



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012018289-7 A2



* B R 1 1 2 0 1 2 0 1 8 2 8 9 A 2 *

(22) Data do Depósito: 21/01/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 20/04/2021

(54) Título: MÉTODO PARA DETECTAR RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL EM IMPLANTE DE EMBRIÃO EM UM MAMÍFERO FÊMEA, MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO CAPAZ DE INTENSIFICAR A RECEPTIVIDADE DO ENDOMÉTRIO, E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE CONTRACEPTIVO

(51) Int. Cl.: G01N 33/92; G01N 33/50.

(30) Prioridade Unionista: 21/01/2010 EP 10 382011.4.

(71) Depositante(es): EQUIPO IVI INVESTIGACIÓN S.L..

(72) Inventor(es): ANTONIO PELLICER MARTÍNEZ; CARLOS SIMÓN VALLÉS; ÓSCAR BERLANGA ATIENZA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2011050867 de 21/01/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/089240 de 28/07/2011

(85) Data da Fase Nacional: 23/07/2012

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETECTAR RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL EM IMPLANTE DE EMBRIÃO EM UM MAMÍFERO FÊMEA, MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO CAPAZ DE INTENSIFICAR A RECEPTIVIDADE DO ENDOMÉTRIO, E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE CONTRACEPTIVO. A presente invenção refere-se a um método de diagnóstico não invasivo de receptividade endometrial que inclui coletar e comparar padrões de biomarcador de lipídeo a biomarcadores lipidômicos de referência, particularmente prostaglandinas PGE2 e/ou PGF2(alfa). O método é especialmente aplicável para determinar estado de fertilidade de um mamífero fêmea, preferivelmente, uma mulher.

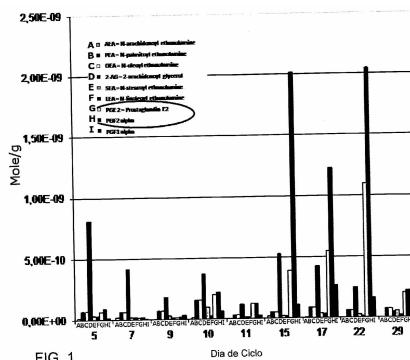


FIG. 1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA DETECTAR RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL EM IMPLANTE DE EMBRIÃO EM UM MAMÍFERO FÊMEA, MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO CAPAZ DE INTENSIFICAR A RECEPTIVIDADE DO ENDOMÉTRIO, E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE CONTRACEPTIVO".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método não invasivo para a detecção de receptividade endometrial à implante de embrião. O método é especialmente aplicável para determinar estado de fertilidade de um mamífero fêmea, preferivelmente, uma mulher. A invenção adicionalmente se refere a um kit para realização de referido método.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma estimativa de 12% de casais que tentam conceber que sofrem de infertilidade, e devido a idade avançada da gravidez, esta figura está em elevação. A fertilização *in vitro* (IVF) tem sido usada ainda mais para auxiliar os casais inférteis em tornarem-se grávidos. Desde que o primeiro tratamento de IVF bem sucedido em 1978 que conduziu ao nascimento de Louise Brown, muitas técnicas e avanços técnicos têm contribuído para aperfeiçoar as eficiências; nos dias de hoje, cerca de 70% das mulheres que suportam tratamento de IVF têm resultados bem sucedidos. Ainda alguns 50% dos pacientes não se tornam grávidas, ou têm perdas de gravidez precoce, que clamam por esforços adicionais entre a comunidade científica para continuar a pesquisa no campo.

IVF geralmente é um processo de etapa múltipla que envolve recuperação de óvulos maduros a partir do paciente fêmea ou doadora; incubação de óvulos no meio de cultura artificial; coleta de esperma do paciente ou doador, e preparação subsequente; fertilização do óvulo pelo esperma; monitoramento e seleção de embriões de boa qualidade; e transferência destes para a cavidade uterina. O embrião deve se implantar no endométrio receptivo de modo que a gravidez possa progredir. É bem estabelecido que esta etapa particular é responsável por uma percentagem significante das

falhas, e, portanto, é clinicamente relevante para encontrar possíveis causas e soluções do problema.

O implante dos embriões transferidos envolve uma sintonia sincronizada entre um endométrio receptivo e um blastocisto funcional [Wang,

- 5 H., e Dey, SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Review Genetics*. 7:185-199]. Este fenômeno pode somente ocorrer durante a janela de implante, um período autolimitado de receptividade endometrial estendendo-se entre dias 19 e 23 do ciclo menstrual (mulheres). Nos ciclos menstruais normais, isto é alcançado através dos efeitos
 10 locais de estrogênios ovarianos e progesterona, que induzem uma série de eventos celulares e moleculares no endométrio, conduzindo a receptividade endometrial apropriada. A última é avaliada usando-se o critério Noyes para classificação endometrial, que foi proposto há 50 anos atrás [Noyes, RW., Hertig, AJ., e Rock, J. 1950. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*. 1:3-
 15 25], mas é ainda o método preferido usado hoje para medir a receptividade endometrial. Hoje, à luz de 15 anos de experiência com IVF com doador de óvulo, é aceito que a avaliação histológica acrescenta pouca informação clínicamente significante, e deve ser substituída por avaliação funcional de receptividade endometrial.

20 A era de biologia molecular e celular, e o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, têm auxiliado a requisição de prognosticadores mais consistentes de um endométrio receptivo. Sob indução com hormônios esteróides, um grande número de mediadores estruturais e moleculares foi

25 identificado até aqui, que produzem biomarcadores potenciais de receptividade endometrial, incluindo a presença de pinopodes na superfície de células endometriais, moléculas de adesão, tais como integrins, citoquinas, fatores de crescimento, lipídeos, e outros [Nikas, G., and Aghajanova. 2002. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online* 4 Suppl. 3:18-23; Lessey, BA. 2003. Two pathways of

30 progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*. 68:809-815; Robb L, Dimitriadis E, Li R, Salamonsen LA., 2002. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines

with key roles in implantation. *J Reprod Immunol.* 57: 129-141]. Por ilustração, uma produção de duas prostaglandinas (PGs), a saber, prostaglandina E2 (PGE2) e prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), aumenta no endométrio humano na fase luteal branda onde a janela de implante está situada [Hoozemans DA et al. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004, 9(6):692-715].

Além disso, a análise genética e proteômica têm acrescentado novas ferramentas excitantes para a avaliação de receptividade endometrial, 10 e amostras de biópsia endometrial podem ser usadas para identificar moléculas associadas com receptividade uterina para obter uma melhor penetração em implantação humana. Estas abordagens, contudo, não se tornaram ainda resultados aplicáveis à prática diária clínica de IVF, visto que nenhum fator específico simples foi identificado para ser crucial para implantação em 15 humanos [Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., et al. 2006. The human endometrium as a fertility-determinant factor. *Human Reproduction Update*. 12:617-630]. Além disso, um maior revés na aplicação de técnicas dependentes de biópsia ocorre em sua natureza invasiva, e também na necessidade de biópsias endometriais apropriadamente reguladas que rompem o 20 ponto terminal necessário de implantação [van der Gaast, MH., Beier-Hellwig, K., Fauser, BC., et al. 2003. A aspiração de secreção endometrial antes da transferência de embrião não reduz as taxas de implantação. *Reprod Biomed Online*. 7:105-109].

A análise de secreções endometriais é uma nova possibilidade 25 não desreditada para a investigação de receptividade endometrial. Importantemente, a aspiração de fluido endometrial não afeta as taxas de prenhes [van der Gaast et al., 2003, citado *supra*]. Esta abordagem proporciona leituras seguras de proteínas individuais que se correlacionam com o dia de ciclo, e tem se comprovado eficiente em séries de proteínas usando um sistema luminex [Boomsma, CM., Kavelaars, A., Eijkemans, MJC., et al. 2009. Cytokine profiling in endometrial secretions: a non invasive window on receptividade endometrial. *Reprod Biomed Online*. 18:85-94], abrindo, desse mo-

do, o campo para uma aplicação não invasiva.

Embora alguns marcadores bioquímicos tenham sido revelados pela avaliação da receptividade endometrial [Giudice, L.C. 1999. *Hum Reprod* 14 Suppl 2:3-16; Achache, H et al.; *Human Reproduction Update*, 2006; 5 12:731-46, Thomas, K et al.; *Fertil. Steril.* 2003; 80:502-507; WO03062832], existe uma necessidade na técnica de biomarcadores moleculares específicos e seguros para a detecção de receptividade endometrial a implante de embrião em mulheres, que podem ser usados em clínicas.

Os metabolômicos são uma disciplina dedicada ao estudo sistêmico de moléculas pequenas (isto é, metabólitos) em células, tecidos e biofluidos. Os metabólitos são os produtos finais de processos regulatórios celulares, e seus níveis podem estar relacionados a resposta amplificada de sistemas biológicos à mudanças genéticas ou ambientais. Os médicos têm confiado por décadas em uma pequena parte da informação contida no metaboloma, por exemplo, medindo a glicose para monitorar diabetes, e medindo o colesterol para saúde cardiovascular. Novas plataformas analíticas metabolômicas sofisticadas e ferramentas de informática já foram desenvolvidas, que proporcionam medição estendida e sensível do metaboloma.

Os lipídios são conhecidos por desempenharem um papel importante como componentes estruturais (por exemplo, membranas de célula), componentes de armazenagem de energia, e como moléculas de sinalização. Os lipídios são amplamente definidos como moléculas pequenas hidrofóbicas ou anfipáticas que podem se originar totalmente, ou em parte, por condensação à base de carbânion de tioésteres, e/ou por condensação à 20 base de carbocátion de unidades de isopreno. "Lipídômicos" podem ser considerados como um subcampo de metabolômicos que objetivam elucidar os processos biológicos no contexto de lipídios por medição e caracterização dos perfis de lipídio estendidos no nível molecular (perfis lipodômicos). As medições de lipídio clínicas tradicionais quantificam as quantidades totais de 25 triglicerídeos, colesterol, ou lipoproteínas. Contudo, o perfil de lipídio de soro é mais complexo no nível molecular. As plataformas lipodômicas atuais capacitam a caracterização quantitativa de centenas de espécies moleculares 30

de lipídio diversas através de classes de lipídio múltiplas, tais como esfingolipídios, fosfolipídios, esterol ésteres, acilgliceróis, esteróis, ácidos de bile, ácidos graxos, eicosanóides, prostaglandinas, e esteróides [Seppänen-Laakso, T and Orešič, M. 2009. How to study lipidomes. *J Molec Endocr.* 42: 185-190].

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 A invenção é baseada na descoberta que, surpreendentemente, o nível de uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), e combinações destas, em uma amostra de fluido endometrial de uma mulher, está correlacionado com receptividade endometrial a implante de embrião. Desse modo, referidas prostaglandinas, PGE2 e/ou PGF2 α , quando determinadas em uma amostra de fluido endometrial, podem ser usadas como biomarcadores de receptividade endometrial para implantar um embrião.

15 Em um aspecto, a invenção se refere ao uso de uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), e combinações destas, quando referida prostaglandina é determinada em uma amostra de fluido endometrial, como um biomarcador de receptividade endometrial para implantar um 20 embrião.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para detectar receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea, referido método compreendendo as etapas de:

25 a) determinar o nível de uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), e combinações destas, em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea; e

30 b) correlacionar o nível de referida prostaglandina na referida amostra de fluido endometrial com receptividade endometrial a implante de embrião.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para selecionar a janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea, que

compreende determinar o nível de PGE2 e/ou o nível de PGF2 α , em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, no qual referida janela de implante é selecionada quando o nível de pelo menos uma de referidas prostaglandinas PGE2 ou PGF2 α na referida amostra é aumentado em 5 relação a uma amostra de referência.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para avaliar o estado de fertilidade de um mamífero fêmea baseado no nível de PGE2 e/ou PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e sua correlação com o estado de fertilidade de referido mamífero 10 fêmea.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, baseado no nível de PGE2 e/ou PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e sua correlação 15 com as condições para receber e implantar um embrião. Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher submetida a um processo (IVF) de fertilização *in vitro*.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea baseado no 20 nível de PGE2 e/ou PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e sua correlação com maturação endometrial.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método de fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea baseado no nível de PGE2 e/ou PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e sua 25 correlação com maturação endometrial, no qual um embrião é introduzido no útero de referido mamífero fêmea quando referido endométrio é maturo.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um kit compreendendo um lipídeo de referência para PGE2 e/ou para PGF2 α . O uso de referido kit para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião em um 30 mamífero fêmea, ou para seleção da janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea, ou para avaliação do estado de fertilidade de um mamífero fêmea, ou para avaliação se um mamífero fêmea está sob condições

adequadas para receber e implantar um embrião, ou para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea, ou em um método de fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea, constitui um aspecto adicional desta invenção.

5 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para identificar um composto capaz de intensificar a receptividade do endométrio.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para identificar um agente contraceptivo.

10 Em outro aspecto, a invenção se refere a uma composição de lipídeo, no qual referida composição de lipídeo é obtida de uma amostra de fluido endometrial de um mamífero fêmea durante a janela de implante de um embrião na referido mamífero fêmea. O uso de referida composição de lipídeo para determinar receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea constitui um aspecto adicional desta invenção.

15 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para selecionar a janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea compreendendo as etapas:

a) proporcionar uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea;

20 b) coletar um perfil lipodômico de referida amostra; e

c) correlacionar referido perfil lipodômico coletado com estado de fertilidade de um mamífero fêmea.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra os níveis de lipídios diferentes de amostras de fluido endometrial de mulheres, durante seu ciclo menstrual natural; os lipídios foram identificados por cromatografia líquida combinada com espectrometria de massa em tandem [A: N-araquidonoila etanolamina (AEA); B: N-palmitoila etanolamina (PEA); C: N-oleoila etanolamina (OEA); D: 2-araquidonoila glicerol (2-AG); E: N-estearoila etanolamina (SEA); F: N-linoleoila etanolamina (LEA); G: prostaglandina E2 (PGE2); H: prostaglandina F2 alfa (PGF2 α); I: prostaglandina F1 alfa (PGF1 α)].

A figura 2 mostra os níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e pros-

taglandina F2 alfa (PGF2 α) em amostras de fluido endometrial de mulheres obtidas através de todo o ciclo menstrual [Grupo I (dias 0-8); Grupo II (dias 9-14); Grupo III (dias 15-18); Grupo IV (dias 19-23) e Grupo V (dias 24-30)].

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Um objetivo da presente invenção é proporcionar um biomarcador específico e seguro para a detecção de receptividade endometrial para implantar um embrião em uma mulher. O biomarcador pode ser usado, por exemplo, para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea, ou para seleção da janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea, ou para avaliação do estado de fertilidade de um mamífero fêmea, ou para avaliação se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, ou para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea, ou em um método de fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea. Em uma concretização 10 particular, referido mamífero fêmea é uma mulher. Em uma concretização 15 adicionalmente particular, referida mulher é a mulher submetida a um processo (IVF) de fertilização *in vitro*.

Os inventores agora surpreendentemente verificaram que alguns compostos de lipídio podem ser usados como biomarcadores para receptividade endometrial para implantar um embrião. Em particular, os inventores analisaram os níveis de alguns lipídios em amostras de fluido endometrial entre os dias 19 a 21 do ciclo menstrual de uma mulher, coincidente com a janela de implante. Desse modo, é agora possível identificar a janela de implante em um mamífero fêmea por determinar o perfil de lipídio em amostras 20 de fluido endometrial ao longo do ciclo menstrual. O método é baseado na comparação do perfil de lipídio estabelecido de um mamífero fêmea a biomarcadores lipidômicos de referência. Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher.

Em uma concretização particular, os inventores observaram que 30 a concentração de dois lipídios específicos, a saber, prostaglandinas PGE2 e PGF2 α , é显著mente aumentada nas amostras de fluido endometrial entre os dias 19 a 21 do ciclo menstrual de uma mulher, coincidente com

a janela de implante. Desse modo, é agora possível identificar a janela de implante em uma mulher por determinar o nível de PGE2 e/ou PGF2 α em amostras de fluido endometrial ao longo do ciclo menstrual.

PGE2, Ácido 7-[3-hidróxi-2-(3-hidroxioct-1-enil)-5-oxo-ciclopentil]

5 hept-5-enóico, é uma prostaglandina que ocorre naturalmente, também conhecida na medicina como "dinoprostona"; ela tem efeitos importantes no trabalho (suaviza a cerviz e causa contração uterina) e também estimula os osteoblastos a liberar fatores que estimulam reabsorção de osso pelos osteoclastos). Similares a outras prostaglandinas, a dinoprostona pode ser usada
 10 como um abortifaciente, visto que ela é um vasodilatador direto, que relaxa os músculos lisos, e ela inibe a liberação de noradrenalina dos terminais do nervo simpatético.

PGF2 α , Ácido (Z)-7-[(1R,2R,3R,5S)-3,5-dihidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxioct-1-enil] ciclopentil]hept-5-enóico, é também uma prostaglandina
 15 que ocorre naturalmente, também conhecida na medicina como "dinoprost"; ela é usada na medicina para induzir trabalho e como um abortifaciente.

Desse modo, referidas prostaglandinas PGE2 e/ou PGF2 α , quando determinadas em amostras de fluido endometrial, podem ser usadas como biomarcadores de receptividade endometrial a implante de embrião
 20 em um mamífero fêmea, preferivelmente, uma mulher. Adicionalmente, o uso de referida(s) prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2 α , em particular, quando referida(s) prostaglandina(s) são determinadas em uma amostra de fluido endometrial de um mamífero fêmea, preferivelmente, uma mulher, como biomarcador(es) de receptividade endometrial a implante de embrião em uma
 25 referido mamífero fêmea, constitui um aspecto desta invenção. Um "biomarcador", conforme aqui usado, se refere a qualquer lipídio, por exemplo, uma prostaglandina, tal como PEG2 e PGF2 α , cujo nível (concentração) em fluido endometrial é alterado em relação a uma condição fisiológica de interesse.

Em uma concretização particular, a invenção é baseada na des-
 30 coberta que o nível de uma prostaglandina selecionado a partir do grupo consistindo em prostaglandina PGE2, PGF2 α , e combinações destas, em uma amostra de fluido endometrial de um mamífero fêmea, por exemplo,

uma mulher, pode ser usado como um biomarcador de receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea, por exemplo, uma mulher.

Conforme aqui usado, o termo "fluido endometrial" se refere a 5 uma secreção do epitélio glandular que contém os compostos secretados ao lúmen do útero [Aplin JD et al. *The Endometrium*, 2nd. edn: INFORMA health-care; 2008]. Brevemente, o endométrio constitui o tecido de superfície que reveste a parede uterina (miométrio ou camada média da parede uterina consistindo em células de músculo liso, e suporta tecido estromal e vascular) 10 de um mamífero fêmea, tal como uma mulher, ou um primata humano ou não humano ou, em outras palavras, a membrana interna do útero do mamífero. O endométrio é extremamente sensível a hormônios estrogênio e progesterona, e é composto de várias camadas funcionais. A arquitetura do tecido do endométrio compreende uma camada de célula externa, que constitui 15 o epitélio, que está em contato direto com o lúmen do útero, e uma camada de célula interna, denominada estroma, que constitui em torno de 80% da espessura do endométrio. Adicionalmente, o endométrio contém vasos sanguíneos e células especializadas que conferem suas características funcionais ao endométrio. O epitélio endometrial constitui uma camada de célula 20 continua que é organizada em duas regiões: epitélio luminal (células epiteliais que revestem a superfície do endométrio) e células de epitélio glandular que formam glândulas abaixo da superfície do endométrio), referidas regiões sendo fisicamente diferentes e molecularmente reconhecíveis [Brown SE et al. *Endometrial glycodelin-A expression in the luteal phase of stimulated ovarian cycles*. *Fertil Steril* 2000, 74(1):130-133]. O epitélio luminal representa 25 uma barreira física contra os ataques de patogenias e desenvolve estruturas, denominadas pinopodes, em sua superfície apical, que são responsáveis pela absorção de material de lúmen uterino; contudo, o epitélio glandular é responsável pelas secreções que formam o fluido endometrial, que contém 30 todos os compostos secretados ao lúmen do útero [Aplin JD et al. (2008) citado *supra*].

A relevância de referidas secreções por glândulas endometriais

é mostrada em um modelo de animais de fazenda em que inibição na formação de referidas glândulas torna impossível o começo da gravidez [Gray CA et al. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 2002, 124(2):289-300]. Desse modo, foi proposto que uma atividade deficiente da glândula endometrial pode causar falhas na gravidez, embora não existam evidências diretas em humanos [Burton GJ et al. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 2007, 28 Suppl A:S64-69]. Desse modo, interessantemente, a composição do fluido endometrial depende da atividade da glândula endometrial, ao invés do endométrio como um todo, conforme foi anteriormente reportado [van der Gaast et al. The feasibility of a less invasive method to assess maturation endometrial-comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. *BJOG* 2009, 116(2):304-312] - van der Gaast et al. mostram algumas proteínas cujos níveis em tecido endometrial versus fluido endometrial é diferente, e não correspondem entre si.

Desse modo, a presente invenção proporciona métodos e kits para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea; métodos e kits para seleção da janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea; métodos e kits para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião; métodos e kits para monitoramento da maturação endometrial; e métodos e kits para fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea. Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma humana fêmea, ou um primata não humano, preferivelmente uma mulher. Em uma concretização adicionalmente particular, referida mulher é uma mulher submetida a um processo de fertilização (IVF) *in vitro*. Em outra concretização particular, os métodos compreendem detecção do nível de uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em PGE2, PGF2 α , e combinações destas, em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, onde o nível de referida prostaglandina está correlacionado com receptividade endometrial a implante de embrião. Em outra concretização, os métodos com-

5 preendem detecção do(s) nível(is) de PGE2 e/ou PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, em uma ou mais amostras de fluido endometrial obtidas de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual de um mamífero fêmea. Em outra concretização, os métodos compreendem coletar um perfil lipodômico de uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e correlacionar referido perfil lipodômico coletado com o estado de fertilidade de referido mamífero fêmea.

10 Em uma concretização, os métodos da presente invenção são baseados na descoberta que os níveis de referidas prostaglandinas, PGE2 e PGF2 α , seguem um padrão temporal em fluido endometrial durante o ciclo menstrual, e que os níveis de referidas prostaglandinas no referido fluido endometrial são aumentados durante a janela de implante, isto é, uma janela de tempo durante a qual o endométrio uterino é receptivo a concepção.

15 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea, daqui por diante referido como "método da invenção [1]", referido método compreendendo as etapas de:

20 a) determinar o nível de uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), e combinações destas em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea; e

25 b) correlacionar o nível de referida prostaglandina na referida amostra de fluido endometrial com receptividade endometrial a implante de embrião.

Conforme aqui usado, o termo "receptividade endometrial a implante de embrião", se refere ao estado do endométrio durante a janela de receptividade endometrial. O termo "janela de receptividade endometrial" se refere ao período de tempo entre os dias 19 a 21 de um ciclo menstrual humano idealizado de 28 dias. Ciclos similares são conhecidos para outros mamíferos e está dentro da técnica conhecida de adaptar métodos aqui descritos a tais ciclos.

Adicionalmente, o termo "mamífero", conforme aqui usado, inclui

qualquer mamífero, por exemplo, humanos e primatas não humanos, gado, cabras, ovelhas, cavalos, porcos, cães, etc. Em uma concretização preferida particular, referido mamífero é uma mulher. O termo "mulher" se refere a uma fêmea humana. Em algumas concretizações, o mamífero fêmea dentro 5 dos métodos da presente invenção é uma mulher e os estágios do ciclo menstrual são selecionados a partir do grupo consistindo da fase secretória anterior e da fase secretória média.

De acordo com a presente invenção, os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α são determinados em uma amostra de fluido endometrial do mamífero fêmea (por exemplo, mulher) sob estudo. A amostra de fluido endometrial pode ser tomada de referido mamífero fêmea por meios convencionais. Por ilustração, uma amostra de fluido endometrial de uma mulher pode ser obtida conforme mencionado no Exemplo 1, isto é, por introduzir-se brandamente transcervicalmente um cateter flexível vazio na cavidade uterina, e graduadamente aplicar uma sucção com uma seringa. Desde que um desafio maior ocorre na coleta de amostras de pureza adequada, para impedir contaminação pelo muco cervical durante a remoção do cateter, a blindagem externa do cateter de transferência de embrião é avançada a uma profundidade apropriada a partir do cervical externo, seguindo a aplicação de sucção; em 10 15 20 25 alamente aplicar uma sucção com uma seringa. Desde que um desafio maior ocorre na coleta de amostras de pureza adequada, para impedir contaminação pelo muco cervical durante a remoção do cateter, a blindagem externa do cateter de transferência de embrião é avançada a uma profundidade apropriada a partir do cervical externo, seguindo a aplicação de sucção; em seguida, o muco cervical é aspirado antes da aspiração da secreção endometrial. Adicionalmente, embora geralmente o fluido endometrial não conte 30 nha células que podem afetar os resultados, em uma concretização, uma vez que a amostra de fluido endometrial seja extraída, a amostra é submetida a centrifugação de modo a remover qualquer componente de célula eventual que pode estar presente na amostra. Um número satisfatório de amostras de fluido endometrial, combinado com boa prática de coleta de amostra, será suficiente para evitar resultados falsos.

De modo a obter uma detecção mais segura da receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea, é preferível determinar os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α nas amostras de fluido endometrial ao longo do ciclo menstrual. Desse modo, o método da invenção [1] pode ser realizado diariamente, ou cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias, de modo que o perfil de expressão de referidas prostaglandinas PGE2 e/ou PGF2 α nas amostras de fluido endometrial possa ser determinado ao longo do ciclo menstrual total. Tipicamente, em mulheres, as amostras de fluido endometrial podem ser 5 obtidas durante a fase proliferativa (dias 1-14 do ciclo menstrual, ou antes do pico de LH), na fase secretória anterior (dias 15-19 do ciclo menstrual, ou dias 1-5 após o pico de LH), na fase secretória intermediária (dias 20-24 do ciclo menstrual, ou dias 6-10 após o pico de LH), e na fase secretória posterior (dias 25-28 do ciclo menstrual, ou dias 11-14 após o ciclo de LH). De 10 acordo com a presente invenção, os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α no fluido endometrial durante a receptividade endometrial a implante de embrião são os mais altos durante o ciclo menstrual total.

A determinação da receptividade do endométrio a implante de embrião é particularmente importante em um lote de técnicas, tais como IVF, 15 transferência de embrião, etc., bem como para determinar o período ótimo para concepção em pares que estão tentando conceber em um modo natural.

Conforme aqui usado, o termo "nível" é pretendido amplamente, e pode significar quantidade quantitativa (por exemplo, peso ou moles), uma 20 quantidade semiquantitativa, uma quantidade relativa (por exemplo, peso % ou moles % dentro de uma classe ou uma proporção), uma concentração, e similares. Em uma concretização particular, os níveis de PGE2 e PGF2 α são expressos em moles/grama de fluido [neste caso, embora as amostras fossem líquidas, devido ao pequeno volume destas, as amostras foram pesadas, e as concentrações de referidos compostos foram expressas por referência a referido peso – valores foram devidamente normalizados].

A determinação dos níveis de PGE2 e/ou PGF2 α na amostra de fluido endometrial pode ser determinada pelo uso de qualquer método adequado em vista dos lipídios a serem detectados e, opcionalmente, quantificados; métodos ilustrativos, não limitativos, incluem cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia de gás (GC), cromatografia líquida (LC), espectrometria de massa (MS), espectrometria de NMR, etc., e combinações 30

destes (por exemplo, LC/MS, ou similares). Em uma concretização particular, referidos lipídios (PGE2 e PGF2 α) foram identificados por LC combinado com MS em tandem [LC/MS/MS]. Espectrômetros de massa em tandem incluem instrumentos quadrupoles triplos, de armadilha de íon, e quadrupole/tempo de vôo, entre outros. Estes instrumentos tipicamente usam tecnologia de quadrupole para isolar um composto baseado em seu peso molecular antes da ativação de colisão (fragmentação) e análise de massa dos componentes fragmentados. Isto significa que a mistura deve ser purificada somente ao ponto que a amostra aplicada ao espectrômetro de massa está 5 livre de outros compostos com a mesma massa. Isto pode frequentemente ser alcançado com uma extração líquido-líquido a partir do tecido, seguido por métodos de extração de fase sólida. A tecnologia de quadrupole proporciona aproximadamente resolução de 1 amu; isolamento aperfeiçoadamente dentro do espectrômetro de massa é alcançado usando instrumentos TOF/TOF, 10 que permitem resolução muito mais fina.

15

Métodos alternativos para determinar o nível de PGE2 e PGF2 α de amostras biológicas foram descritos, ver, por exemplo, Voyksner & Bush, que revela que análise de HPLC/MS por termopulverização dos metabólitos de ácido araquidônico, incluindo prostaglandinas PGE2 e PGF2 α entre outras, se comprova ser sensível e específica [Voyksner, R.D. & Bush, E.D. Determinação de prostaglandinas, e outros metabólitos de ácido araquidônico por HPLC/MS de termopulverização usando derivatização de pós-coluna. Biomedical and Environmental Espectrometria de massa, Volume 14, Issue 5:213 – 220 (publicado online: 13 de abril de 2005)]; Surrenti et al., que revelou 20 um método rápido e prático para a separação e quantificação de PGE2 em suco gástrico humano por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) [Surrenti C. et al., Método de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho para Prostaglandina E² Determinação em Suco Gástrico Humano Sem Derivatização. Journal of Liquid chromatography & Related Technologies, Volume 25 2, Issue 12, Outubro de 1984, páginas 2409 – 2419]; and Bastani et al., que desenvolveram um método analítico baseado em LC com ionização de eletropulverização negativa (ESI) acoplado a detecção espetrométrica, 30

trica de massa em tandem (LC/MS/MS) para a determinação de concentrações de derivados de PGF_{2α} em amostras biológicas diferentes [Bastani, N.E., et al. Determinação de concentrações de 8-epi PGF_{2α} como um biomarcador de tensão oxidativa usando cromatografia líquida de estágio triplo/espectrometria de massa em tandem. [Rapid Communications in Espectrometria de massa](#), Volume 23 Issue 18, páginas 2885 – 2890 (publicado Online: 10 de agosto de 2009)]. Outro método adequado de detecção e, opcionalmente, quantificação de lipídios em uma amostra biológica emprega traçadores de isótopo estáveis para etiquetar os lipídios.

10 Em uma concretização particular, níveis de PGE2 e PGF_{2α} são medidos usando cromatografia líquida (LC), combinada com espectrometria de massa em tandem (MS) [LC/MS/MS].

15 Os níveis de PGE2 e/ou PGF_{2α} podem ser baseados na análise quantitativa e/ou semiquantitativa. Por exemplo, métodos semiquantitativos podem ser usados para determinar um nível de um metabólito(s) de lipídio particular (PGE2 e/ou PGF_{2α}) acima de um valor limite, ou para determinar proporções de metabólitos de lipídio diferentes, sem designação de um valor numérico absoluto ou relativo. Métodos quantitativos podem ser usados para determinar uma quantidade relativa ou absoluta de um metabólito(s) de lipídio particular na amostra biológica.

20 Nos métodos semiquantitativos, um valor limite ou de corte pode ser determinado por qualquer meio conhecido na técnica, e é opcionalmente um valor predeterminado. Em concretizações particulares, o valor limite é predeterminado no sentido que ele é fixo, por exemplo, baseado na experiência prévia com o ensaio e/ou uma população de mamíferos fêmeas (por exemplo, mulheres). Alternativamente, o termo valor "predeterminado" pode também indicar que o método de chegar no limite é predeterminado ou fixado, mesmo se o valor particular varia entre ensaios, ou pode ainda ser determinado para toda operação do ensaio.

30 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para selecionar a janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea, daqui por diante referido como o "método da invenção [2]", que compreende de-

terminar o nível de PGE2, o nível de PGF2 α , ou o nível de ambas PGE2 e PGF2 α , em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, no qual referida janela de implante é selecionada quando o nível de pelo menos uma de referidas prostaglandinas PGE2 ou PGF2 α na referida amostra é aumentado em relação a uma amostra de referência.

Conforme aqui usado, a expressão "método para selecionar", se refere a um método para determinar a probabilidade de um mamífero fêmea (por exemplo, uma mulher) estar em um período receptivo para implante de embrião. O técnico no assunto observará que referida previsão não pode ser correta para 100% dos mamíferos fêmeas (por exemplo, mulheres) sob estudo. Contudo, referida expressão requer que o método de previsão proporcione resultados corretos para uma porção estatisticamente significante de mamíferos fêmeas (por exemplo, mulheres), o que pode ser determinado pelo uso de técnicas estatísticas padrões, tais como a determinação de intervalos de confidência, determinação de valor p, teste t de Student, ou o teste de Mann-Whitney, conforme explanados por Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983. Os intervalos de confidência adequados são, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, ou mais preferivelmente, pelo menos 95%. Preferivelmente, os valores p são 0,2, 0,1, ou, mais preferivelmente, 0,05.

Conforme aqui usado, o termo "janela de implante" envolve a janela de tempo durante a qual o endométrio uterino é receptivo ao conceptual; em humanos, isto ocorre no estágio secretório do ciclo menstrual. A implantação é definida como dias 6-8 pós o dia de onda de hormônio de luteinização (LH). A janela de implante pode ser estimada na base de um padrão menstrual regular como aproximadamente 7 dias antes do primeiro dia esperado do período menstrual, isto é, ele corresponde, portanto, aos dias 19-21 de um ciclo menstrual ideal de 28 dias em humanos. Ciclos similares foram revelados em outros mamíferos, de modo que a invenção não pode ser adaptada a qualquer mamífero fêmea.

Os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α são determinados em uma

amostra de fluido endometrial a partir do mamífero fêmea sob estudo. Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher. A amostra de fluido endometrial pode ser tomada de referido mamífero fêmea por meios convencionais conforme mencionado em conjunto com o 5 método da invenção [1]. Adicionalmente, a determinação do nível de PGE2 e/ou PGF2α na amostra de fluido endometrial pode ser determinada pelo uso de qualquer método adequado conforme discutido em conjunto com o método da invenção [1]. Em uma concretização particular, os níveis de PGE2 e PGF2α são medidos pelo uso de cromatografia líquida (LC) combinada com espectrometria de massa em tandem (MS) [LC/MS/MS].

10 De acordo com o método da invenção [2], a determinação dos níveis de PGE2 e/ou PGF2α necessita ser correlacionada ao nível de referidas prostaglandinas em uma amostra de referência. Efetivamente, a janela de implante é selecionada quando o nível de pelo menos uma de referidas 15 prostaglandinas PGE2 ou PGF2α na amostra de fluido endometrial analisada é aumentado em relação a uma amostra de referência. O nível de uma prostaglandina, tal como PGE2 ou PGF2α na amostra de fluido endometrial a partir do mamífero fêmea sob estudo, é "aumentado em relação a" o nível de referidas prostaglandinas em uma amostra de referência de acordo com a 20 presente invenção, quando o nível de referidas prostaglandinas na amostra de fluido endometrial sob estudo é pelo menos, 1,1 vezes, 1,5 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, 100 vezes, ou ainda mais com relação à amostra de referência.

25 Conforme aqui usado, o termo "amostra de referência", se refere a uma amostra de fluido endometrial obtida de um mamífero fêmea, por exemplo, uma mulher, durante o período não fértil do referido mamífero. Devido a variabilidade eventual que pode existir entre mamíferos fêmeas diferentes (por exemplo, mulheres), como para a produção de referidas prostaglandinas durante o período não fértil, a amostra de referência pode ser tipicamente obtida por combinação das mesmas quantidades de amostras de 30 uma população de mamíferos fêmeas. Em uma concretização particular,

amostras de referência típicas serão obtidas de mulheres clinicamente bem documentadas. Nas referidas amostras, concentrações normais (isto é, concentrações de referência) do biomarcador (PGE2 e/ou PGF2α) podem ser determinadas, por exemplo, pelo estabelecimento da concentração média na 5 população de referência. De modo a determinar a concentração de referência do biomarcador, algumas considerações devem ser colocadas em mente, por exemplo, idade, etc. Por ilustração, as mesmas quantidades de um grupo de pelo menos 2, pelo menos 10, pelo menos 100, preferivelmente, mais do que 1.000 mamíferos fêmeas, por exemplo, mulheres, preferivelmente 10 classificadas tendo em mente as considerações acima mencionadas (por exemplo, idade, etc.), pode ser tomado como o grupo de referência.

Em uma concretização particular, a amostra de referência é obtida do fluido endometrial de uma mulher, ou de uma população de mulheres, durante o período não fértil de referida(s) mulher/mulheres. Embora a 15 amostra de referência possa ser obtida em qualquer dia durante o período não fértil de referida(s) mulher/mulheres, em uma concretização particular, referida amostra de referência é obtida antes do 15º dia do ciclo menstrual, tipicamente entre os dias 5-11 do ciclo menstrual. O valor predeterminado pode ser calculado pelo uso das amostras de fluido endometrial do estágio 20 de ciclo menstrual conforme definido acima.

Alternativamente, de modo a obter uma determinação mais segura da janela de implante, é preferível determinar os níveis de PGE2 e/ou PGF2α ao longo do ciclo menstrual. Desse modo, o método da invenção [2] pode ser realizado diariamente, ou a cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 25 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias, de modo que o perfil de expressão de referidas prostaglandinas PGE2 e/ou PGF2α pode ser determinado ao longo do ciclo menstrual total. Tipicamente, em mulheres, amostras de fluido endometrial podem ser obtidas durante a fase proliferativa (dias 1-14 do ciclo menstrual, ou antes do pico de LH), na fase secretória 30 anterior (dias 15-19 do ciclo menstrual, ou dias 1-5 após o pico de LH), na fase secretória intermediária (dias 20-24 do ciclo menstrual, ou dias 6-10 após o pico de LH) e, na fase secretória posterior (dias 25-28 do ciclo mens-

trual, ou dias 11-14 após o pico de LH). Desse modo, a janela de implante ótima corresponderá ao período de tempo no qual os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α são os mais altos durante o ciclo menstrual total.

Em uma concretização particular, a amostra de referência é obtida do mesmo mamífero fêmea (por exemplo, mulher) sob estudo durante seus dias não férteis de modo a quantificar o(s) nível(s) de referidas prostaglandinas (PGE2 e/ou PGF2 α); referida informação pode ser usada como um valor de referência.

Em outra concretização particular, a amostra de referência é obtida de uma população generalizada de mamífero fêmea (por exemplo, uma população de mulheres) durante seus dias não férteis e o(s) nível(is) de referidas prostaglandinas (PGE2 e/ou PGF2 α) são quantificados e combinados para estabelecer o valor de referência.

De acordo com a presente invenção, lipídios bioativos em secreções endometriais são analisados para determinar seus níveis relativos e estabelecer uma correlação com o resultado da implantação e gravidez.

Desse modo, em outro aspecto, a invenção se refere a um método para avaliar o estado de fertilidade de um mamífero fêmea, no qual referido método compreende:

- determinar o nível of PGE2, o nível de PGF2 α ou o nível de ambas PGE2 e PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e

- correlacionar o nível de referida(s) prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2 α com estado de fertilidade.

Os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α em uma amostra de fluido endometrial do mamífero fêmea sob estudo, obtida conforme mencionado acima, podem ser determinados pelo uso de qualquer método adequado conforme discutido em conjunto com o método da invenção [1].

Este método é objetivado na avaliação de níveis de referida(s) prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2 α em amostras de fluido endometrial durante a janela de implante no endométrio de referido mamífero fêmea. Os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α no fluido endometrial se correlacionam com a

receptividade endometrial e probabilidade de concepção. Desse modo, de acordo com este método, conhecendo-se os níveis de PGE2 e/ou PGF2α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, é possível conhecer os dias mais férteis de seu ciclo menstrual no qual as condições ótimas para obter gravidez são satisfeitas.

5 Em uma concretização preferida particular deste método, referido mamífero fêmea é uma mulher.

10 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, no qual referido método compreende:

- determinar o nível de PGE2, o nível de PGF2α ou o nível de ambas PGE2 e PGF2α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, e
15 - correlacionar o nível de referida(s) prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2α com as condições para receber e implantar um embrião.

Os níveis of PGE2 e/ou PGF2α em uma amostra de fluido endometrial do mamífero fêmea sob estudo, obtida conforme mencionado acima, podem ser determinados pelo uso de qualquer método adequado conforme discutido em conjunto com o método da invenção [1]. Este método é 20 também objetivado na avaliação de níveis de referidas prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2α durante a janela de implante no endométrio de referido mamífero fêmea. Os níveis de PGE2 e/ou PGF2α estão correlacionados com as condições dos mamíferos fêmeas receber e implantar um embrião, e a probabilidade de concepção. Novamente, de acordo com este método, 25 conhecendo-se os níveis de PGE2 e/ou PGF2α em uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea, é possível conhecer os dias mais adequados para um mamífero fêmea receber e implantar um embrião.

Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher, preferivelmente uma mulher submetida a um processo de fertilização (IVF) in vitro. Neste caso, os níveis de PGE2 e/ou PGF2α estão correlacionados com as condições de a mulher receber e implantar um embrião, e a probabilidade de concepção. A amostra de fluido endometrial de referida 30

mulher pode ser obtida a qualquer momento antes do implante do embrião, por exemplo, de alguns minutos (por exemplo, 15 minutos), há algumas horas (por exemplo, 4-6 horas), ou ainda alguns dias (por exemplo, 1, 7, 14, ou ainda mais), antes da transferência do embrião. Em uma concretização particular, este método é planejado para ser realizado no fluido endometrial obtido em um modo não interrompido 5-6 horas antes da transferência do embrião.

Conforme discutido acima, a capacidade de identificar mediadores de lipídio específicos em secreções endometriais que agem como biomarcadores de receptividade endometrial, é de grande importância ao processo de IVF. Pela eliminação da necessidade de obter biópsias endometriais, uma etapa estressante para a mulher é evitada. Além disso, duração endometrial correta é imprecisamente obtida, apesar do desenvolvimento de técnicas não invasivas, tais como ecografia de ultra som ou ressonância magnética, que somente proporciona informação morfológica do útero que tem se comprovado não segura. A presente invenção proporciona um método para determinar as características bioquímicas do útero e um endométrio receptivo apropriado umas poucas horas antes da transferência do embrião, desse modo aumentando as chances de implante de embrião bem sucedido. Desse modo, pela otimização do fator endometrial, as taxas de implantação podem ser aperfeiçoadas por pelo menos 5%, tipicamente, pelo menos 10%.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea, referido método compreendendo as etapas de:

a) determinar o(s) nível(is) de PGE2 e/ou PGF2 α nas amostras de fluido endometrial de referido mamífero fêmea obtida de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual de referido mamífero fêmea; e
b) correlacionar o(s) nível(is) de referida(s) prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2 α com maturação endometrial.

Alternativamente, de acordo com este aspecto, o método para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea compreende as etapas de:

a) obtenção de uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea;

b) determinar o(s) nível(is) de PGE2 e/ou PGF2 α na referida amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea;

5 c) repetir as etapas a) e b) com amostras de fluido endometrial obtidas de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual de referido mamífero fêmea; e

d) correlacionar o(s) nível(is) de referida(s) prostaglandina(s) PGE2 e/ou PGF2 α com maturação endometrial.

10 Os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α nas referidas amostras de fluido endometrial do mamífero fêmea sob estudo, obtidas conforme mencionado acima, podem ser determinados pelo uso de qualquer método adequado conforme discutido em conjunto com o método da invenção [1].

15 De acordo com este método, amostras de fluido endometrial são obtidas de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual do mamífero fêmea sob estudo, por exemplo, no caso de um ciclo menstrual idealizado de uma mulher, durante a fase proliferativa (dias 1-14 do ciclo menstrual), na fase secretória anterior (dias 15-19 do ciclo menstrual), na fase secretória intermediária (dias 20-24 do ciclo menstrual), e na fase secretória posterior 20 (dias 25-28 do ciclo menstrual), de modo a ser capaz de correlacionar os níveis de referidas prostaglandinas PGE2 e/ou PGF2 α com a maturação endometrial, desse modo, conhecendo-se o estado do endométrio ao longo do ciclo menstrual.

25 Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher, por exemplo, uma mulher submetida a um processo de IVF.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método de fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea, referido método compreendendo as etapas de:

30 a) determinar o(s) nível(is) de PGE2 e/ou PGF2 α em amostras de fluido endometrial de referido mamífero fêmea obtidas de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual de referido mamífero fêmea;

b) correlacionar o(s) nível(is) de referida(s) prostaglandina(s)

PGE2 e/ou PGF2 α em uma ou mais amostras de fluido endometrial da etapa b) com maturação endometrial; e

c) introduzir um embrião no útero de referido mamífero fêmea quando referido endométrio está maturo.

5 Alternativamente, de acordo com este aspecto, o método de fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea compreende as etapas de:

a) obter uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea;

10 b) determinar o(s) nível(is) de PGE2 e/ou PGF2 α na referida amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea;

c) repetir as etapas a) e b) com amostras de fluido endometrial obtidas de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual de referido mamífero fêmea;

d) correlacionar o(s) nível(is) de referida(s) prostaglandina(s)

15 PGE2 e/ou PGF2 α em uma ou mais amostras de fluido endometrial da etapa c) com maturação endometrial; e

e) introduzir um embrião no útero de referido mamífero fêmea quando referido endométrio está maturo.

20 Os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α nas referidas amostras de fluido endometrial do mamífero fêmea sob estudo, obtidas conforme mencionado acima, podem ser determinados pelo uso de qualquer método adequado conforme discutido em conjunto com o método da invenção [1].

25 De acordo com este método, amostras de fluido endometrial são obtidas de uma pluralidade de estágios do ciclo menstrual do mamífero fêmea sob estudo, conforme discutido acima, e uma vez que o endométrio está maturo, um embrião é introduzido no útero de referido mamífero fêmea.

Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher, por exemplo, uma mulher submetida a um processo de IVF.

30 A invenção também se refere a um kit para praticar os métodos da invenção. Por "kit" é pretendido qualquer artigo de manufatura (por exemplo, um pacote ou um recipiente), compreendendo pelo menos um lipídeo de referência para PGE2, ou um lipídeo de referência para PGF2 α . O kit

pode ser promovido, distribuído ou vendido como uma unidade para realização dos métodos da presente invenção. Adicionalmente, os kits podem conter um inserto de pacote descrevendo o kit e instruções para uso. Em uma concretização, as instruções descrevem métodos para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião, ou para seleção da janela de implante de um embrião, ou para avaliação do estado de fertilidade, ou para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, ou para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea, ou para fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea.

10 O kit pode também compreender, em adição aos referidos lipídios de referência para PGE2 e/ou PGF2α (por exemplo, lipídios de PGE2 e/ou PGF2α de pureza e concentração conhecidas), um ou mais reagentes, referidos reagentes sendo selecionados em função da técnica selecionada para determinar o nível de PGE2 e/ou PGF2α – o técnico no assunto conhece os reagentes que são necessários para realizar uma técnica específica para determinar o nível de referidos lipídios.

15 O referido kit pode ser usado para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião em um mamífero fêmea, ou para selecionar a janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea, ou para avaliar o estado de fertilidade de um mamífero fêmea, ou para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, ou para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea, ou para fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea. Desse modo, referido kit pode ser usado para uma avaliação analítica precisa de amostras 20 que são diagnosticadas de um endométrio receptivo horas antes do procedimento de transferência do embrião. Os usos previamente mencionados do kit constituem um aspecto adicional desta invenção.

25 Desse modo, conforme foi anteriormente mencionado, a invenção proporciona um número de métodos de diagnóstico não invasivos, e kits para realização de referidos métodos, baseados na identificação do perfil de lipídio no fluido endometrial durante a janela de implante. Em uma concretização particular, referido perfil de lipídio compreende PGE2 e/ou PGF2α.

Os métodos proporcionados pela presente invenção são esperados aumentar as taxas de implantação atuais por, pelo menos 5%, preferivelmente pelo menos 10%. Um aperfeiçoamento das taxas de implantação é de benefício para ambas a comunidade médica e pacientes, pela provisão 5 de uma melhor assistência médica com chances aumentadas de resultados bem sucedidos. Pelo aumento das taxas de gravidez, uma percentagem significante de pacientes que devem ir através de uma segunda etapa de tratamento evitará tal necessidade, desse modo, evitando a ansiedade e problema econômico que ele pode representar.

10 Adicionalmente, os métodos e kits proporcionados pela presente invenção proporcionarão a comunidade médica com uma ferramenta poderosa na diagnose de receptividade endometrial antes da transferência do embrião em tratamentos de IVF. Referidos métodos eliminarão a necessidade de abordagens invasivas, e aperfeiçoarão as taxas de implantação atuais 15 oferecendo leituras bioquímicas em tempo real de receptividade endometrial somente umas poucas horas antes do procedimento de transferência do embrião. Os pacientes, consequentemente, evitam os processos de coleta por biópsia.

20 A invenção adicionalmente proporciona um método para identificar um composto capaz de intensificar a receptividade do endométrio, bem como um método para identificar um agente contraceptivo.

Desse modo, em outro aspecto, a invenção adicionalmente proporciona um método para identificar um composto capaz de intensificar a receptividade do endométrio, que compreende:

25 (i) contatar uma PGE2 e/ou PGF2 α que produz célula com o composto sob teste (composto candidato), e

(ii) determinar o nível de referida PGE2 e/ou PGF2 α , no qual o referido composto candidato é adequado para intensificar a receptividade do endométrio se referido composto causa um aumento na produção 30 de referida PGE2 e/ou PGF2 α por referido célula.

Em outro aspecto, a invenção adicionalmente proporciona um método para identificar um agente contraceptivo, que compreende:

(i) contatar uma PGE2 e/ou PGF2 α que produz célula com o composto sob teste (composto candidato), e

5 (ii) determinar o nível de referida PGE2 e/ou PGF2 α , no qual o referido composto candidato é adequado como um agente contraceptivo se referido composto causa uma diminuição na produção de referida PGE2 e/ou PGF2 α por referida célula.

10 Em ambos os casos, o composto candidato a ser testado no referido método para identificar um composto capaz de intensificar a receptividade do endométrio, ou para identificar um agente contraceptivo, pode ser praticamente qualquer composto químico, incluindo ambos compostos de baixo peso molecular e macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucléicos, lipídios e similares. A expressão "contatando", conforme aqui usada, inclui qualquer modo possível de introduzir o composto candidato na referida PGE2 e/ou PGF2 α que produz células.

15 Embora virtualmente qualquer PGE2 e/ou PGF2 α que produz célula possa ser usada na operação de referidos métodos (para identificar um composto capaz de intensificar a receptividade do endométrio, ou para identificar um agente contraceptivo), em uma concretização particular, a referida PGE2 e/ou PGF2 α que produz célula pode ser uma célula epitelial do

20 endométrio [célula do endométrio epitelial], preferivelmente, uma célula do endométrio epitelial humana; em outra concretização particular, referida PGE2 e/ou PGF2 α que produz célula é uma linha de célula de endométrio, preferivelmente, uma linha de célula humana de endométrio, referida célula tendo a capacidade de produzir PGE2 e/ou PGF2 α . Neste caso, o nível de

25 referida PGE2 e/ou PGF2 α pode ser determinado no meio de cultura por qualquer das técnicas anteriormente mencionadas. Alternativamente, é também possível que referida PGE2 e/ou PGF2 α que produz células estão presentes em um modelo de animal; em seguida, o nível de referida PGE2 e/ou PGF2 α pode ser determinado em uma amostra do fluido endometrial de referido modelo de animal por qualquer das técnicas anteriormente mencionadas.

30 Um aumento na produção da referida PGE2 e/ou PGF2 α pode

ser indicativa que o composto candidato é adequado para intensificar potencialmente ou aumentar a receptividade do endométrio para implantar um embrião. Similarmente, uma diminuição na produção de referida PGE2 e/ou PGF2 α pode ser indicativa que o composto candidato pode ser usado como 5 um agente contraceptivo, visto que referido composto reduz a receptividade do endométrio para implantar um embrião.

Em um aspecto adicional, a invenção se refere a uma composição de lipídeo, na qual referida composição de lipídeo foi obtida de uma amostra de fluido endometrial de um mamífero fêmea durante a janela de 10 implante de um embrião no referido mamífero fêmea. Referida composição de lipídeo pode ser usada para determinar receptividade endometrial para implantar um embrião.

Em uma concretização particular, referido mamífero fêmea é uma mulher.

15 Adicionalmente, em uma concretização particular, referida composição de lipídeo compreende um lipídio selecionado dos seguintes lipídios N-araquidonoila etanolamina (AEA), N-palmitoila etanolamina (PEA), N-oleoila etanolamina (OEA), 2-araquidonoila glicerol 2-AG), N-estearoila etanolamina (SEA), N-linoleoila etanolamina (LEA), prostaglandina E2 (PGE2), 20 prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), prostaglandina F1 alfa (PGF1 α), e combinações destas. Em uma concretização preferida, referida composição de lipídeo compreende uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em PGE2, PGF2 α , e combinações destas, por causa dos níveis de referido(s) lipídio(s) específico(s) ser/serem aumentados significantemente 25 nas amostras de fluido endometrial entre dias 19 a 21 do ciclo menstrual de uma mulher, coincidente com a janela de implante.

Desse modo, em outro aspecto, a invenção se refere a um método para selecionar a janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea compreendendo as etapas:

- 30 a) proporcionar uma amostra de fluido endometrial de referido mamífero fêmea;
- b) coletar um perfil lipodômico de referida amostra; e

c) correlacionar referido perfil lipodômico coletado com estado de fertilidade de um mamífero fêmea.

A amostra de fluido endometrial do mamífero fêmea sob estudo pode ser obtida por métodos convencionais conforme discutido acima.

5 A obtenção de um perfil lipodômico de referida amostra de fluido endometrial do mamífero fêmea sob estudo pode ser realizada com vários químicos e técnicas analíticas de alta resolução. Técnicas analíticas adequadas incluem, mas não são limitadas a, espectrometria de massa (MS) e espectrometria de ressonância nuclear (NRS). Qualquer técnica de alta resolução capaz de redissolver lipídios individuais ou classes de lipídio, e proporcionam informação estrutural dos mesmos pode ser usada para coletar o perfil de lipídio de referida amostra biológica. A coleta do perfil lipodômico com espectrometria de massa (MS) é uma concretização da presente invenção. O instrumento de MS pode estar acoplado a um método de separação de alto desempenho, tal como HPLC.

A técnica analítica usada para coletar o perfil lipodômico deve ser capaz de quantificar ou medir ou a quantidade exata, ou pelo menos uma quantidade relativa dos lipídios individuais ou classes de lipídio. A quantidade dos lipídios individuais ou classes de lipídio no perfil lipodômico coletado é usada quando se compara o perfil de lipídio coletado aos biomarcadores lipidônicos de referência. Em uma concretização particular, os níveis dos lipídios são determinados por LC/MS/MS, conforme discutido acima.

Os biomarcadores lipidônicos de referência podem ser estabelecidos do mesmo mamífero fêmea sob estudo, ou podem ser de uma população generalizada. Se os mesmos mamíferos fêmeas são usados para criar o biomarcador lipidônico de referência, em seguida uma amostra pode ser coletada de referido mamífero fêmea durante os dias não férteis destes. O biomarcador lipidônico de referência é, em seguida, criado daquele primeiro perfil de lipídio daquele mamífero fêmea. Este biomarcador lipidônico é usado como uma linha base ou ponto de partida. Uma série de perfis lipodônicos pode ser coletada ao longo do ciclo menstrual. Estes perfis lipodônicos são, em seguida, comparados com o biomarcador lipidônico de referência

previamente criado.

Os biomarcadores lipídicos de referência podem também serem criados de uma população generalizada de mamíferos fêmeas. Se uma população generalizada é usada em seguida, vários perfis de lipídio de referida são combinados e o biomarcador lipídico é criado desta combinação.

Em uma concretização particular, os biomarcadores lipídicos de referência são um ou mais lipídio(s) selecionados dos seguintes lipídios N-araquidonoila etanolamina (AEA), N-palmitoila etanolamina (PEA), N-

oleoila etanolamina (OEA), 2-araquidonoila glicerol (2-AG), N-estearoila etanolamina (SEA), N-linoleoila etanolamina (LEA), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), prostaglandina F1 alfa (PGF1 α), e combinações destas. Em uma concretização preferida, referido perfil de lipídio compreende uma prostaglandina selecionada a partir do grupo consistindo em PGE2, PGF2 α , e combinações destas, porque os níveis de referido(s) lipídio(s) específico(s) é/são aumentados significantemente em amostras de fluido endometrial entre dias 19 a 21 do ciclo menstrual de uma mulher, coincidente com a janela de implante.

Outro aspecto da invenção é um kit compreendendo lipídeos de referência para formar os biomarcadores lipídicos de referência. O kit pode ser promovido, distribuído ou vendido como uma unidade para realizar o método acima mencionado. Adicionalmente, o kit pode conter um inserto de pacote descrevendo o kit e instruções para uso. Em uma concretização, as instruções descrevem os métodos para detecção da receptividade endometrial a implante de embrião, ou para selecionar a janela de implante de um embrião, ou para avaliar o estado de fertilidade, ou para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, ou para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero fêmea, ou para fertilização in vitro em um mamífero fêmea.

O kit pode também compreender, em adição a referidos lipídeos de referência, formar os biomarcadores lipídicos de referência com um ou mais reagentes, referidos reagentes sendo selecionados em função da técnica selecionada para determinar o nível dos lipídios na amostra de fluido

endometrial a ser analisada – o técnico no assunto conhece os reagentes que são necessários para realizar uma técnica específica para determinar o nível de referidos lipídios.

O referido kit pode ser usado para a detecção da receptividade 5 endometrial a implante de embrião em uma mamífero fêmea, ou para seleção da janela de implante de um embrião em um mamífero fêmea, ou para avaliar o estado de fertilidade de um mamífero fêmea, ou para avaliar se um mamífero fêmea está sob condições adequadas para receber e implantar um embrião, ou para monitoramento da maturação endometrial em um mamífero 10 fêmea, ou para fertilização *in vitro* em um mamífero fêmea. Desse modo, referido kit pode ser usado para uma avaliação analítica precisa de amostras que são predispostas de um endométrio receptivo horas antes do procedimento de transferência do embrião. Os usos anteriormente mencionados do kit constituem um aspecto adicional desta invenção.

15 O seguinte exemplo ilustra a invenção, mas não é pretendido limitar o escopo da invenção.

EXEMPLO 1

A concentração de PGE2 e PGF2α é显著mente aumentada durante a janela de implantação

20 1.1 Materiais

Metanol de grau de HPLC e acetonitrila usados para estudos espectrométricos de massa foram comprados de VWR international (Plainview, NY). Água de grau de HPLC, espectrometria de massa/ácido acético de grau de HPLC, ácido fórmico, e acetato de amônia, foram comprados de 25 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

1.2 Metodologia

Projeto. Os inventores conduziram um estudo simples em 39 fêmeas saudáveis doadoras após obtenção de consentimento assinado informado. Todas as amostras foram coletadas de mulheres durante seu ciclo menstrual natural; aspirados endometriais foram designados com um número de identificação, e preservados usando-se métodos padrões antes da análise.

Procedimento de aspiração de secreção endometrial. Com o paciente estando em posição de litotomia, a cerviz foi limpa após inserção do espéculo. Um cateter flexível vazio (Wallace, Smith Medical International) foi brandamente introduzida 6 cm transcervicalmente na cavidade uterina, e 5 sucção foi gradualmente aplicada com uma seringa de 10 ml. Para impedir contaminação pelo muco cervical durante remoção do cateter, a blindagem externa do cateter de transferência do embrião foi avançada a uma profundidade de 4 cm a partir da cervical externa os, seguindo a aplicação de sucção. O muco cervical foi aspirado antes da aspiração de secreção endometrial para comparação dentro do paciente, de modo a verificar se os aspirados representam o muco cervical preferivelmente do que secreções endometriais.

Análise da amostra. Lipídios de extratos de fluido endometrial foram identificados por cromatografia líquida (LC), combinada com espectrometria de massa em tandem (MS). Água de grau de HPLC foi adicionada às 15 amostras para produzir uma solução orgânica 30%. Os lipídios foram parcialmente purificados em colunas de extração de fase sólida C18, conforme anteriormente descrito [Bradshaw, HB., Rimmerman, N., Krey, JF e Walker, JM. 2006. Diferenças de ciclo de sexo e hormonal em níveis de cérebro de 20 rato de mediadores de lipídeo canamimiméticos relacionados a dor. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 291: R349-358]. Em breve, cada 500 mg de coluna foi condicionada com 5 ml de metanol e 2,5 ml de água, seguido por carregamento da solução de água/sobrenadante. As colunas foram, em 25 seguida, lavadas com 2 ml de água e 1,5 ml de metanol 55%. Os compostos foram eluídos com 1,5 ml de metanol. Os eluídos foram centrifugados a velocidade máxima antes da análise espectrométrica de massa.

Os espectrômetros de massa em tandem incluem quadrupole triplo, armadilha de íon, e instrumentos de quadrupole/tempo de vôo, entre outros. Estes instrumentos tipicamente usam tecnologia de quadrupole para 30 isolar um composto baseado em seu peso molecular antes da ativação de colisão (fragmentação) e análise de massa dos componentes fragmentados. Isto significa que a mistura deve ser purificada somente ao ponto que a

amostra aplicada ao espectrômetro de massa está livre de outros compostos com a mesma massa. Isto pode frequentemente ser efetuado com uma extração líquido-líquido a partir do tecido, seguido por métodos de extração de fase sólida. A tecnologia de quadrupole proporciona aproximadamente resolução de 1 amu; isolamento aperfeiçoado dentro do espectrômetro de massa é alcançado usando instrumentos de TOF/TOF, que permite resolução muito mais fina.

10 Especificamente, separação rápida de analitos foi obtida usando-se injeções de 10 μ l (Agilent 1100 series autoamostrador, Wilmington, DE) em uma coluna de fase reversa Zorbax eclipse XDB de 2,1 \times 50 mm. A eluição de gradiente (200 μ l/min) foi formada sob pressão em um par de bombas of Shimadzu (Columbia, Maryland) 10AdVP. Análise espectrométrica de massa foi realizada com um espectrômetro de massa quadropole triplo de Applied Biosystems/MDS Sciex (Foster City, CA) API 3000, equipado 15 com uma fonte de ionização de eletropulverização. Os níveis de cada composto foram analisados por monitoramento de reações múltiplas (MRM) no sistema de LC/MS/MS.

20 Quantificação espetrométrica de massa. A quantificação de analitos foi alcançada usando-se software Analyst (Applied Biosystems-MDS Sciex; Framingham MA), que quantifica a quantidade de analito na amostra baseada em um ajuste de energia de uma regressão linear de concentrações conhecidas de padrões sintéticos. Diferenças estatísticas foram determinadas usando-se ANOVA com post-hoc Fisher's LSD usando-se um intervalo de confidência de 95% para a média (softaware SPSS, Chicago, IL).

25 1.3 Resultados

Um total de 39 amostras de fluido endometrial obtidas através de todo o ciclo menstrual [Grupo I (dias 0-8) (n=8); Grupo II (dias 9-14) (n=8); grupo III (dias 15-18) (n=8); Grupo IV (dias 19-23) (n=8) e grupo V (dias 24-30) (n=7)] foram analisadas para mudanças na concentração de lipídio em 30 dois experimentos independentes simples.

No primeiro experimento (n=13), os inventores verificaram um aumento significante na concentração de dois lipídios específicos (PGE2 e

PGF2 α) entre dias 19 a 21 do ciclo menstrual, coincidente com a janela de implantação. Nenhum dos lipídios remanescentes identificados nas amostras [N-araquidonoila etanolamina, N-palmitoila etanolamina, N-oleoila etanolamina, 2-araquidonoila glicerol, N-estearoila etanolamina, N-linoleoila etanolamina, PGF1 α] suportam mudanças significantes durante o ciclo menstrual (figura 1).

Um segundo experimento (n=26) confirmou o pico dos mesmos lipídios reportado no primeiro experimento. Os resultados combinados de ambos os experimentos (n=39) demonstram um pico de aumento 2 vezes e 10 20 vezes na concentração de cada lipídio, respectivamente, durante a janela clínica de implantação (figura 2).

Estes resultados sugerem que PGE2 e/ou PGF2 α podem ser biomarcadores importantes de receptividade endometrial humana durante a janela de implantação.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar receptividade endometrial em implante de embrião em um mamífero fêmea caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 a) determinar o nível de uma prostaglandina selecionada a partir do grupo que compreende prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), e suas combinações, em uma amostra de fluido endometrial do dito mamífero fêmea; e

10 b) identificar o dito mamífero fêmea como um receptivo para implementação de embrião quando o nível de pelo menos uma dentre as ditas prostaglandina PGE2 e prostaglandina PGF2 α na dita amostra de fluido endometrial é aumentada em relação a uma amostra de referência.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito mamífero fêmea é uma mulher.

15 3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que os níveis de PGE2 e/ou PGF2 α são determinados por cromatografia líquida combinada com espectrometria de massa em tandem.

20 4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a amostra de referência é uma amostra de fluido endometrial obtida a partir da dita fêmea durante período não fértil da dita fêmea.

25 5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a amostra de referência é amostra de fluido endometrial obtida a partir de uma população de mamíferas fêmea durante período não fértil das ditas fêmeas.

6. Método para identificar um composto capaz de intensificar a receptividade do endométrio caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

30 (i) contatar uma célula de produção de PGE2 e/ou PGF2 α com o composto sob teste, e

 (ii) determinar o nível da dita PGE2 e/ou PGF2 α , em que o dito composto é adequado para intensificar a recepti-

vidade do endométrio se o composto causa um aumento na produção da dita PGE2 e/ou PGF2 α pela dita célula.

7. Método para identificar um agente contraceptivo caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 (iii) contatar uma célula de produção de PGE2 e/ou PGF2 α com o composto sob teste (composto candidato), e
 - (iv) determinar o nível da dita PGE2 e/ou PGF2 α , em que o dito composto candidato é adequado como um agente contraceptivo se o dito composto causa uma diminuição na produção da dita
- 10 PGE2 e/ou PGF2 α pela dita célula.

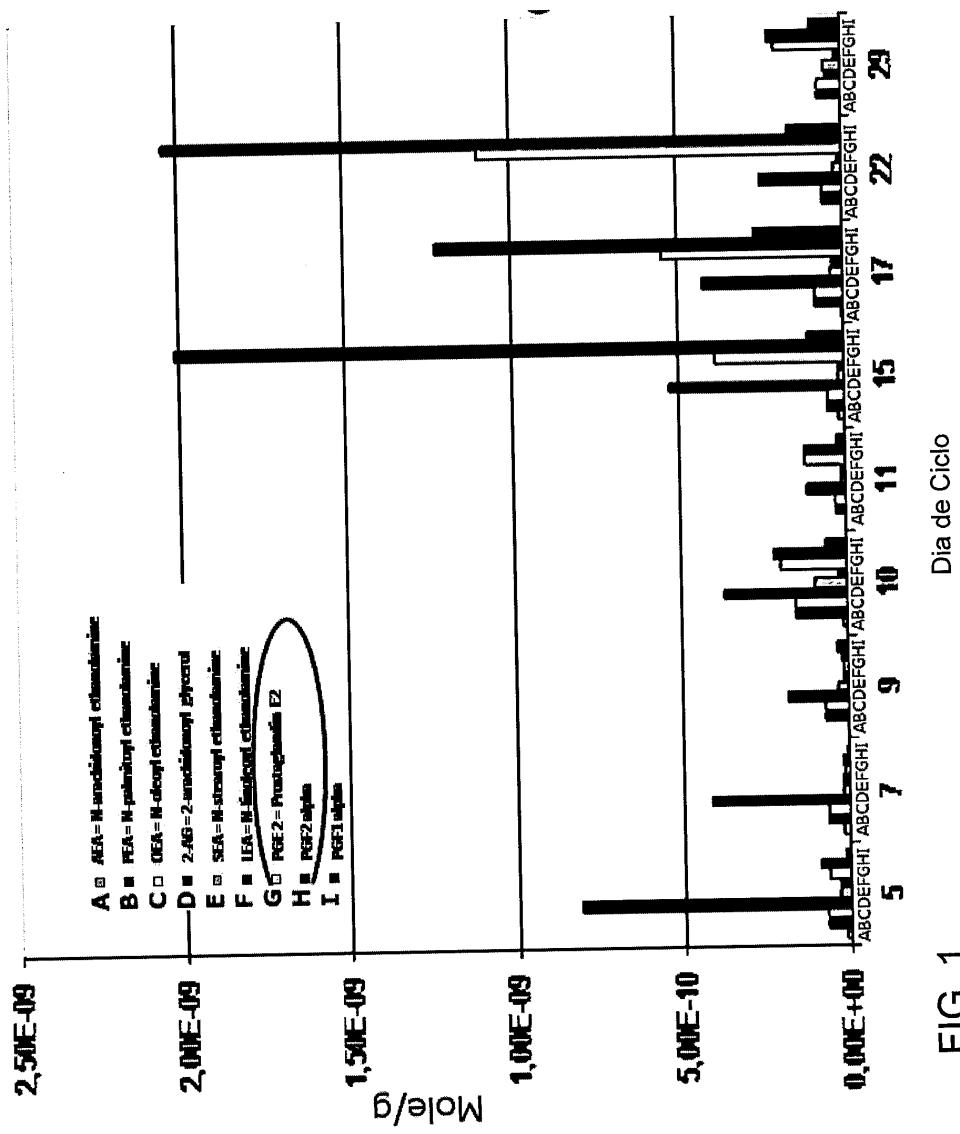


FIG. 1

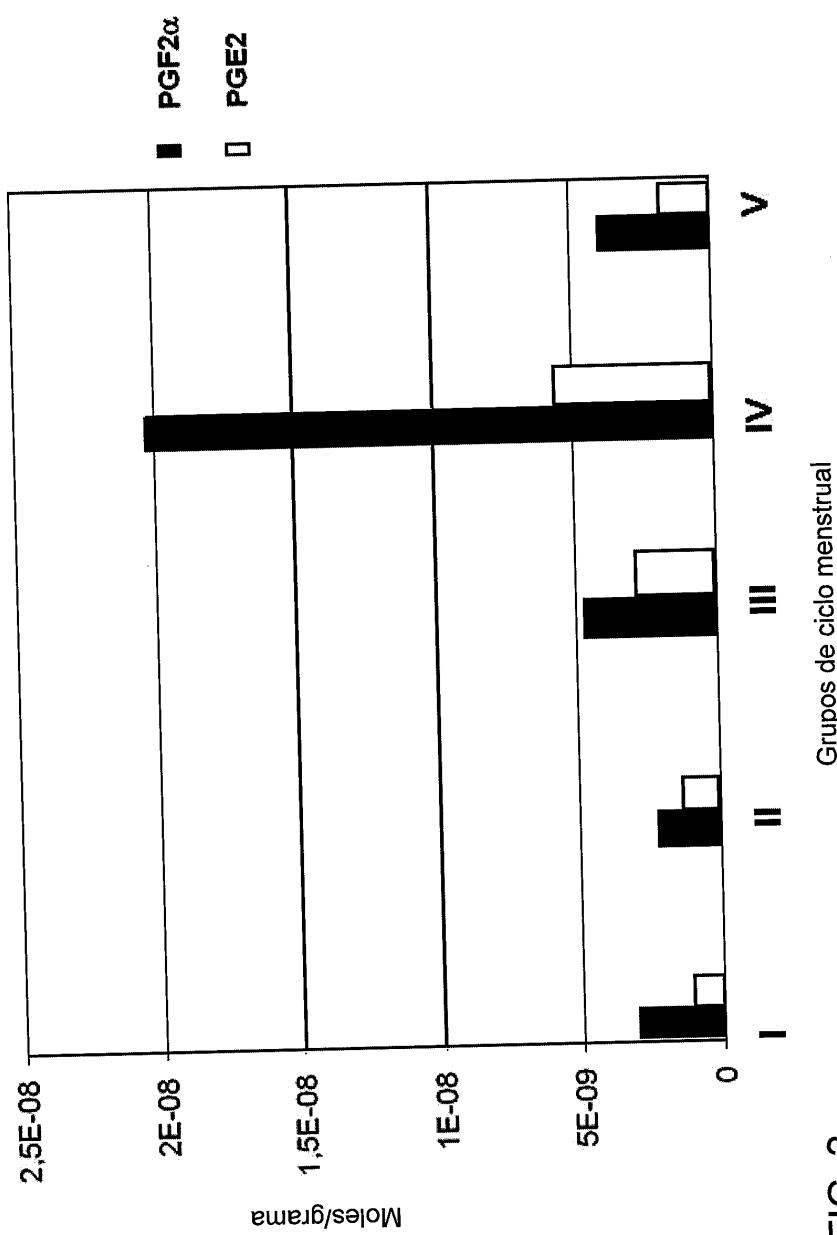


FIG. 2

RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODO PARA DETECTAR RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL EM IMPLANTE DE EMBRIÃO EM UM MAMÍFERO FÊMEA, MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM COMPOSTO CAPAZ DE INTENSIFICAR A RECEPTIVIDADE DO ENDOMÉTRIO, E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE CONTRACEPTIVO**".

A presente invenção refere-se a um método de diagnóstico não invasivo de receptividade endometrial que inclui coletar e comparar padrões de biomarcador de lipídeo a biomarcadores lipidômicos de referência, particularmente prostaglandinas PGE2 e/ou PGF2 α . O método é especialmente aplicável para determinar estado de fertilidade de um mamífero fêmea, preferivelmente, uma mulher.