralípidos. Los intralípidos se han explorado principalmente para controlar la citotoxicidad de las células NK periféricas de la sangre, pero los resultados preliminares sugieren un control de la citotoxicidad de las células NK uterinas y una inmunorregulación en las células T reguladoras. En una realización, 100 ml de intralípidos al 20% se disuelve en 500 cc de solución salina normal de 7 a 14 días antes de la transferencia de embriones. Preferiblemente, el tiempo de infusión de 500 ml no debe ser inferior a 2 horas. La cura se puede repetir con una prueba de embarazo positiva y luego administrar cada mes hasta la semana 12.

35 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado sobreactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal, se debe administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de agente antioxidante. Un ejemplo de agente antioxidante que se puede administrar al sujeto es TOCO 500 mg, 2 píldoras al día desde D1 hasta la prueba de embarazo D.

40 En otra realización de la invención en la que el estado endometrial determinado como se describió en este documento anteriormente es un estado sobreactivado o el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal, no se recomienda tener relaciones sexuales después de la transferencia de embriones.

45 La presente invención también tiene como objetivo proporcionar métodos para facilitar la evaluación de la infertilidad clínica. La presente divulgación también se refiere a sistemas con base en ordenador para facilitar la evaluación de la infertilidad clínica. Los métodos y sistemas se pueden implementar para facilitar la evaluación de un sujeto para un tratamiento de fertilización in vitro o un procedimiento de tecnología de reproducción asistida. Específicamente, los métodos y sistemas se pueden implementar para facilitar la evaluación de la receptividad uterina de un sujeto y posteriormente proporcionar un tratamiento personalizado para la fertilización in vitro de dicho sujeto.

50

En una realización, el método incluye obtener elementos de información de un sujeto femenino para proporcionar un perfil para el sujeto femenino, en el que cada elemento de información se relaciona con variables del sujeto preseleccionadas, comparando el perfil del sujeto femenino con una biblioteca de patrones de perfil conocidos que se sabe indican la capacidad de respuesta a un procedimiento de fertilización in vitro utilizando un algoritmo basado en las variables del sujeto preseleccionadas, en las que la comparación proporciona una evaluación del sujeto femenino para un procedimiento de fertilización in vitro, en particular una evaluación de la receptividad uterina del sujeto femenino, con el fin de proporcionar un tratamiento personalizado para la fertilización in vitro de dicho sujeto. En una realización, una de dichas variables es el perfil de receptividad uterina como se definió en este documento anteriormente. En otra realización, una de dichas variables es el estado endometrial como se definió en este documento anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, los elementos de información pueden ser proporcionados por el sujeto femenino en base a un cuestionario escrito o electrónico o pueden ser solicitados, transcritos o registrados de otra manera por un profesional de la salud, como un médico, una enfermera, un técnico o similares.

Los elementos de ejemplo de información relacionada con las variables de sujetos preseleccionados incluyen, pero no se limitan a: datación histológica (para determinar que el sujeto está en la ventana de receptividad); características de los sujetos, tales como edad, historial de infertilidad previa, diagnóstico clínico; características endometriales, tales como grosor endometrial, volumen endometrial, vascularización endometrial, doppler de arteria uterina; etiología de la infertilidad, información sobre el tratamiento clínico, tal como el tipo de medicamento, el número de días de estimulación, el número de ovocitos, etc.; datos de morfología embrionaria convencional, tales como el número y calidad de los embriones transferidos, la etapa de desarrollo, el grado y similares; evaluación de la reserva ovárica, tal como el nivel de 3 días de hormona estimulante del folículo (FSH), el nivel de 3 días de hormona antimülleriana (HAM), el recuento de folículos antrales en el día 3; índice de masa corporal, enfermedad ovárica poliquística, espermograma con espermocitograma, infertilidad femenina no explicada, número de abortos espontáneos, año, otras causas de infertilidad femenina, número de embarazos previos, número de partos previos, endometriosis, enfermedad tubárica, ligadura de trompas, infertilidad masculina, fibroides uterina, hidrosalpinx y causas de infertilidad masculina.

En otra realización, el método incluye obtener elementos de información relacionados con por lo menos las variables necesarias para determinar el estado endometrial como se describió en este documento anteriormente, o más. Como tal, en otras realizaciones, el método incluye obtener elementos de información relacionados con dichas variables y por lo menos una más, que incluye 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 10 o más y similares.

Preferiblemente, además del estado endometrial y/o el perfil de receptividad uterina, el método incluye obtener elementos de información del siguiente grupo: datación histológica (determinación de la ventana de receptividad); características endometriales (tales como, por ejemplo, grosor endometrial, volumen endometrial, vascularización endometrial, doppler de arteria uterina); edad del sujeto; etiología de la infertilidad; datos de infertilidad, tales como el resumen de la historia anterior y la cantidad y calidad de los embriones transferidos; evaluación hormonal de la reserva ovárica (AMH, FSH, recuento de folículos antrales); tipo de ART (IVF, ICSI, IMSI, inseminación).

En otra realización, el método incluye asignar una importancia relativa ponderada a cada variable del sujeto preseleccionada en relación con otras variables del sujeto preseleccionadas.

En algunas realizaciones, la comparación incluye aplicar una regla de decisión. En algunas realizaciones, el algoritmo de análisis de datos comprende el uso de un árbol de clasificación. En otras realizaciones, el algoritmo de análisis de datos no es paramétrico, tal como el uso de una prueba de rango con signo de Wilcoxon. En ciertas realizaciones, el algoritmo de análisis de datos detecta diferencias en una distribución de valores de características. En algunas realizaciones, el algoritmo de análisis de datos incluye el uso de un árbol de regresión aditiva múltiple. En algunas realizaciones, el algoritmo de análisis de datos es una regresión logística.

Un enfoque para analizar estos datos es utilizar un algoritmo de árbol de clasificación que busque patrones y relaciones en grandes conjuntos de datos. Un "árbol de clasificación" es una partición recursiva para evaluar a un sujeto femenino para un procedimiento de fertilización in vitro utilizando una serie de preguntas que están diseñadas para ubicar al sujeto con precisión en una de las clases. Cada pregunta cuestiona si la condición de un sujeto satisface un predictor dado, y cada respuesta se utiliza para guiar al usuario hacia abajo en el árbol de clasificación hasta que se pueda determinar una clase en la que cae el sujeto. Como se utiliza en este documento, un "predictor" es el rango de valores de las características, tales como, por ejemplo, el estado de actividad del entorno endometrial de uNK o citoquina o el estado de maduración y reclutamiento de uNK.

Como se discutió anteriormente, la evaluación de un sujeto femenino para un procedimiento de fertilización in vitro, incluye la determinación de su receptividad uterina, se realiza al obtener y comparar los elementos de información del sujeto femenino con una biblioteca de patrones de perfil conocidos que se sabe son indicativos de la capacidad de respuesta a procedimiento de fertilización in vitro utilizando un algoritmo basado en dichas variables de sujeto preseleccionadas. En algunas realizaciones, la evaluación de un sujeto se proporciona en un informe. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método incluye adicionalmente una etapa de preparación o generación de un informe que incluye información(es) con respecto a la probabilidad de éxito del sujeto para un procedimiento de fertilización

in vitro y recomendaciones para un tratamiento personalizado como se describió en este documento anteriormente. Por ejemplo, un método del sujeto puede incluir además una etapa para generar o generar un informe que proporcione los resultados de la evaluación de un sujeto, el cual se puede proporcionar en forma de un medio electrónico (por ejemplo, una pantalla electrónica sobre un monitor de ordenador), o en la forma de un medio tangible (por ejemplo, un informe impreso en papel u otro medio tangible).

El informe también puede incluir información sobre el centro de pruebas, la información que es relevante para el hospital, la clínica o el laboratorio en el que se realizó la recolección de muestras y/o generación de datos. Esta información puede incluir uno o más detalles relacionados, por ejemplo, con el nombre y la ubicación de la instalación de prueba, la identidad del técnico de laboratorio que realizó la prueba y/o quién ingresó los datos de entrada, la fecha y la hora en que se realizó y/o analizó la prueba, la ubicación en la que se almacenan los datos de la muestra y/o el resultado, el número de lote de los reactivos (por ejemplo, el kit, etc.) utilizados en el ensayo, y similares. Dicho informe también puede incluir información(es) relacionada con el proveedor del servicio, datos del sujeto y datos de muestra.

La porción interpretativa del informe incluye información generada después del procesamiento de los datos como se describe en este documento. El informe interpretativo puede incluir una evaluación de un sujeto femenino para un procedimiento de fertilización in vitro. El informe interpretativo puede incluir, por ejemplo, la interpretación de la receptividad uterina basada en los datos obtenidos tal como se describió anteriormente y, opcionalmente, recomendación(es) para un tratamiento personalizado para la fertilización in vitro.

Los métodos y sistemas descritos en este documento se pueden implementar de numerosas maneras. En una realización de particular interés, los métodos implican el uso de una infraestructura de comunicaciones, por ejemplo, Internet. A continuación, se discuten varias realizaciones de la invención. También debe entenderse que la presente invención se puede implementar en diversas formas de hardware, software, firmware, procesadores, o una combinación de los mismos. Los métodos y sistemas descritos aquí se pueden implementar como una combinación de hardware y software. El software se puede implementar como un programa de aplicación incorporado de forma tangible en un dispositivo de almacenamiento de programas, o en diferentes partes del software implementado en el entorno informático del usuario (por ejemplo, como un applet) y en el entorno informático del revisor, donde el revisor puede ubicarse en un sitio remoto asociado (por ejemplo, en las instalaciones de un proveedor de servicios).

De acuerdo con la divulgación, los diversos elementos del dispositivo informático, tales como el dispositivo de entrada, pueden asociarse con otros elementos del sistema a través de una conexión por cable o una conexión inalámbrica, que incluye, por ejemplo, una conexión LAN inalámbrica, el protocolo de conexión Bluetooth, el protocolo de conexión ZigBee, protocolo de conexión de radiofrecuencia o un protocolo de conexión de teléfono celular, que incluye el acceso múltiple derivado de código (CDMA) o mediante un sistema global para comunicaciones móviles (GSM).

De acuerdo con la divulgación, el programa de aplicación para ejecutar los algoritmos descritos en este documento puede ser cargado y ejecutado por una máquina que comprenda cualquier arquitectura adecuada. En general, la máquina involucra una plataforma informática que tiene hardware, tal como una o más unidades de procesamiento central (CPU), una memoria de acceso aleatorio (RAM) e interfaz(s) de entrada/salida (I/O). La plataforma informática también incluye un sistema operativo y un código de microinstrucción. Los diversos procesos y funciones descritos en este documento pueden ser parte del código de microinstrucción o parte del programa de aplicación (o una combinación de los mismos) que se ejecuta a través del sistema operativo. Además, se pueden conectar otros dispositivos periféricos a la plataforma informática, como un dispositivo de almacenamiento de datos adicional y un dispositivo de impresión.

De acuerdo con la divulgación, parte o todos los datos de entrada y salida también se pueden enviar electrónicamente; ciertos datos de salida (por ejemplo, informes) se pueden enviar de forma electrónica o telefónica (por ejemplo, por fax, por ejemplo, utilizando dispositivos como la devolución de fax). Los dispositivos de recepción de salida de ejemplo pueden incluir un elemento de visualización, una impresora, un dispositivo de fax y similares. Las formas electrónicas de transmisión y/o visualización pueden incluir correo electrónico, televisión interactiva y similares. En una realización de particular interés, todos o una porción de los datos de entrada y/o todos o una porción de los datos de salida (por ejemplo, generalmente por lo menos el informe final) se mantienen en un servidor web para el acceso, preferiblemente el acceso confidencial, con Los navegadores típicos. Los datos pueden ser accedidos o enviados a profesionales de la salud como se desee. Los datos de entrada y salida, incluidos todos o una parte del informe final, se pueden utilizar para completar el registro médico de un sujeto que puede existir en una base de datos confidencial en el centro de atención médica.

De acuerdo con la divulgación, un sistema para uso en los métodos descritos aquí generalmente incluye por lo menos un procesador de ordenador (por ejemplo, cuando el método se lleva a cabo en su totalidad en un solo sitio) o por lo menos dos procesadores de ordenador en red (por ejemplo, cuando los datos deben ser ingresados por un usuario y transmitido a un sitio remoto a un segundo procesador de ordenador para análisis, donde el primer y el segundo procesador de ordenador están conectados por una red, por ejemplo, a través de una intranet o Internet). El sistema también puede incluir un componente(s) de usuario para la entrada; y un componente(s) de revisión para la revisión de datos, informes generados e intervención manual. Los componentes adicionales del sistema pueden

incluir uno o más componentes del servidor; y una(s) base(s) de datos para almacenar datos. Los procesadores de ordenador pueden ser procesadores que se encuentran normalmente en ordenadores de escritorio personales (por ejemplo, IBM, Dell, Macintosh), ordenadores portátiles, mainframes, miniordenadores u otros dispositivos informáticos, tales como dispositivos de teléfonos inteligentes, que incluyen, por ejemplo, un dispositivo Apple(R) iPhone(R).

De acuerdo con la divulgación, la arquitectura cliente/servidor en red se puede seleccionar como se desee, y puede ser, por ejemplo, un modelo clásico de servidor de cliente de dos o tres niveles. Un sistema de gestión de bases de datos relacionales (RDMS), ya sea como parte de un componente del servidor de aplicaciones o como un componente separado (máquina RDB) proporciona la interfaz a la base de datos.

En una realización, la arquitectura se proporciona como una arquitectura cliente/servidor centrada en la base de datos, en la que la aplicación cliente generalmente solicita servicios al servidor de la aplicación que realiza solicitudes a la base de datos (o al servidor de la base de datos) para completar el informe con los diversos elementos de informe según sea necesario, en particular los elementos del informe interpretativo, especialmente el texto de interpretación y las alertas. El servidor (es decir, ya sea como parte de la máquina del servidor de aplicaciones o una máquina de base de datos relacional o RDB separada) responde a las solicitudes del cliente.

La presente divulgación también contempla un medio de almacenamiento legible por ordenador (por ejemplo, CD-ROM, llave de memoria, tarjeta de memoria flash, disquete, etc.) que haya almacenado en él un programa que, cuando se ejecuta en un entorno informático, proporciona la implementación de algoritmos para llevar a cabo la totalidad o una porción de los métodos de análisis para evaluar un sujeto para un procedimiento de fertilización in vitro como se describe en el presente documento. Cuando el medio legible por ordenador contiene un programa completo para llevar a cabo los métodos descritos en el documento, el programa incluye instrucciones del programa para recopilar, analizar y generar resultados, y generalmente incluye dispositivos de código legibles por ordenador para interactuar con un usuario como se describe aquí, procesando esos datos junto con la información analítica, y la generación de medios impresos o electrónicos únicos para ese usuario.

De acuerdo con la divulgación, cuando el medio de almacenamiento proporciona un programa que proporciona la implementación de una porción de los métodos descritos en este documento (por ejemplo, el aspecto del lado del usuario de los métodos (por ejemplo, entrada de datos, capacidades de recepción de informes, etc.)), el programa proporciona transmisión de los datos ingresados por el usuario (por ejemplo, a través de Internet, a través de una intranet, etc.) a un entorno informático en un sitio remoto. El procesamiento o la finalización del procesamiento de los datos se lleva a cabo en el sitio remoto para generar un informe. Después de revisar el informe y completar cualquier intervención manual necesaria para proporcionar un informe completo, el informe completo se transmite al usuario como un documento electrónico o impreso (por ejemplo, un informe en papel o por fax). El medio de almacenamiento que contiene un programa de acuerdo con la invención se puede empaquetar con instrucciones (por ejemplo, para la instalación, uso, etc.) del programa, registrados en un sustrato adecuado o en una dirección web donde se puedan obtener dichas instrucciones. El medio de almacenamiento legible por ordenador también se puede proporcionar en combinación con uno o más reactivos para llevar datos determinantes de información del sujeto, por ejemplo, material para determinar el estado endometrial como se describió en este documento anteriormente.

Los materiales para uso en los métodos de la presente invención son adecuados para la preparación de kits producidos de acuerdo con procedimientos bien conocidos. La invención proporciona así kits que comprenden reactivos útiles para ensayar la expresión de genes divulgados en el presente documento y para evaluar el estado endometrial del sujeto, por ejemplo.

Por ejemplo, un kit puede incluir una o más sondas de ácido nucleico que se hibridan específicamente con los productos genéticos como se describió en este documento anteriormente, tales como CD56, IL-18, IL-6, IL-12, Tweak, IL-15, G-CSF receptor y Fn14.

En algunos casos, un kit incluirá, además de una sonda que se hibrida específicamente con los productos de ácido nucleico como se describió en este documento anteriormente, una o más sondas que se hibridan específicamente con un producto genético de referencia tales como RPL-13A, beta-2 microglobulina y proteína TBP tatabox. Dichas sondas se pueden utilizar para determinar los niveles de expresión normalizados de los genes de interés.

Los kits pueden comprender opcionalmente reactivo(s) con una descripción o etiqueta de identificación o instrucciones relacionadas con su uso en los métodos de la presente invención. Los kits pueden comprender recipientes (que incluyen placas de microtitulación adecuados para su uso en una implementación automatizada del método), cada uno con uno o más de los diversos reactivos (normalmente en forma concentrada) utilizados en los métodos de la invención, que incluyen, por ejemplo, micromatrices prefabricadas, tampones, trifosfatos de nucleótidos apropiados (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP; o rATP, rCTP, rGTP y UTP), transcriptasa inversa, ADN polimerasa, ARN polimerasa y una o más sondas y cebadores de la presente invención (por ejemplo, poli(T) de longitud apropiada o cebadores aleatorios unidos a un promotor reactivo con la polimerasa de ARN).

Las instrucciones para el uso de algoritmos matemáticos utilizados para evaluar a un sujeto femenino para un ciclo de tratamiento de fertilización in vitro también se pueden incluir en un kit de sujeto. En tales realizaciones, los kits incluirán además un medio escrito o electrónico, o instrucciones para acceder a una base de datos remota, como se describió anteriormente, para proporcionar y/o recibir información, que generalmente incluye datos de información del sujeto, para llevar a cabo los métodos como se describió anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Sistema experto para la evaluación de la receptividad uterina.

Figura 2: (A) Correlación de la expresión del ARNm de IL-15 en dos ciclos distintos (n=37 sujetos), (B) Correlación de la expresión del ARNm de IL-18 en dos ciclos distintos (n=37 sujetos), (C) Correlación de Expresión de ARNm de TWEAK en dos ciclos (n=15 sujetos).

Figura 3: Correlación de la expresión del receptor de GCSF y la respuesta a los corticoides.

Figura 4: Evolución de IL-15/Fn-14 antes y bajo los corticoides. (A) muestra la expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 en 14 casos de fallas de implantación diagnosticados con sobreexpresión basal tanto de sobreexpresión de IL-18/TWEAK como de IL-15/Fn-14. (B) muestra la expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 para 10 pacientes con una sobreexpresión de IL-18/TWEAK y una baja expresión de IL-15/Fn-14.

La presente invención se ilustra con más detalle a continuación mediante los siguientes ejemplos

Ejemplos

Materiales y métodos

Los sujetos con historia de fallas de implantación repetida e inexplicables previos se evaluaron en la fase luteal media de un ciclo no conceptual.

El muestreo endometrial se realizó:

- durante un ciclo natural monitorizado de 7 a 9 días después de la oleada de ovulación (LH) si el sujeto tuvo ciclos regulares,

bajo tratamiento de reemplazo de estrógeno/progestina aplicado para transferir embriones descongelados si los ciclos son irregulares o el sujeto está en amenorrea. Luego se administró diariamente el estradiol micronizado (Provames, Cassenne, París, Francia) 2 mg se desde el día 1 al 21 por vía oral, y progesterona micronizada (Utrogestan; Besins-Iscovesco Pharmaceuticals, París, Francia) 200 mg al día, por vía vaginal desde los días 14 a 21.

Las biopsias se realizan con una pipeta Cormier estándar (CCD Laboratories, París, Francia). Una porción de la muestra está incorporada en parafina para la datación histológica de acuerdo con los criterios publicados y para la tinción inmunológica y la enumeración de células CD56+ (Ventana, 760-2625). La datación y la inmunotinción CD56+ se realizan para confirmar la fase luteal media y determinar el número medio de uNK/campo observado. Otra muestra se transfiere inmediatamente a una Solución de estabilización de ARN (ARN más tarde, QIAGEN, Courtabeuf, Francia) y se almacena inmediatamente a -80°C hasta su uso posterior. La extracción de ARN se realiza varios días después (después de la confirmación de la fase luteal).

Inmunohistoquímica

Las secciones se cortan sobre un microtomo (5 µm de grosor), se colocan en portaobjetos de vidrio Superfrost (CML, Nemours, Francia). El día del experimento, los portaobjetos se desparafinaron en histolemon y se rehidrataron con alcohol. Las actividades de peroxidasas y biotinas endógenas se inhiben mediante la incubación de los portaobjetos en una solución específica (Solución de bloqueo de peroxidasa, Dako, Trappes, Francia y kit de vector de bloqueo de Avidina/Biotina, Abcys, París, Francia). El bloqueo de proteínas se logra mediante una incubación de 20 minutos en PBS (solución salina tamponada con fosfato) con un 1% de suero de conejo (o suero de cabra para la tinción con CD56) y un 5% de suero humano normal (suero de bloqueo). Las secciones se incuban 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal de ratón antihumano en caso de tinción con CD56 (Immunotach, Marsella, Francia). La concentración es de 1 µg/ml para los anticuerpos anti CD56. El anticuerpo se diluye en suero de bloqueo. Entre cada una de las etapas, los portaobjetos se enjuagan tres veces con PBS. La tinción inmunológica se realiza utilizando un anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti cabra o ratón de cabra del kit Vector ABC, Abcys, París, Francia) durante 20 minutos, seguido de incubación con una estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 30 minutos y luego mediante el uso de sustrato tampón suplementado con DAB líquido y solución de sustrato de peróxido de hidrógeno (Dako, Trappes, Francia). Las secciones se incuban durante 5 minutos con hematoxilina de Mayer (Interchim, Montlucon, Francia). Finalmente, los portaobjetos se enjuagan en agua destilada complementada con 1% de agua amoniacal y se montan con Ultramount (Dako, Trappes, Francia).

Para cada muestra, las células CD56+ se cuentan en cuatro campos 40X y luego se calcula la media.

## Extracción total de ARN y transcripción inversa.

Un fragmento de cada biopsia endometrial se interrumpe directamente en el tampón de lisis de un kit RNeasy (QIAGEN, Courtabeuf, Francia) utilizando un Ultra Turrax T15 (IKA-WERKE). El ARN total se extrae utilizando el kit RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realiza una digestión adicional con DNasa durante el proceso de extracción (conjunto de DNasa sin RNasa, QIAGEN, Courtabeuf, Francia). La integridad y abundancia del ARN se determina utilizando el sistema Experion (kit Experion ARN StdSens, Bio-Rad, Hercules, CA) y el ARN se almacena a -80°C hasta su uso final.

El ARN total (1 µg) se transcribe de forma inversa en ADNc utilizando cebadores aleatorios y Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles sin transcriptasa inversa se realizan sistemáticamente para detectar la contaminación del ADN genómico. El ADNc se almacena a -20°C hasta su uso posterior.

## PCR en tiempo real

Se diseñaron pares de cebadores ya publicados como específicos para TWEAK (Tweak-S TGCACCTAAAGGCCGGAACACG (SEQ ID NO: 1) y Tweak-AS CAGCGCAGGGCCAGCACACCATCC (SEQ ID NO: 2)), IL-18 (IL-18-S ATAAAGATGGCTGCTGAACC (SEQ ID NO: 3) e IL-18-AS TCAAATAGAGGCCGATTTCC (SEQ ID NO: 4)), Beta-2 microglobulina (β2M) (b2M-S TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT (SEQ ID NO: 5) y b2M-AS TCTCTGCTCCCACCTCTAAGT (SEQ ID NO: 6)), proteína ribosomal L13A (RPL13A) (RPL13A-S CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA (SEQ ID NO: 7) y RPL13-AS TTGAGGACCTCTGTGATTTGTCAA (SEQ ID NO: 8)). Se diseñaron cebadores específicos Fn14 (Fn14-S TTTCTGGCTTTTTGGTCTGG (SEQ ID NO: 9) y Fn14-AS GGCACATTGTCACCTGGATCA (SEQ ID NO: 10)), IL-15 (IL-15-S CTAGAGCCAACTGGGTGAATG (SEQ ID NO: 11) y IL-15 AS CATCTCCGACTCAAGTGAAA (SEQ ID NO: 12)) y receptor G-CSF (G-CSFR-S GTCCAAGATCACAAAGCTGGT (SEQ ID NO: 13) y G-CSFR-AS CCGCACTCCTCCAGACTTC (SEQ ID NO: 14)) utilizando la sonda universal centro de diseño de ensayos de bibliotecas ([www.rocche-applied-science.com](http://www.rocche-applied-science.com)). Las secuencias Fn14, IL-15 y G-CSFR se buscaron en las secuencias de GenBank con el programa BLAST para asegurar la especificidad de los cebadores.

La PCR en tiempo real se lleva a cabo utilizando un aparato LightCycler 480 (Roche, Meylan, Francia). Las reacciones se configuran utilizando las siguientes concentraciones finales: 0.5 µM de cebadores sentido y antisentido, mezcla 1X 480 SYBR Green Master y 4 µl de ADNc diluido 1/20. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: desnaturalización (95°C durante 5 min), amplificación y cuantificación (95°C durante 10 s, 60°C durante 10s y 72°C durante 15s) repetida 40 veces, un programa de curva de fusión (65- 95°C con una velocidad de inclinación de 2.2°C/s) y una etapa de enfriamiento a 4°C. El ensayo incluyó un control sin plantilla, un calibrador y cada uno de los ADNc de prueba. Todos se llevaron a cabo por duplicado.

La eficiencia de la amplificación se estimó utilizando diluciones en serie de cada amplicón específico. Los datos se analizaron utilizando el software de cuantificación relativa LightCycler 480, utilizando la estrategia de normalización con la media geométrica de dos controles internos seleccionados.

Los dos controles internos (β2M, RPL13A) utilizados en este estudio fueron seleccionados por el programa geNorm (datos no mostrados). Cada eficiencia de amplificación específica fue >1.8.

## Resultados 1

Cada novena pareja en Europa y EE. UU. se ve afectada por trastornos de la implantación y por el residuo del embarazo y la mayoría de las pérdidas del embarazo se producen antes o durante la implantación. Por lo tanto, entender el diálogo cruzado entre los componentes fetales y maternos antes, durante y después de sus confrontaciones sigue siendo un gran desafío.

La implantación humana se puede describir como un proceso de tres etapas que comienza con la aposición y la adhesión de un blastocisto competente al epitelio del endometrio y continúa por una invasión extensa durante el primer trimestre del embarazo en un endometrio receptivo. El proceso de implantación humana altamente recíproco complejo conduce a la construcción esencial de una placenta hemocorial.

Los eventos de remodelación uterina requeridos para un embarazo exitoso comienzan antes de la implantación con la decidualización del endometrio, que ocurre incluso en ausencia de un concepto fertilizado en humanos. Estas modificaciones endometriales definen la ventana de implantación y duran 5 días, de 4 a 9 días después de la ovulación, y constituyen el endometrio receptivo. La decidualización humana se caracteriza por una afluencia de una población de linfocitos distintivos compuesta principalmente por células asesinas maternas naturales uterinas. La invasión de trofoblastos está dirigida por células asesinas naturales uterinas (uNK) a través de una liberación orquestada y regulada de citoquinas y factores proangiogénicos que promueven la remodelación vascular.

La descidualización es un proceso vital para el embarazo humano, que funciona para proporcionar tolerancia inmunitaria materna, proteger al feto y regular la placentación. El entorno local y su equilibrio inmunitario serán cruciales.

Desde un punto de vista inmunitario, la ventana de implantación se caracteriza por un cambio de categorías de las células inmunitarias. Mientras que, en la fase de proliferación, la mayoría de las células inmunitarias pertenecen a la inmunidad local adaptativa para defender el tracto reproductivo de la infección, en la fase luteal media, la mayoría de las células inmunes pertenecen a la inmunidad innata. Dicho cambio aparece como fundamental para permitir el fenómeno de la tolerancia local al feto "semiallogénico".

Entonces, en el momento de la implantación, los principales actores inmunitarios son las células asesinas naturales uterinas (65-70%), las células presentadoras de antígenos como macrófagos (10-20%), células reguladoras T (<20%) y células dendríticas (<2%). Las células NK uterinas difieren de su contraparte periférica, no solo en el fenotipo sino también en la función aparente. Las células NK uterinas son normalmente CD56bright/CD16-, mientras que las NK periféricas son CD56dim/CD16+. El CD16 participa directamente en el desencadenamiento de la lisis de las células objetivo. El repertorio de los receptores de activación e inhibición que regulan la actividad relacionada con NK son diferentes si se comparan con las células CD56bright que se originan de la sangre. La ausencia de expresión de CD16 en uNKs da como resultado una citotoxicidad reducida en estas células, cambiando la función a la producción de citoquinas. Sin embargo, las células NK uterinas son potencialmente citotóxicas si se activan en un entorno local y son capaces de eliminar las células infectadas por el virus o las células trofoblásticas o embriones activados a través de un exceso de citoquinas proinflamatorias.

Los ratones transgénicos para IL-15 son fértiles, pero muestran una integridad decidual deteriorada, arterias espirales no modificadas y falta de uNK en la implantación. La IL-15 participa directamente en el reclutamiento uterino post-ovulatorio de células NK. Se ha informado que la IL-15 es esencial para la producción de citoquinas tipo 2 por las células uNK. A diferencia de sus efectos en las células NK de la sangre, la interleuquina-15 no transforma las células uNK en células citolíticas potentes si no están presentes en exceso y participaron en su maduración. Esto es de importancia crítica para una célula que está presente en la interfaz materno-fetal donde la actividad citolítica destruiría el trofoblasto. En humanos, la expresión endometrial de ARNm de IL-15 se correlaciona con el reclutamiento local de células NK uterinas y la angiogénesis local. Más aún, se ha informado de agotamiento o un exceso de expresión de IL-15 en el endometrio luteal leve de sujetos con antecedentes de fracasos de implantes inexplicables después de la IVF-ET. Por lo tanto, es razonable suponer que, en el útero humano, la IL-15 puede desempeñar un papel en la promoción de la supervivencia y expansión de las células uNK, así como en impulsar su diferenciación hacia un fenotipo no citotóxico. Sin embargo, si se expresa demasiado, la IL-15 puede desencadenar una citotoxicidad local.

En relación con la expresión endometrial de IL-15, la IL-18 sola es una citoquina Th-2 promotora, con un efecto positivo en la desestabilización crucial de las arterias espirales a través de la acción de la angiopoyetina-2. Su función principal es la remodelación del lado materno de la vasculatura. Sin embargo, la interleuquina-18 es una citoquina bivalente capaz de reaccionar como una citoquina Th-1 pro-inflamatoria en presencia de interleuquina-12. Coestimulada con IL-12, la IL-18 mejora la producción local de IFN-gamma y TNF y activa las células NK uterinas en células asesinas citotóxicas. La IL-18 es representativa del equilibrio de la citoquina dentro del endometrio, si carece de la preparación de las arterias espirales a ser invadidas no es eficaz y la implantación falla. En exceso, la IL-18 se comporta como una citoquina Th-1 y activará las células circundantes inmunitarias para inducir una actividad nociva citotóxica.

Para comprender la función local de IL-15 e IL-18 es necesario tener en cuenta la expresión local de inmunorreguladores tales como TWEAK, que es capaz de modular los efectos de las citoquinas. TWEAK (factor de necrosis tumoral como WEAK inductor de apoptosis) desencadena múltiples respuestas celulares que van desde la proliferación hasta la muerte celular, incluyendo el control de la angiogénesis. TWEAK también se ha descrito como un compañero de TNF (factor de necrosis tumoral) que desempeña una función de «Yin y Yang» en la inmunidad. La expresión de ARNm y proteína de TWEAK no muestra variaciones a lo largo del ciclo menstrual. Sin embargo, su nivel basal de expresión influye en el reclutamiento de uNK relacionado con IL-18 y la citotoxicidad local. TWEAK actúa sobre la citotoxicidad de las células uNK, inducida por la sobreexpresión de IL-18, modificando una de las expresiones de los receptores citotóxicos de las células uNK, NKp46, por lo tanto, su actividad contra el embrión. TWEAK aparece como un modulador para evitar la citotoxicidad de uNK endometrial inducida por la sobreexpresión de IL-18. IL-18 y TWEAK como dos proteínas independientes que posiblemente actúan en sinergia para mantener el equilibrio angiogénico/citotóxico relacionado con las células uNK.

La evaluación de la receptividad uterina mediante la determinación del estado endometrial puede, por lo tanto, ser de interés para evaluar a un sujeto femenino para un procedimiento de tecnología de reproducción asistida.

El análisis de 225 sujetos condujo a la siguiente observación:

Un método basado en la evaluación del estado endometrial mediante la determinación del estado de actividad de las células uNK utilizando una relación IL-15/Tweak identifica que aproximadamente el 43% de las mujeres analizadas tienen un estado endometrial normal. Sin embargo, entre dicho 43%, casi el 25% no presentó en realidad un estado endometrial normal.

De manera similar, un método basado en la evaluación del estado endometrial mediante la determinación del estado de maduración de las células uNK utilizando una relación IL-15/Fn14 identifica que aproximadamente el 43% de las

mujeres analizadas tienen un estado endometrial normal. Sin embargo, entre dicho 43%, casi el 75% en realidad no presentó un estado endometrial normal.

5 Además, un método basado en la evaluación del estado endometrial mediante la determinación del estado de reclutamiento de células uNK contando el número de células CD56+ identifica que aproximadamente el 47% de las mujeres analizadas tienen un estado endometrial normal. Sin embargo, entre dicho 47%, el 80% en realidad no presentó un estado endometrial normal.

Luego se desarrolló un sistema experto para evaluar con mayor precisión el estado endometrial de las mujeres (Figura 1).

Luego se puede sugerir una recomendación personalizada según el estado endometrial del sujeto.

10 Dichos procedimientos se han aplicado a 255 sujetos con un historial previo de fracasos de implantes inexplicables después de la IVF/ICSI o abortos espontáneos recurrentes inexplicables por exploraciones genéticas estándar, trombofilia o autoinmunitarias.

15 Para los sujetos en fallas de implantación, el rango promedio de los intentos previos de IVF/ICSI fue de tres intentos sin éxito (rango: 1-8) con una media de 7 embriones transferidos (Rango: 3-25) sin embarazo posterior. La edad media fue de 36 años.

a- Diagnóstico del perfil de receptividad uterina de acuerdo con el método descrito anteriormente

48.5% (124/255) presentaron un endometrio sobreactivado (rechazo del embrión). 35.5% (91/255) presentaron un endometrio subactivado (sin adherencia del embrión). 15.5% (40/255) presentaron un endometrio normal.

b- Optimización del intento de IVF/ICSI mediante la personalización de la preparación uterina.

20 En dicha población con fallas de implantación anteriores, la tasa de embarazo en curso que se espera en el próximo intento de IVF/ICSI es de entre 15 a 20% de las transferencias de embriones. De hecho, en Francia, cuatro intentos (recuperación de ovocitos) están cubiertos por el seguro social.

Pudimos evaluar prospectivamente el resultado de 75 sujetos después de la determinación de su perfil de receptividad uterina y la optimización y personalización de su tratamiento de la fertilización in vitro.

25 El resultado registrado fue:

- La tasa de embarazo a las 5 semanas de amenorrea (visualización del saco gestacional).

- La tasa de embarazo evaluada a las 12 semanas de amenorrea (embarazo en curso con presencia de por lo menos un saco gestacional con actividad cardíaca).

30 La primera transferencia de embriones posterior (fresca o congelada-descongelada) es seguida por la evaluación uterina. Los médicos a cargo aplicaron las recomendaciones para optimizar la receptividad uterina.

Para dicha cohorte de 75 sujetos:

38% (28/75) presentaron un endometrio sobreactivado (tendencia a rechazar el embrión). 42.6% (32/75) presentaron un endometrio subactivado (problema de adhesión del embrión), 20% (15/75) presentaron un endometrio normal.

Se recomendó a los sujetos que presentaban un endometrio sobreactivado que realizaran un intento de IVF:

35 - Sin intervención uterina activa el ciclo anterior,

- Corticoides,

- Alta dosis de progesterona en la fase luteal.

40 Los sujetos que presentaban un endometrio subactivado se trataron con una biopsia endometrial realizada en la fase luteal media del ciclo que precede al intento de IVF, una estimulación ovárica mínima y una adyuvancia de la hormona gonadatrofina coriónica en la fase luteal después de la transferencia embrionaria.

La tasa de embarazo en curso después de la personalización del tratamiento en la primera transferencia de embriones posterior fue:

- En caso de un endometrio sobreactivado:

La tasa de embarazo a las 5 semanas de amenorrea fue del 46% (13/28).

45 La tasa de embarazo en curso a las 12 semanas de amenorrea fue del 39% (11/28).

- En caso de endometrio subactivado:

La tasa de embarazo a las 5 semanas de amenorrea fue del 53% (17/32).

La tasa de embarazo en curso a las 12 semanas de amenorrea fue de 43.7% (14/32).

- En caso de un endometrio normal:

5 La tasa de embarazo a las 5 semanas de amenorrea fue del 26% (4/15).

La tasa de embarazo en curso a las 12 semanas de amenorrea fue del 20% (3/15).

10 Estos resultados sugieren que la determinación de la receptividad uterina para optimizar su estado restituye un potencial óptimo de implantación en sujetos con fallas de implantación previas inexplicables. De hecho, un embarazo en curso alrededor del 40% se considera una buena tasa de embarazo y se espera en sujetos jóvenes en su primer de los segundos intentos de IVF/ICSI.

En el contexto clínico actual (tercer intento, pasado de fracasos de implantación repetidos e inexplicables), la tasa de embarazo esperada fue del 20%, la observada en el grupo con endometrio normal y probablemente asociada con otros problemas relacionados con el ovocito o el espermatozoide.

15 Más aún, la tasa esperada de aborto involuntario fue superior al 25% para los sujetos que presentaban un endometrio subactivado o sobreactivado.

Siguiendo el método descrito anteriormente, la tasa disminuyó a 10% (5/50) en este grupo de alto riesgo, lo que sugiere un control de las desregulaciones locales.

#### Resultados 2

Correlación del perfil de receptividad uterina en dos ciclos.

20 Primero cuantificamos y normalizamos la expresión de ARNm de IL-15, IL-18 entre 39 sujetos y 37 sujetos respectivamente y la expresión de ARNm de TWEAK entre 15 sujetos.

Las cuantificaciones normalizadas de la expresión del ARNm de IL-15, IL-18 y TWEAK se correlacionaron de manera alta y significativa en dos ciclos.

La correlación de rangos para IL-15 fue de 0.59  $p = 0.0001$  (figura 2A).

25 La correlación de rangos para IL-18 fue 0.55  $p = 0.0004$  (figura 2B).

La correlación de rango para TWEAK fue de 0.72  $p = 0.0023$  (figura 2C).

30 Para verificar que las rutas angiogénicas que involucran a IL-18 y su efecto sobre la desestabilización de las arterias espirales fueron las mismas en dos ciclos, cuantificamos también entre diez sujetos la proporción de IL-18/TWEAK así como la expresión normalizada de angiopoyetina-2. La IL-18/TWEAK estuvo altamente correlacionada a lo largo de dos ciclos ( $r=0.77$ ,  $p=0.01$ ), así como la expresión del ARNm de angiopietina-2 ( $r=0.93$ ,  $p=0.0001$ ) y la expresión de Tie-2.

En base a estos resultados, podemos postular que explorar un ciclo es representativo de los trastornos que ocurren en cada ciclo. Los trastornos están relacionados no con el ciclo en sí, sino con el perfil inmunario local del sujeto.

#### Resultados 3

35 En el contexto de la sobreactivación, muchas rutas moleculares e inmunitarias pueden estar implicadas y el resultado es una activación sobreinmunitaria.

La consecuencia directa es que el tratamiento eficiente para controlar la activación sobreinmunitaria tendrá que controlar las rutas específicas involucradas para que sea efectivo.

En este contexto de sobreactivación, los candidatos a fármacos son:

- 40
- Corticoides (por sus efectos antiinflamatorios),
  - Heparinas de dosis baja (para el control del complemento y efectos antitrombóticos),
  - Aspirina de dosis baja (para antiprotaglandina, efecto antitrombótico),
  - Intraalípidos (control de equilibrio Th-1/Th-2).

Como la primera línea de tratamiento son los corticoides en este contexto, evaluamos entre 27 pacientes durante dos ciclos el perfil inmunitario del endometrio molecular antes y después de los corticoides.

La respuesta al tratamiento se definió mediante una normalización de la relación IL-18/Tweak, IL-15/Fn-14 bajo corticoides o se definió por un embarazo evolutivo si no se realizó una exploración bajo corticoides.

5 Observamos en pacientes con activación endometrial sobreinmunitaria una respuesta efectiva a los corticoides en 15/27 (55%).

Todos los pacientes con respuesta a los corticoides tuvieron una expresión del Receptor de G-CSF por debajo del umbral de 0.7, mientras que todos los pacientes sin respuesta tuvieron una expresión del receptor de G-CSF por encima de 0.7 ( $p > 0.0001$ ) (Figura 3).

10 Resultados 4

Para optimizar la potencialidad de la implantación de pacientes con antecedentes de fallas de implantación repetidas e inexplicables después de la IVF-ET (RIF) de acuerdo con su perfil de endometrio inmunitario, se realizó un estudio observacional prospectivo de cohorte de 299 pacientes con RIF. Se realiza un chequeo uterino inmune previo a la concepción, seguido de recomendaciones de estrategias personalizadas en caso de una activación deficiente o endometrial. El resultado es la tasa de embarazo que se produce después de la primera transferencia de embriones frescos o descongelados después de la evaluación.

15

La biopsia endometrial se realiza en la fase luteal de un ciclo no conceptual con una Pipelle de Cornier®. Sobre cada muestra, después de la datación histológica, cuantificamos la movilización de las células asesinas naturales uterinas (uNK) (inmunotinción de CD56<sup>+</sup>), la expresión del ARNm endometrial de IL-15 (que refleja el estado de maduración de uNK), de IL-18 (que refleja el entorno de citoquinas Th-1/Th-2) y de TWEAK/Fn-14 (que refleja la inmunorregulación local relacionada con TNF) mediante PCR en tiempo real.

20

El diagnóstico final que define el mecanismo que genera fallas de implantación repetidas fue una deducción paso a paso que tuvo en cuenta, en primer lugar, el entorno inmunitario de las citoquinas (IL-18/TWEAK) y en un segundo lugar la movilización y madurez de las células uNK.

25 - Una baja expresión de ARNm de IL-18/TWEAK con o sin baja expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 y/o una baja movilización de células uNK define un estado inmunitario pobre de activación y un mecanismo putativo de RIF por adhesión insuficiente.

30 - Una expresión de ARNm normal de IL-18/TWEAK con baja expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 y/o una baja movilización de células uNK define un estado inmunitario pobre de activación y un mecanismo putativo de RIF por adhesión insuficiente.

- Una alta expresión de IL-18/TWEAK solo define un estado inmunitario sobreactivado.

- Una expresión normal de IL-18/TWEAK con alta expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 y/o alta movilización de células uNK define un estado de activación sobreinmunitario y un mecanismo putativo de RIF por rechazo del embrión.

35 En caso de una activación deficiente, las recomendaciones fueron realizar una lesión local en el ciclo anterior al intento, aplicar una estimulación ovárica mínima, complementar la fase luteal con gonadotropina coriónica humana y tener relaciones sexuales. En el caso opuesto de una activación excesiva, las recomendaciones no fueron lesiones locales en el ciclo anterior, 20 mg de prednisolona y vitamina E desde el día -1 del ciclo de la IVF, dosis altas de progesterona (1200 mg por vía vaginal) con estrógenos en la fase luteal y ausencia de coito.

40 La edad media de la cohorte (37 años) se tuvo en cuenta con el rango medio del intento anterior (media de 3 intentos), la cantidad media de embriones transferidos previamente (más de 6 embriones) que la tasa de embarazo en curso esperada sin cambiar la estrategia en el próximo intento se espera que sea alrededor del 20%.

Tabla 1 - Resultados preliminares en los primeros 299 resultados

Chequeo uterino inmunitario	Activación local pobre	Sobreactivación local	Activación local norma;
Número de pacientes RIF	74	155	62
Tasa de embarazo después del tratamiento de pacientes que tienen una activación deficiente o por encima de la local	56.7% (42/74)	49% (76/155)	28% (17/62)
Tasa de embarazo en curso después del tratamiento de pacientes con una activación deficiente o local.	52.7% (39/74)	42% (65/155)	21% (13/62) **

Conclusión: En 299 pacientes que experimentaron fallas de implantación repetidas previamente, la evaluación inmunitaria previa a la concepción (método de la invención) documentó desregulaciones uterinas inmunes en el 77% de los pacientes. En el grupo en el que se observó una desregulación inmune endometrial, la optimización de la receptividad uterina de acuerdo con su perfil endometrial inmunitario (mediante tratamientos específicos) mejoró significativamente la tasa de embarazos posteriores (véase Tabla 1). La tasa de embarazo en curso esperada fue de alrededor del 20%. Luego, observamos un aumento relativo de más del 100% entre la tasa de embarazo en curso observada y la esperada cuando los pacientes se clasificaron como con deficiencia o sobreactivación local del endometrio y luego se los trató de acuerdo con lo anterior.

Resultados 5

10 Para determinar si es necesario un orden entre los parámetros evaluados para definir el mecanismo de la falla de la implantación, se seleccionó a los pacientes con embarazos exitosos después de la personalización de su IVF en función de su perfil citocínico endometrial. El orden de decisión aplicado fue primero considerar el entorno inmune de las citoquinas IL-18/TWEAK, luego el reclutamiento y la madurez de las células uNK: recuento de células IL-15/Fn-14 y CD56.

15 Luego seleccionamos a pacientes con expresión alta de IL-18/TWEAK (estado sobreactivado) que se evaluaron bajo corticoides como primera línea de tratamiento con expresión basal alta o baja de IL-15/Fn-14. Nuestro objetivo fue analizar la variación posterior de IL-15/Fn-14 en tratamiento.

20 Mientras que, se observa una disminución significativa cuando la expresión basal de IL-15/Fn-14 es alta o normal (>3) (Figura 4A). En las 10 muestras con expresión basal baja de IL-15/Fn-14 (Figura 4B), se observa una normalización de la relación de IL-15/Fn-14 en 5 casos y se observó una respuesta paradójica con como consecuencia una hiperexpresión en dos casos. Esto podría ser consecutivo a la acción de los corticoides sobre la transcripción de IL-15 en sí. De hecho, un elemento de liberación de corticoides está presente en la secuencia de IL-15. Por lo tanto, en estos casos de baja expresión del ARNm de IL-15 en un entorno citotóxico, la estimulación de la CRE por parte de los corticoides interrumpe la regulación local. La expresión IL-18/TWEAK debe considerarse primero para personalizar el tratamiento posterior. Por lo tanto, la expresión de IL-15/Fn-14 debe considerarse en la segunda etapa si IL-18/TWEAK es normal.

25 Más aún, se analizaron retrospectivamente 109 casos de embarazos exitosos, la expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 con la movilización de CD56 se determinó en un primer paso seguido de IL-18/TWEAK. En 12 casos más de 109, la expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 fue baja (correspondiente a un estado uNK inmaduro), mientras que la IL-18/TWEAK fue alta, lo que sugiere un exceso de citoquinas Th-1 en el entorno endometrial. Si la IL-15/Fn-14 hubiera sido considerada de primera mano, habría conducido al diagnóstico y personalización opuestos.

30 En 4 casos más de 109, la expresión de ARNm de IL-15/Fn-14 fue alta (lo que sugiere un estado de uNK hiperactivo), mientras que la IL-18/TWEAK fue baja, lo que sugiere lo contrario: un agotamiento de las citoquinas Th-2 en el entorno endometrial. Si IL-15/Fn-14 hubiera sido considerado primero, habríamos deducido el diagnóstico opuesto.

35 En total, habríamos deducido un estado endometrial incorrecto y un tratamiento incorrecto en el 14% de los casos. La IL-18/TWEAK que refleja el entorno inmunitario de las citoquinas del endometrio general y el entorno de las citocinas de todas las células inmunitarias (incluidas las células T reguladoras y dendríticas) debe considerarse antes del reclutamiento y la madurez de las células uNK (ver Figura 1).

40 LISTA DE SECUENCIAS

<110> MATRICELAB INNOVE LEDÉE, Nathalie

<120> MÉTODO PARA AUMENTAR EL ÉXITO DE IMPLANTACIÓN EN FERTILIZACIÓN ASISTIDA

<130> CV - 222/PCT

<160> 14

45 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

50 <220>

# ES 2 740 548 T3

<221> fuente  
<222> 1..24  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="Tweak-S"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 1  
5 tgcacctaaa ggccggaaaa cacg 24  
<210> 2  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales  
10 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..24  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="Tweak-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 2  
15 cagcgcaggg ccagcacacc atcc 24  
<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales  
20 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..20  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="IL-18-S"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 3  
25 ataaagatgg ctgctgaacc 20  
<210> 4  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales  
30 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..20  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="IL-18-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 4  
35 tcaaatagag gccgatttcc 20  
<210> 5  
<211> 25

<212> ADN  
 <213> secuencias artificiales  
 <220>  
 <221> fuente  
 5 <222> 1..25  
 <223>/mol\_tipo="ADN"/nota="b2M-S"/organismo="secuencias artificiales"  
 <400> 5  
 tgctgtctcc atgtttgatg tatct 25  
 <210> 6  
 10 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencias artificiales  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <222> 1..22  
 <223>/mol\_tipo="ADN"/nota="b2M-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
 <400> 6  
 tctctgtctcc ccacctctaa gt 22  
 <210> 7  
 20 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> secuencias artificiales  
 <220>  
 <221> fuente  
 25 <222> 1..23  
 <223>/mol\_tipo="ADN"/nota="RPL13A-S"/organismo="secuencias artificiales"  
 <400> 7  
 cctggaggag aagaggaaag aga 23  
 <210> 8  
 30 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencias artificiales  
 <220>  
 <221> fuente  
 35 <222> 1..25  
 <223>/mol\_tipo="ADN"/nota="RPL13A-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
 <400> 8

ES 2 740 548 T3

ttgaggacct ctgtgtattt gtcaa            25  
<210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> secuencias artificiales  
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..20  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="FnI4-S"/organismo="secuencias artificiales"  
10 <400> 9  
tttctggctt tttggtctgg            20  
<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> secuencias artificiales  
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..20  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="FnI4-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
20 <400> 10  
ggcacattgt cactggatca            20  
<210> 11  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> secuencias artificiales  
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..21  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="IL-15-S"/organismo="secuencias artificiales"  
30 <400> 11  
ctagagccaa ctgggtgaat g            21  
<210> 12  
<211> 21  
<212> ADN  
35 <213> secuencias artificiales  
<220>  
<221> fuente

# ES 2 740 548 T3

<222> 1..21  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="IL-15-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 12  
catctccgga ctcaagtgaa a 21  
5 <210> 13  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales  
<220>  
10 <221> fuente  
<222> 1..21  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="G-CSFR-S"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 13  
gtccaagatc acaaagctgg t 21  
15 <210> 14  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales  
<220>  
20 <221> fuente  
<222> 1..19  
<223>/mol\_tipo="ADN"/nota="G-CSFR-AS"/organismo="secuencias artificiales"  
<400> 14  
ccgcactcct ccagacttc 19  
25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar en un sujeto femenino el perfil de receptividad uterina durante la ventana de implantación uterina, que comprende:

determinar sobre una muestra de endometrio el estado endometrial al medir:

5 - en una primera etapa, el estado de actividad de las células uterinas NK (uNK), en el que dicho estado de actividad de las células uNK se determina al medir la expresión de IL-18 y Tweak, calcular un valor de la relación IL-18/Tweak y comparar dicho valor con un valor de referencia; y

10 - en una segunda etapa, el reclutamiento y estado de maduración de las células uNK, en el que dicho reclutamiento de células uNK se determina al cuantificar el número de células CD56+ uNK y/o medir la expresión de CD56 y comparar dichos valores con los valores de referencia, y en la que dicho estado de mutación de células uNK se determina al medir la expresión de IL-15 y Fn14, calcular un valor de la relación IL-15/Fn14 y comparar dicho valor con un valor de referencia;

de este modo determinar un estado endometrial que es indicador de un perfil de receptividad uterina apropiado o inapropiado.

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los valores de referencia se obtienen a partir de un sujeto femenino fértil.

3. Un método para aumentar la tasa de éxito de un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (ART) en un sujeto femenino, que comprende:

20 - determinar el perfil de receptividad uterina de dicho sujeto durante la ventana de implantación uterina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2; y

- determinar una recomendación personalizada para dicho sujeto dependiendo del perfil de receptividad uterina determinado en la etapa previa, en la que el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad que corresponde a un estado endometrial subactivado o es inapropiado debido a una receptividad anormal que corresponde un estado endometrial sobreactivado.

25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que cuando el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una ausencia de receptividad que corresponde a un estado endometrial subactivado, por lo menos se aplica una de los siguientes: una estimulación mecánica del endometrio en la fase luteal que precede al ciclo de fertilización in vitro (IVF); una reducción del nivel de la estimulación de hormona; o una administración de hormona gonadotropina coriónica humana durante la ventana de implantación.

30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que cuando el perfil de receptividad uterina es inapropiado debido a una receptividad anormal que corresponde un estado endometrial sobreactivado, por lo menos se aplica una de los siguientes: un alto nivel de estimulación ovárica; alta dosis de progesterona después de la recuperación de ovocitos; fármacos dirigidas a controlar el entorno local proinflamatorio desde el inicio de la estimulación tal como, por ejemplo, corticosteroides, una combinación de baja dosis de ácido acetilsalicílico con heparinas de bajo peso o intralípidos; o una cantidad terapéuticamente efectiva de agente oxidante.

35 6. Un método para evaluar un sujeto femenino para un procedimiento de tecnología de reproducción asistida (ART), que comprende:

- obtener elementos de información del sujeto femenino para proporcionar un perfil para dicho sujeto femenino;

40 en el que dichos elementos de información son proporcionados por el sujeto femenino con base en un cuestionario o solicitado, transcrito, o registrado de otro modo por un profesional de la salud;

en el que dichos elementos de información comprenden datación histológica, características del endometrio, edad, etiología de la infertilidad, datos de infertilidad, evaluación hormonal de reserva ovárica y tipo de ART; y

en el que uno de dichos elementos de información es el perfil de receptividad uterina como se define en la reivindicación 1 o 2;

45 - comparar dicho perfil para dicho sujeto femenino con una biblioteca patrones de perfiles conocidos por ser indicativo de capacidad de respuesta a un procedimiento de tecnología de reproducción asistida utilizando un algoritmo basado en dichos elementos de información;

- en el que dicha comparación proporciona una evaluación de dicho sujeto femenino para un procedimiento de ART.

7. Un kit que comprende:

## ES 2 740 548 T3

- reactivos para medir la expresión de IL-18, IL-15 y CD56, dichos reactivos son específicos para IL-18, IL-15 y CD56, respectivamente;
  - reactivos para medir la expresión de Tweak y Fn14, dichos reactivos son específicos para Tweak y Fn14, respectivamente;
- 5
- reactivos para medir la expresión de GCSF-R, dichos reactivos son específicos para GCSF-R;
  - opcionalmente, reactivos para medir la expresión de los genes de referencia, dichos reactivos son específicos para dichos genes de referencia.

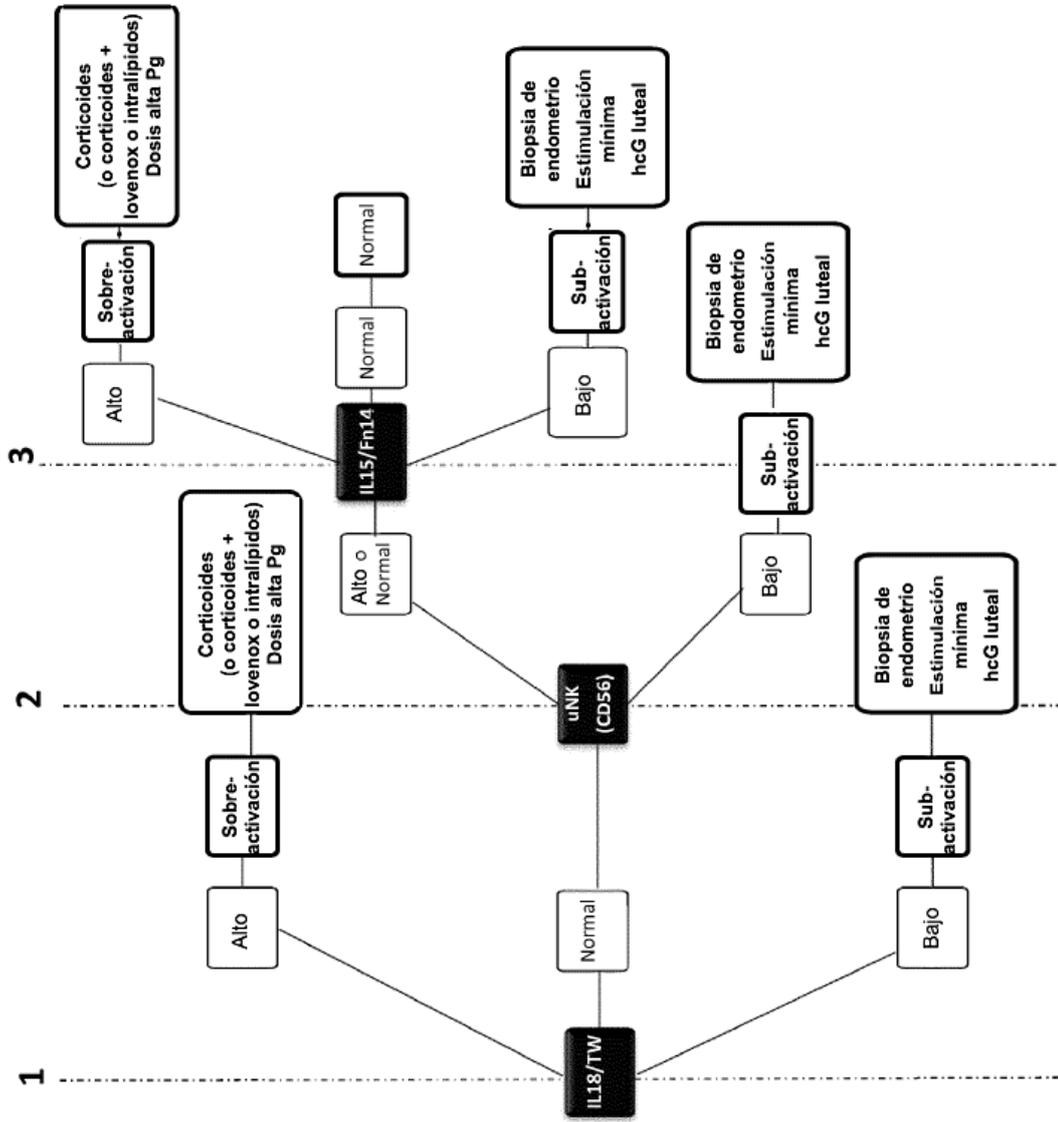
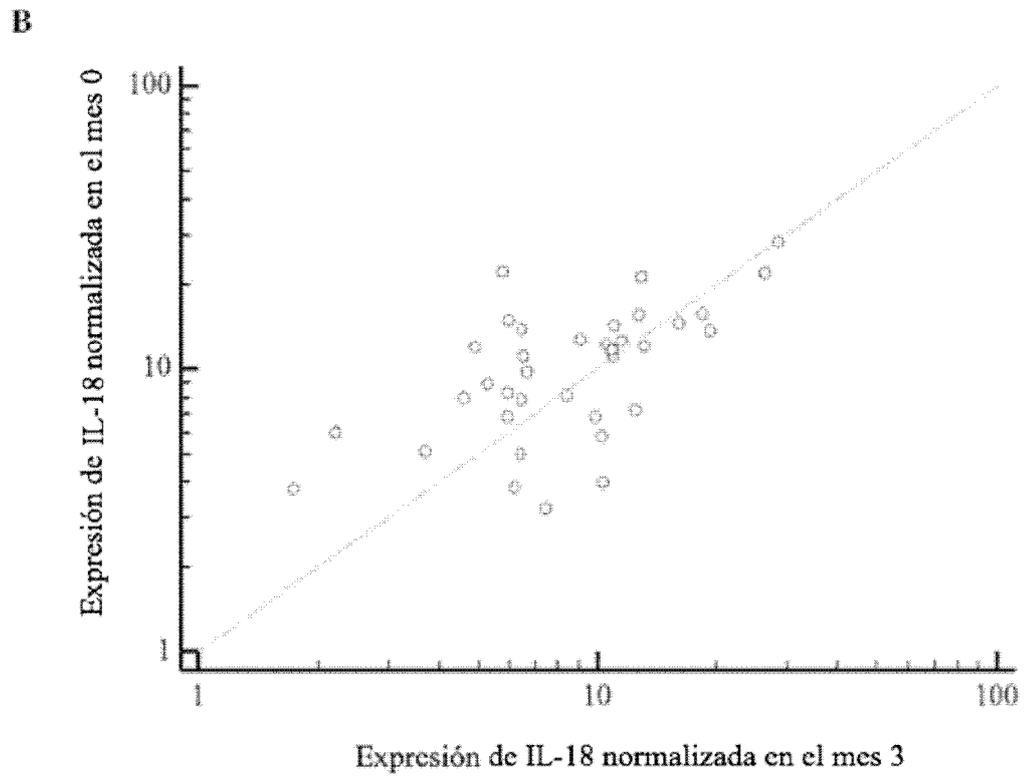
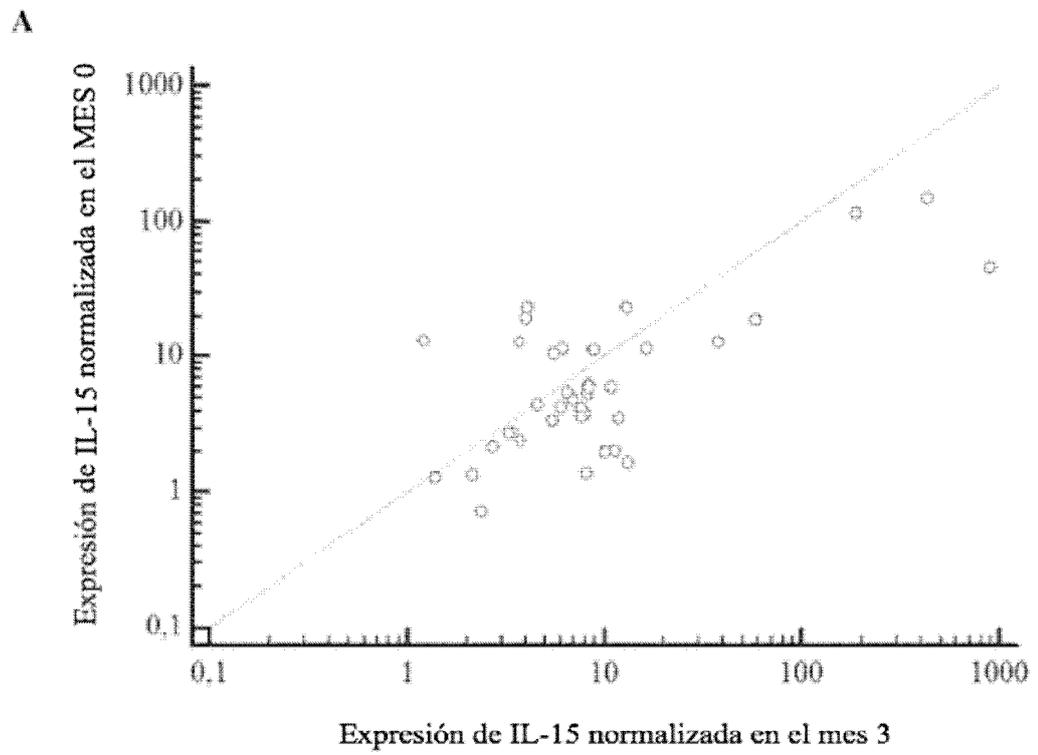


FIG. 1



**FIG. 2**

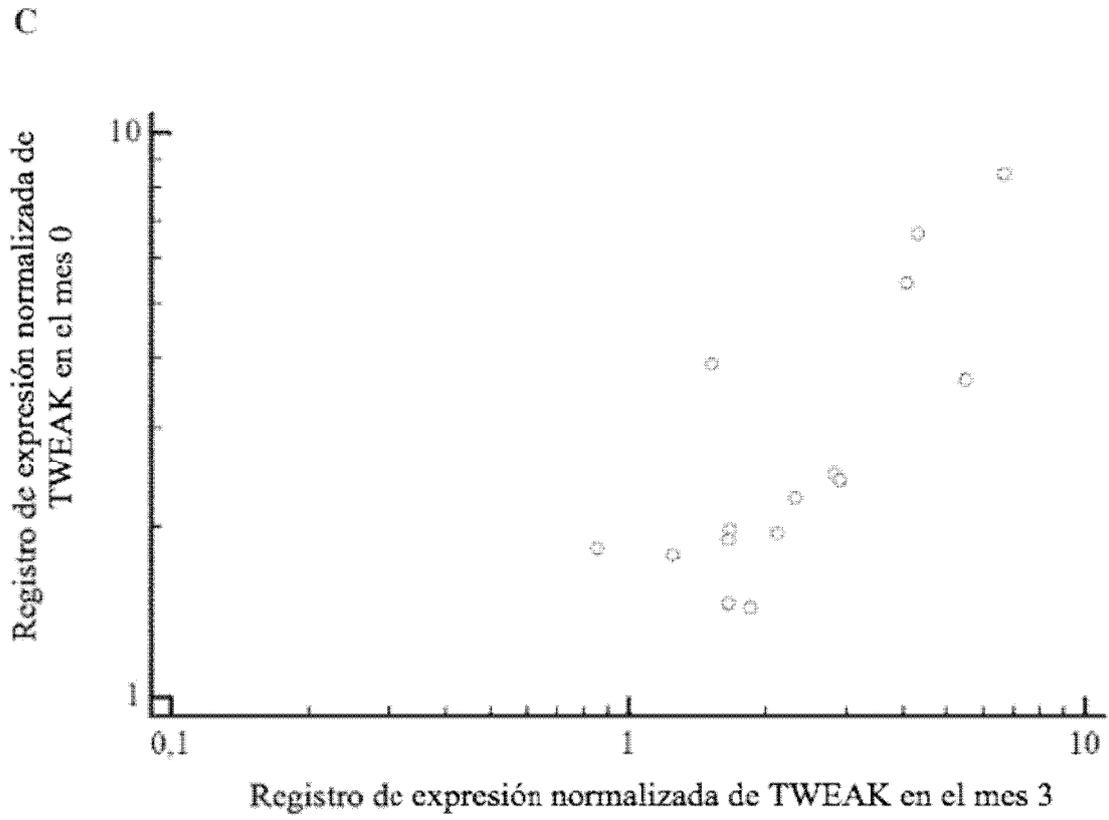


FIG. 2 (cont.)

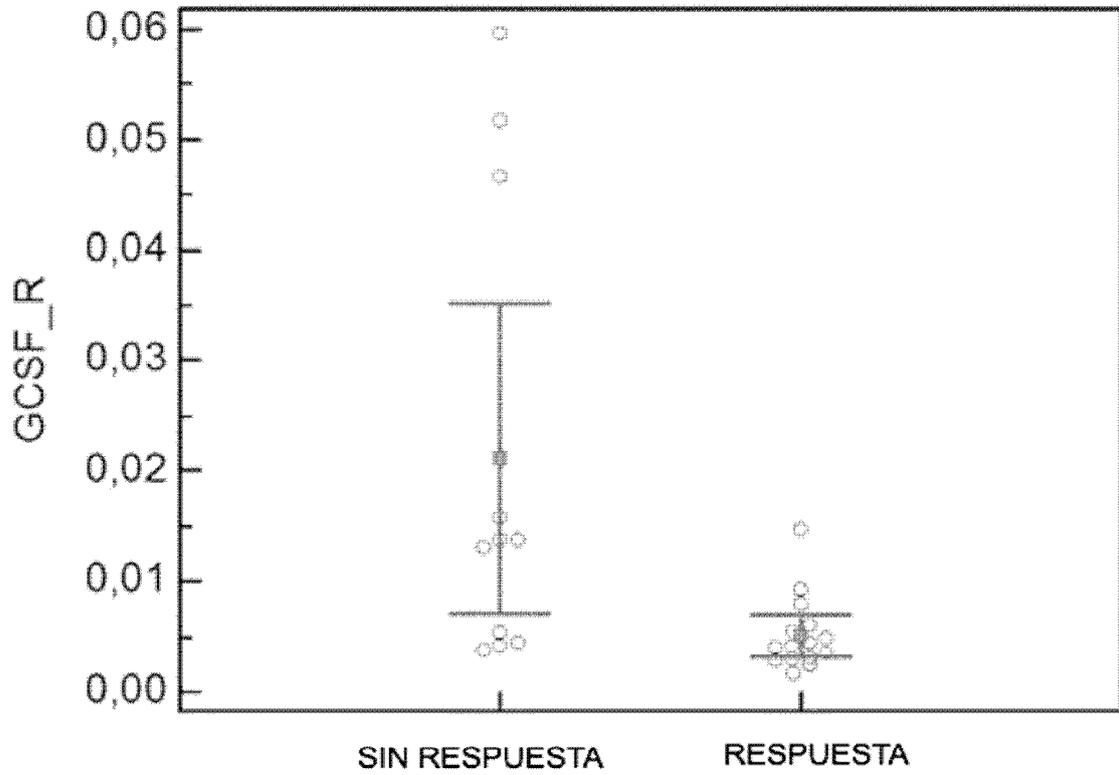
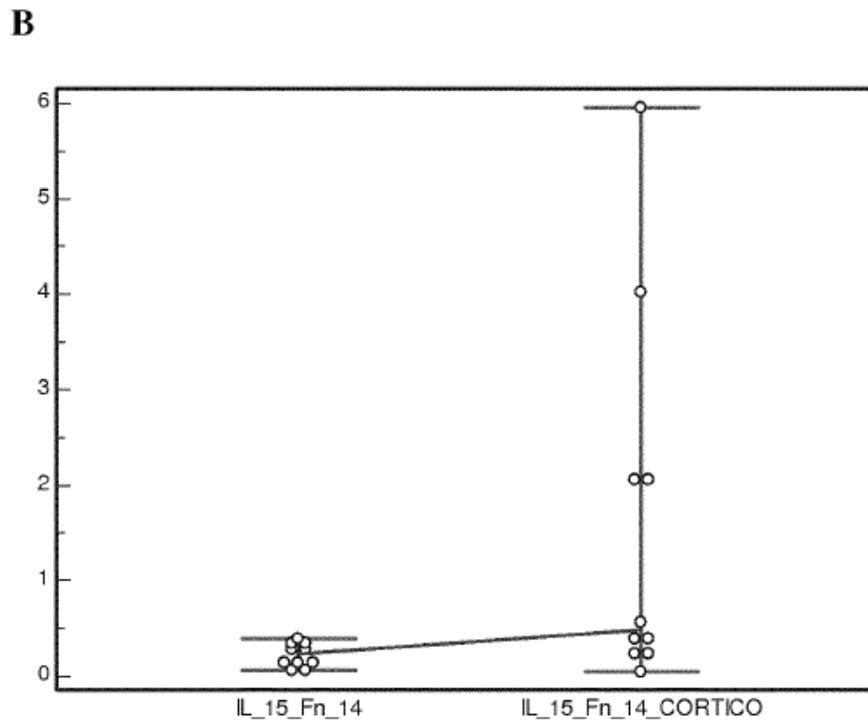
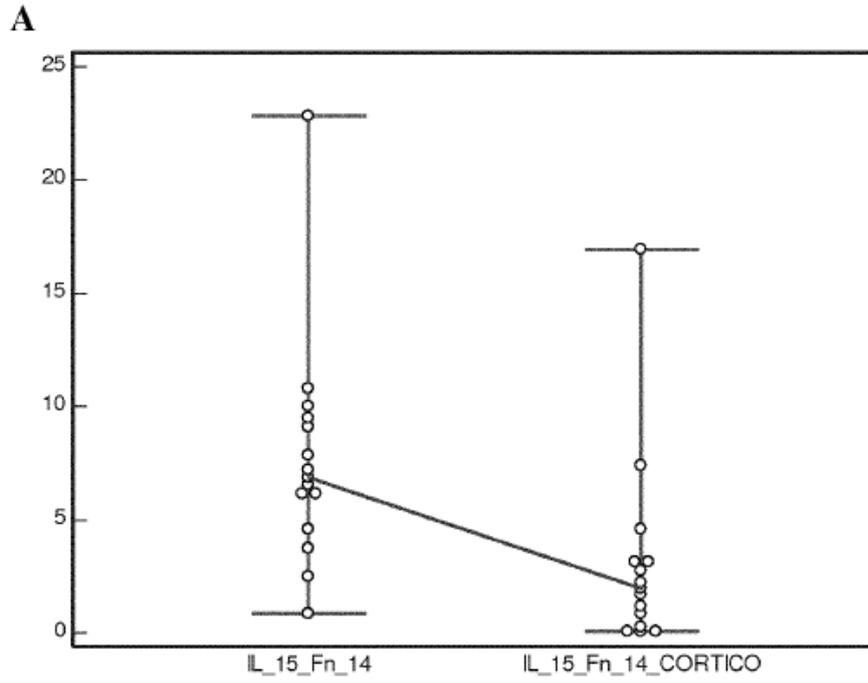


FIG. 3



**FIG. 4**