

Test della recettività endometriale ERPeakSM

Come ottimizzare l'impianto con il trasferimento di precisione degli embrioni

Sintesi

- L'asincronia fra il momento in cui viene trasferito l'embrione e il periodo della finestra d'impianto del paziente (che si è dimostrata variabile da un soggetto all'altro) può determinare un fallimento d'impianto
- Il test della recettività endometriale ERPeakSM consente di personalizzare il momento del trasferimento di embrione per aumentare la probabilità di efficacia dell'impianto
- Il test della recettività endometriale ERPeakSM è un test genomico
 - » Particolarmente sensibile e preciso
 - » Basato su profili di espressione genetica certificati
 - » Che offre risultati validati da uno studio di non inferiorità
- Risposte indipendenti dall'utente
 - » Modelli statistici avanzati e analisi ottimizzate garantiscono risultati indipendenti dall'utente
 - » Gli esiti forniscono indicazioni personalizzate sul trasferimento dell'embrione
- Consigliato per le pazienti che hanno subito frequenti fallimenti d'impianto e per le pazienti che hanno ricevuto ovociti donati

Introduzione

Durante il ciclo mestruale, l'endometrio subisce un rimodellamento tissutale, attraversa una fase proliferativa e secretiva, per poi sincronizzare la propria fisiologia con la funzione ovarica. Negli esseri umani, l'endometrio è più recettivo all'impianto di un embrione nell'arco di un breve periodo a metà della fase secretiva. Questo periodo è noto come finestra di impianto e si verifica tra il diciannovesimo e il ventunesimo giorno del naturale ciclo mestruale.¹ In tutte le altre fasi del ciclo, l'endometrio non è recettivo alla gravidanza.² Di conseguenza, affinché l'impianto risulti efficace, sono indispensabili non solo un embrione vitale e un endometrio recettivo, ma anche una perfetta sincronia tra i due.³

Infatti, la mancanza di sincronizzazione tra un embrione destinato all'impianto e il periodo di recettività endometriale è una delle cause dei ripetuti fallimenti d'impianto (RIF). Quindi è indispensabile individuare in anticipo e con precisione il periodo di recettività endometriale, in modo tale da aumentare l'efficacia dei trattamenti di riproduzione assistita. Non a caso, in seguito all'ottimizzazione del periodo di trasferimento di embrione, gli studi scientifici hanno rilevato un aumento significativo dei tassi di gravidanza, con percentuali fino al 73% in pazienti con RIF che si sono sottoposte al test della recettività endometriale.⁴

La storia dei test della recettività endometriale

L'interesse verso la recettività endometriale è vivo da diversi decenni⁵ ed è un campo che è stato esplorato inizialmente attraverso l'analisi istologica, finalizzata alla datazione endometriale, sebbene questo metodo in futuro si sarebbe rivelato poco preciso.⁶ È stato dimostrato che – come succede con la maggior parte dei tessuti corporei – i cambi fisiologici che interessano l'endometrio sono determinati dalla trascrizione genica differenziale. Nel corso del naturale ciclo mestruale, alcuni geni vengono sovraregolati o sottoregolati dagli ormoni e l'abbondanza e la composizione di tali trascrizioni genetiche in un momento determinato fornisce una firma genetica specifica. Tracciando la firma genetica di una biopsia endometriale, è possibile individuare con precisione il periodo fisiologico della finestra d'impianto del paziente.^{4,7}

Tecnologie per la misurazione delle firme genetiche

L'espressione genica dispone di un'ampia gamma dinamica, caratterizzata spesso da cinque ordini di grandezza tra i valori più alti e più bassi. Tutt'altro discorso è il calcolo dei cromosomi, che dispone di una gamma dinamica molto limitata. Esistono vari metodi per la misurazione accurata dell'espressione genica all'interno di un campione predeterminato, tra cui qPCR e NGS. È stato ampiamente dimostrato che la tecnica RT-qPCR possiede la gamma dinamica più ampia e i limiti di rilevabilità più bassi e fornisce la percentuale più bassa di risultati distorti.⁸

Qui presentiamo una piattaforma RT-qPCR ad alta produttività per una misurazione precisa e affidabile dell'espressione genica e l'individuazione del profilo trascrittomico in un campione endometrico: il test della recettività endometriale ERPeakSM.

Test della recettività endometriale ERPeakSM

Il test ERPeakSM è un test genomico che analizza il profilo di espressione genetica di un campione endometriale nel periodo di trasferimento di embrione previsto (es. 5 giorni dopo la somministrazione del progesterone; P+5). La capacità di individuare lo stato di recettività dell'endometrio consente agli specialisti della fecondazione in vitro di effettuare il trasferimento di embrione in un ciclo successivo, per tenere conto di un potenziale spostamento della finestra d'impianto.

Processo di sviluppo e convalida del test ERPeakSM

Individuazione del gene candidato (Figura 1)

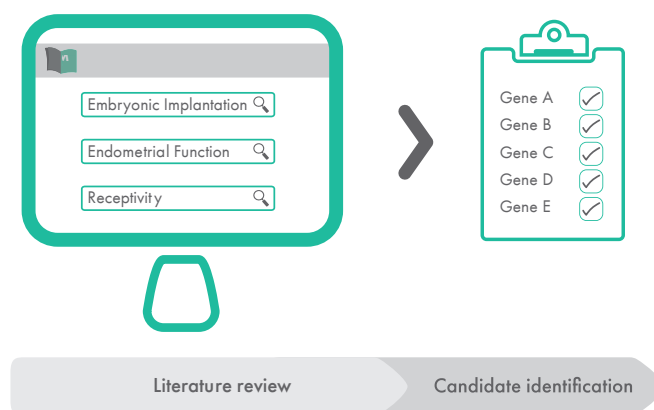
L'individuazione dei geni candidati è avvenuta attraverso un'accurata revisione della letteratura scientifica e dei database online, e le funzioni geniche potenziali sono state valutate secondo DAVID (the Database for Annotation and Integrated Discovery).⁹ Con tale approccio, sono stati individuati 184 geni candidati, potenzialmente informativi.¹⁰

Selezione del pannello genico (Figura 2)

Per affinare ulteriormente il pannello genico e valutare l'efficacia della tecnica RT-qPCR per la recettività endometriale, è stato condotto uno studio parallelo, pienamente autorizzato, volto a confrontare i profili di espressione genica delle donatrici sane con quelli delle pazienti sottoferti che stanno seguendo una terapia ormonale sostitutiva.

Sono state prelevate delle biopsie da donatrici sane (Gruppo A; n=96) a LH+2 e LH+7 e delle biopsie a pazienti subfertili (Gruppo B; n=120) a P+5.¹⁰ L'analisi delle suddette biopsie endometriali ha dimostrato che, dei 184 geni individuati in precedenza, 85 mostravano differenze significative nella variazione (fold change) all'interno dei gruppi di studio e sono stati selezionati per un'analisi più approfondita. Uno studio più approfondito di questi geni, attraverso l'analisi predittiva della funzione genica, conosciuta come ontologia genica,¹¹ ha dimostrato che tutti gli 85 geni influenzavano la

Figura 1: Individuazione del gene candidato



divisione e la proliferazione cellulare, la segnalazione e la risposta cellulare, l'organizzazione e la comunicazione extra cellulare, l'attività immunologica, la proliferazione vascolare, la regolazione della pressione sanguigna e l'impianto di embrione; di conseguenza lo studio ha confermato il legame diretto di tali geni con la recettività endometriale.

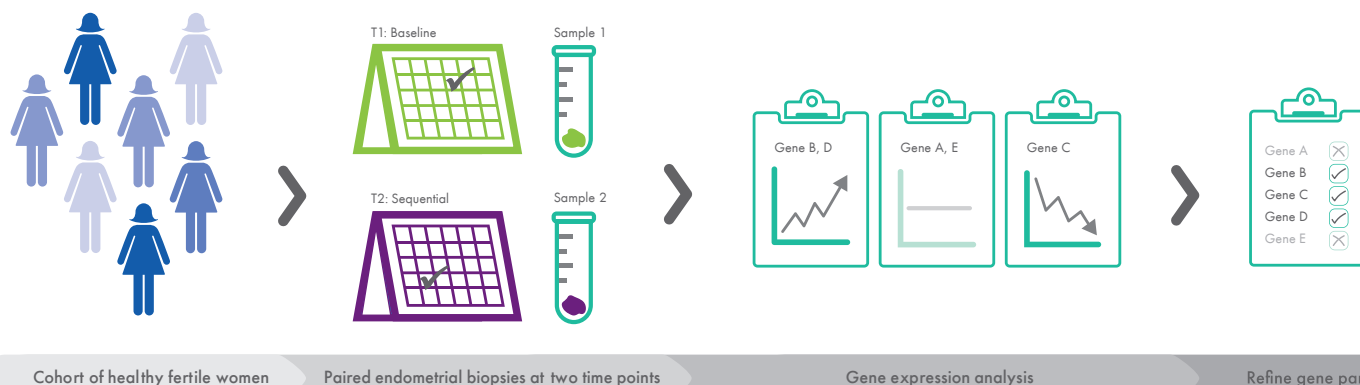
Per comprendere più a fondo le principali firme genetiche coinvolte, è stata condotta un'analisi delle componenti principali (PCA) degli 85 geni; l'esito ha rivelato che un sottogruppo dei suddetti geni spiegava più del 99,5% della variazione totale dei campioni nella valutazione dello stato di recettività dell'endometrio.¹⁰

Studio di non inferiorità (Figura 3)

Per valutare l'efficacia del test della recettività endometriale ERPeakSM è stato stilato un protocollo di ricerca esente da IRB, finalizzato alla esecuzione di uno studio di non inferiorità per paragonare i risultati all'attuale test clinico certificato. I soggetti idonei sono stati sottoposti a un test della recettività, all'interno di un programma clinico di cure, a cui le pazienti hanno acconsentito. Tutti i soggetti hanno ricevuto un identificatore unico, utilizzato per la comparazione dei risultati.

L'obiettivo principale dello studio di non inferiorità era quello di valutare l'efficacia del nuovo test della recettività endometriale

Figura 2: Processo di selezione del gene



ERPeakSM per descrivere lo stato di recettività dell'endometrio. Questo studio ha avuto come esito principale la valutazione dei tassi di concordanza tra il test ERPeakSM e l'attuale test clinico certificato, condotto sotto la supervisione medica.

CooperSurgical ha raccolto e analizzato un totale di 173 campioni di tessuto endometriale. I campi evidenziati in verde nella Figura 4 dimostrano la concordanza dei risultati tra gli esiti dell'attuale test clinico certificato e il test della recettività endometriale ERPeakSM.

Sulla base degli esiti e la presunzione di assoluta veridicità dei risultati del test clinico certificato, il test ERPeakSM ha dimostrato una percentuale di accuratezza pari al 92,4% e comprovate sensibilità e specificità pari al 90,0% (95%CI: rispettivamente 80,5– 95,9%) e 94,1% (87,5– 97,8%).

In aggiunta ai 173 campioni di tessuto endometriale raccolti e analizzati sopra, CooperSurgical ha raccolto e analizzato altri 8 campioni, che l'attuale test clinico certificato ha classificato con "RNA insufficiente", "RNA non valido" oppure "Nessun risultato". Di tali campioni, il test ERPeakSM di CooperGenomics ha classificato 5/8 dei campioni (62,5%) come "Pre-recettivi", "Recettivi", o "Post-recettivi", e 3/8 dei campioni (37,5%) con la dicitura "Nessun risultato" per indicare che la qualità del tessuto endometriale non era idonea (Figura 5).

Figura 3: Progettazione di uno studio di non inferiorità



Figura 4: Concordanza dei campioni tra il test della recettività endometriale ERPeakSM e il test clinico certificato

		Attuale test clinico certificato				
		Pre-recettivo	Recettivo iniziale	Recettivo	Recettivo avanzato	Post-recettivo
Test ERPeak SM	Pre-recettivo	56	6			
	Recettivo	6	24	59	12	1
	Post-recettivo					7
	Nessun risultato	1 *		1 *		

* Le Biopsie che non forniscono nessun risultato secondo il test ERPeakSM sono state escluse dai calcoli a causa di una qualità tissutale non idonea

Figura 5: Descrizione dettagliata dei risultati del campione "nessun risultato"

		Attuale test clinico certificato		
		RNA insufficiente	RNA non valido	Nessun risultato
Test ERPeak SM	Pre-recettivo	2		
	Recettivo		1	1
	Post-recettivo		1	
	Nessun risultato	2		1

Conclusione

Il test della recettività endometriale ERPeakSM è un test genomico che analizza il profilo di espressione genetica di una biopsia endometriale per valutare il momento più adatto per il trasferimento di embrione. Gli studi scientifici qui descritti mostrano un alto grado di concordanza con il test accettato in ambito medico.

Il test ERPeakSM ha una percentuale di accuratezza pari al 92,4% e comprovate sensibilità e specificità pari rispettivamente al 90,0% (95%CI: 80,5–95,9%) e al 94,1% (87,5–97,8%). È da sottolineare che anche gli attuali test clinici certificati, usati in questo studio come

comparatori, possiedono una specificità pari al 97% e una sensibilità del 90%. Di conseguenza, in caso di campioni discordanti, è difficile valutare quale test sia corretto, ammesso che uno dei due lo sia, a meno che non siano disponibili i dati degli esiti.

Sono in corso numerosi studi volti a monitorare il tempo di trasferimento di embrione e il risultato ostetrico; tali ricerche dovrebbero contribuire alla raccolta di nuovi dati sull'efficacia del test ERPeakSM. Il test della recettività endometriale ERPeakSM permette l'utilizzo di questi dati clinici in campo statistico per perfezionare l'efficacia del test; la continua raccolta di campioni clinici, dati di analisi ed esiti contribuirà a perfezionarlo periodicamente.

Bibliografia

1. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999;340:1796-1799
2. Garrido-Gómez T, et al. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril.* 2013;99:1078-1085
3. Teh WT, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:1419-1430
4. Ruiz-Alonso M, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2013;100:818-824
5. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* 1950;1:561-564
6. Coutifaris C, et al. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril.* 2004;82:1264-1272
7. Ruiz-Alonso M, et al. What a difference two days make: "personalized" embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study. *Hum Reprod.* 2014;29:1244-1247
8. Petek M. qPCR, Microarrays or RNA-sequencing: When to choose one over the other? Disponibile al seguente indirizzo: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-microarrays-rna-sequencing-choose-one/> (ultimo accesso: giugno 2019)
9. DAVID Bioinformatics Resource. Disponibile al seguente indirizzo: <https://david.ncifcrf.gov/> (ultimo accesso giugno 2019)
10. Enciso M, et al. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Hum Reprod.* 2018;33:220-228
11. The Gene Ontology Resource. Disponibile al seguente indirizzo: <http://geneontology.org/> (ultimo accesso giugno 2019)