

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 688**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008** **E 12193234 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 2562546**

54 Título: **Detección de marcadores de secreción endometrial para la evaluación de endometriosis**

30 Prioridad:

28.11.2007 EP 07384037

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

14.04.2015

73 Titular/es:

PROTEOMIKA, S.L. (50.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 504
48160 Derio (Bizkaia), ES y
ITF RESEARCH PHARMA, S.L.U. (50.0%)

72 Inventor/es:

NAGORE, DANIEL;
AMETZAZURRA, AMAGOIA;
MARTÍNEZ MARTÍNEZ, ANTONIO y
SIMÓN BUELA, LAUREANO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 533 688 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

Detección de marcadores de secreción endometrial para la evaluación de endometriosis

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a PPIA y a un grupo de otros biomarcadores y a un procedimiento *in vitro* no invasivo para el diagnóstico de endometriosis, además de al uso de secuencias de péptidos derivadas de biomarcadores seleccionados y al uso de un kit.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La endometriosis es una enfermedad crónica ginecológica dependiente de estrógenos definida como la presencia de células del estroma o glandulares endometriales fuera de la cavidad uterina (31). Las lesiones endometriósicas están lo más comúnmente localizadas en los ovarios, el peritoneo pélvico y los ligamentos uterosacros, pero pueden aparecer en casi cualquier parte del cuerpo (2). Aquellas lesiones pueden variar de un número pequeño de vesículas pegadas al peritoneo pélvico (estado mínimo o leve de la enfermedad) a la presencia de quistes ováricos endometriósicos, adhesiones pélvicas gruesas o endometriosis rectovaginal profunda (estado avanzado de la enfermedad). La gravedad de la endometriosis se clasifica según la clasificación de la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva* (ASRM) en cuatro etapas: I-Mínima, II-Leve, III-Moderada y IV-Grave.

La endometriosis afecta hasta el 10 % de las mujeres en edad fértil, siendo una causa importante de infertilidad (la incidencia en mujeres con infertilidad asciende hasta el 40 %). Otros síntomas comunes incluyen dismenorrea (dolor pélvico con la menstruación), dispareunia (dolor con la relación sexual) y dolor pélvico crónico (51).

A pesar de la identificación de la endometriosis a finales de 1800, la etiología y patogénesis de esta enfermedad todavía sigue sin estar clara (23). Se han propuesto varias teorías para explicar la patogénesis de esta enfermedad, pero la teoría más aceptada es la propuesta por Sampson sobre la menstruación retrógrada. Según esta teoría, las células endometriales se someten a reflujo mediante las trompas de Falopio durante la menstruación y se implantan sobre el peritoneo u órganos pélvicos. Pero la menstruación retrógrada es un fenómeno muy común entre mujeres en edad reproductiva (se produce en el 90 % de las mujeres) y solo el 10 % desarrollan endometriosis, por lo que debe haber otros factores que pueden contribuir a la patofisiología y/o patogénesis de la endometriosis. Se cree que la predisposición genética, factores medioambientales y alteraciones en las funciones inmunitarias y endocrinas desempeñan funciones significativas en el establecimiento y mantenimiento de la endometriosis.

Aunque los endometrios eutópicos de las mujeres con y sin endometriosis son histológicamente similares, los estudios revelaron que hay muchas diferencias entre estos dos tejidos. Se han identificado propiedades invasivas, disminución de la apoptosis, alteraciones en la expresión de gen específico y proteínas, y elevada producción de esteroides y citocinas en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (69).

Actualmente, la laparoscopia ofrece la técnica más específica y sensible para evaluar y monitorizar la endometriosis. Incluso así, la endometriosis microscópica u oculta puede diagnosticarse mal debido a la incapacidad de visualizar las lesiones (77). Además, se ha descrito que un tercio de todas las laparoscopias diagnósticas revelan endometriosis, un tercio no revela patología visible, y el tercio restante demuestra una variedad de otras afecciones ginecológicas. Así, dos tercios de todos los pacientes que se someten a este procedimiento de diagnóstico invasivo no tendrán endometriosis (17).

En realidad, el retraso promedio en el diagnóstico de esta enfermedad es 9,3 años (18). Los intentos de diagnóstico temprano y tratamientos de endometriosis se han agravado por carecer de procedimientos apropiados para estudiar y tratar la enfermedad. Además, la necesidad de procedimientos de diagnóstico no invasivos es evidente debido a que la laparoscopia es un procedimiento quirúrgico con riesgos potencialmente peligrosos, tales como lesión vascular o intestinal (33).

Por tanto, el análisis de la expresión diferencial de proteínas, usando enfoques proteómicos, en relación con la aparición de la enfermedad y progresión, conducirá al desarrollo de procedimiento no invasivos para el diagnóstico temprano de la enfermedad de endometriosis. Flores y col. (2007) desvelan biomarcadores para endometriosis.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un primer aspecto se refiere a un grupo de biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de endometriosis que comprende los biomarcadores ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PPIA, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDI, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o posttraduccionales, y combinaciones de los mismos.

Un segundo aspecto se refiere a un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende a) medir uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que se definen en la reivindicación 1 en una muestra de un individuo, y b) comparar las mediciones del uno o más biomarcadores en la muestra con la medición del uno o más biomarcadores en una muestra normal, en el que una alteración en la medición del uno o más biomarcadores en comparación con la medición del uno o más biomarcadores en la muestra normal es indicativa de endometriosis.

Un tercer aspecto se refiere a un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende a) medir una o más relaciones entre la cantidad de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que se definen en la reivindicación 1 en una muestra de un individuo y una o más proteínas de referencia independientemente seleccionadas del grupo que comprende proteínas constantemente expresadas y proteínas diferencialmente expresadas en la misma muestra, y b) comparar las relaciones del uno o más biomarcadores en la muestra con respecto a la una o más proteínas de referencia, en el que una alteración en la relación en la muestra en comparación con la relación en la muestra normal es indicativa de endometriosis.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende a) medir una o más relaciones entre dos o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que se definen en la reivindicación 1 en una muestra de un individuo, y b) comparar las relaciones obtenidas entre los dos o más biomarcadores en la muestra con las relaciones obtenidas entre los dos mismos o más biomarcadores en una muestra normal, en el que una alteración en las relaciones en la muestra en comparación con las relaciones en la muestra normal es indicativa de endometriosis.

Otro aspecto se refiere al uso de una o más secuencias de péptidos derivadas de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores descritos anteriormente empleados para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico (incluyendo la etapa o gravedad de la enfermedad), o pronóstico de endometriosis y para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

Otro aspecto al uso de una o más secuencias de nucleótidos o de péptidos derivadas de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores descritos anteriormente, en procedimientos para cribar, identificar, desarrollar y evaluar la eficiencia de compuestos para endometriosis.

Otro aspecto se refiere a un kit para realizar el procedimiento descrito anteriormente que comprende cualquier combinación de anticuerpos que específicamente reconoce uno o más biomarcadores y un vehículo en envase adecuado.

El alcance de la protección se define por las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un gel de imagen en gradiente 2D típico a pH 3-10 obtenido de una muestra de aspirado endometrial. El eje X representa la primera dimensión X, es decir, la separación por punto isoeléctrico, y el eje Y representa la segunda dimensión (SDS-PAGE), es decir, la separación por peso molecular.

La Figura 2 muestra las etapas del análisis de la imagen de la muestra de aspirado endometrial. A, imagen 2D de un gel de muestra de aspirado endometrial; B, manchas detectadas en la imagen A; C, manchas detectadas en el gel de referencia; D, ilustración distorsionada de la imagen A (procedimiento automático que corrige las diferencias entre geles como consecuencia del procedimiento experimental); E, ilustración de correspondencia manual entre la imagen A y el gel de referencia C (enlace entre manchas en la medida de lo posible en cada gel con las mismas manchas presentes en el gel de referencia).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un grupo que comprende 51 biomarcadores que son de valor significativo para la detección, diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de la endometriosis: Dichos biomarcadores son los siguientes:

ACTINA, CITOPLÁSMICA 2 (ACTG1) (P63261). Esta proteína, también llamada DFNA20 o gamma-actina, pertenece a la familia de las actinas. DFNA20 es un gen que causa sordera parcial dominante, no sindrómica, progresiva (45) debido a mutaciones de aminoácidos en dominios de actina altamente conservados, ya que se ha descrito que muchas de las mutaciones conocidas que producen sordera se producen en genes que interaccionan con actina (78). Un factor importante en la sordera producida por estas mutaciones es una capacidad alterada de los filamentos de actina para ser regulados apropiadamente por proteínas de unión a actina en vez de una incapacidad para polimerizarse (4).

ADENOSILHOMOCISTEINASA (SAHH, AHCY) (P23526), es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de las adenosilhomocisteinasas. Cataliza la rotura de S-adenosilhomocisteína (AdoHcy) a homocisteína y adenosina (68). Es un inhibidor competitivo de las reacciones de metil transferasa dependientes de S-adenosil-L-metionina; por tanto, puede desempeñar una función clave en el control de metilaciones mediante la regulación de la concentración intracelular de adenosilhomocisteína. Los defectos en AHCY son una causa de hipermetioninemia, una enfermedad caracterizada por

niveles elevados de metionina en los sueros.

ADENILOSUCCINATO SINTETASA (ADSS) (P30520), es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de la adenilosuccinato sintetasa. Desempeña una función importante en la ruta *de novo* de la biosíntesis del nucleótido purina. Esta enzima se inhibe por un metabolito de alanosina, un análogo de ácido aspártico que es altamente citotóxico para la mayoría de las células (10). En vertebrados hay dos isozimas de esta proteína, llamadas ADSS1 y ADD2. En cerdos se describe que el gen ADSS1 se expresa predominantemente en los tejidos del músculo estriado, mientras que el gen ADSS2 está ampliamente distribuido en todos los tejidos (35).

ADP-AZÚCAR PIROFOSFATASA (NUDT5) (Q9UKK9). Perteneciendo a la familia Nudix hidrolasa, esta proteína hidroliza ADP-ribosa, ADP-manosa y ADP-glucosa (76). También puede hidrolizar otros azúcares de nucleótido con menor actividad. Se expresa ampliamente, estando sobre todo en el hígado.

Se ha descrito recientemente que el óxido nítrico (NO) estimula la ADP-ribosilación no enzimática de NUDT5 usando ADP-ribosa y, por consiguiente, activa su actividad de ADP pirofosfatasa (75).

ALCOHOL DESHIDROGENASA (NADP+) (AK1A1) (P14550). Esta proteína pertenece a la familia de las aldo/ceto reductasas y cataliza la reducción dependiente de NADPH de una variedad de aldehídos a sus alcoholes correspondientes (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P14550>).

ALDEHÍDO DESHIDROGENASA 1A3 (AL1A3) (P47895). Esta proteína citoplásmica pertenece a la familia de la aldehído deshidrogenasa y participa en la biosíntesis del ácido retinoico (AR). Reconoce como sustratos retinal libre y retinal unido a la proteína de unión a retinol celular. Parece que es la enzima clave en la formación de un gradiente de de RA a lo largo del eje dorso-ventral durante el desarrollo temprano del ojo y también en el desarrollo del sistema olfativo.

Se expresa a bajos niveles en muchos tejidos y a mayores niveles en la glándula salival, estómago y riñón (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P47895>).

PRECURSOR DE ALFA-AMILASA 1 (AMY1) (P04745). Esta proteína secretada pertenece a la familia de la glucosil hidrolasa 13. Su actividad catalítica es la endohidrólisis de enlaces 1,4-alfa-D-glucosídicos en oligosacáridos y polisacáridos (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P04745>).

ANEXINA A1 (ANXA1) (P04083) es una proteína citoplásmica que se une a calcio/fosfolípido, que promueve la fusión de membranas y participa en la exocitosis. Esta proteína inhibe la actividad de fosfolipasa A2. Parece unirse de dos a cuatro iones calcio con alta afinidad.

Esta proteína participa en varios procesos biológicos tales como motilidad celular, antiapoptosis, transducción de señales ligada al receptor de la superficie celular, respuesta inflamatoria, crecimiento celular y diferenciación, proceso metabólico de los lípidos, fusión de vesículas, reticulación de péptidos, y en el proceso de la carcinogénesis (5, 36)

PRECURSOR DE LA APOLIPOPROTEÍNA A-1 (APOA1) (P02647) es una proteína secretada que pertenece a la familia de la apolipoproteína A1/A4/E. Participa en el transporte inverso de colesterol de tejidos al hígado para la secreción promoviendo la salida de colesterol de tejidos y actuando de cofactor para la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT). Es una proteína importante de la HDL plasmática, también encontrada en quilomicrones, y se sintetiza en el hígado y el intestino delgado.

Los defectos en APOA1 son una causa de deficiencia de lipoproteína de alta densidad tipo 2 (HDL2), de los niveles bajos de HDL observados en deficiencia de lipoproteína de alta densidad tipo 1 (HDL1) y de amiloidosis no neuropática sistémica (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P02647>).

BETA ACTINA (ACTB) (P60709) es una proteína citoplásmica, con una función molecular de unión a proteína. En vertebrados se han identificado 3 grupos principales de isoformas de actina, alfa, beta y gamma. Las actinas alfa se encuentran en tejidos de músculo y son un constituyente importante del aparato contráctil. Las actinas beta y gamma coexisten en la mayoría de los tipos de células como componentes del citoesqueleto y como mediadores de la motilidad celular interna (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P60709>).

PRECURSOR DE LA BETA-2-GLUCOPROTEÍNA 1 (APOH) (P02749), también llamada apolipoproteína H, es una proteína secretada (expresada por el hígado y secretada en el plasma). Se une a diversos tipos de sustancias negativamente cargadas tales como heparina, fosfolípidos y sulfato de dextrano. Puede prevenir la activación de la cascada intrínseca de la coagulación de la sangre uniéndose a fosfolípidos sobre la superficie de células dañadas (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P02749>).

2,3-BISFOSFOGLICERATO MUTASA (BPGM) (P07338) pertenece a la familia de la fosfoglicerato mutasa, subfamilia PGAM dependiente de BPG. Es una enzima expresada en eritroides y sintetiza 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), el modulador alostérico de la hemoglobina. Este ligando tiene una mayor afinidad por la hemoglobina adulta que por la

hemoglobina fetal y su unión diferencial facilita la transferencia de oxígeno entre sangre adulta y fetal reduciendo la afinidad de la hemoglobina adulta por oxígeno (52).

CATALASA (CAT) (P04040) es una enzima antioxidante que pertenece a la familia de la catalasa. Se localiza en el peroxisoma y sirve para proteger células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno.

- 5 Los defectos en CAT son la causa de la acatalasia, también conocida como acatalasemia. Esta enfermedad se caracteriza por ausencia de actividad de catalasa en glóbulos rojos y se asocia frecuentemente a lesiones orales ulcerantes (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P04040>).

Se considera que el estrés oxidativo participa en la patogénesis de muchos trastornos del aparato genital femenino (49).

- 10 **PROTEÍNA 4 DEL CANAL INTRACELULAR DE CLORURO (CLIC4) (Q9Y696)**, pertenece a la familia CLIC de canales de cloruro. Es una proteína citoplásmica, presente en un compartimento vesicular intracelular que probablemente representa vesículas de la red trans-Golgi. Está presente en tanto fracciones solubles como de membrana (1, 62). Su expresión es importante en el corazón, placenta y músculo esquelético. Funciona de canal de cloruro o un regulador o subunidad accesoria de otras proteínas que podrían proporcionar la función formadora de poros.

- 15 Se ha descrito que participa en una amplia variedad de acontecimientos celulares que incluyen secreción regulada, división celular y apoptosis (1). A medida que se une a diversas proteínas estructurales tales como tubulina o beta-actina, además de a dos isoformas de la proteína 14-3-3, podría asociarse a remodelación de la membrana celular y control de la forma de la célula (62). Adicionalmente, la expresión de CLIC4 está regulada por p53, TNFalfa y c-Myc. Se transloca al núcleo en condiciones de estrés celular, y CLIC4 nuclear está asociada a la detención del ciclo celular y apoptosis acelerada (63, 64).

- 20 **PROTEÍNA 94 QUE CONTIENE DOMINIO DE SUPERENROLLAMIENTO (CCDC94) (Q9BW85)**. No hay información referente a esta proteína.

- CITOSOL AMINOPEPTIDASA (AMPL) (P28838)**. Esta proteína citoplásmica es un homohexámero que pertenece a la familia de la peptidasa M17. Supuestamente participa en el procesamiento y renovación regular de proteínas intracelulares. Cataliza la eliminación de aminoácidos del extremo N sin sustituir de diversos péptidos (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P28838>).

- SUBUNIDAD BETA DE LA PROTEÍNA CON PROTECCIÓN DE F-ACTINA (CAPZB) (P47756)** se une de una manera independiente del Ca(2+) a los extremos de crecimiento rápido de filamentos de actina (extremo barbado), bloqueando así el intercambio de subunidades en estos extremos, y estabilizando los filamentos de actina. A diferencia de otras proteínas con protección (tales como gelsolina y severina), estas proteínas no cortan filamentos de actina.

- 30 Biológicamente, participa en la motilidad celular (22, 56).

CADENA PESADA DE FERRITINA (FRIH) (P02794). Esta proteína pertenece a la familia de la ferritina y contiene 1 dominio de dihierro similar a ferritina. Almacena hierro en una forma soluble, no tóxica, fácilmente disponible y es importante para la homeostasis del hierro. Tiene actividad de ferroxidasa: el hierro se recoge en la forma ferrosa y se deposita como hidróxidos férricos después de la oxidación.

- 35 La ferritina es un oligómero de 24 subunidades, siendo dos tipos de subunidades: cadena L (ligera) y cadena H (pesada). La cadena principal puede ser ligera o pesada, dependiendo de la especie y el tipo de tejido. La molécula funcional forma una vaina aproximadamente esférica con un diámetro de 12 nm y contiene una cavidad central en la que se deposita el núcleo de mineral hierro insoluble (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P02794>).

- 40 **CADENA LIGERA DE FERRITINA (FRIL) (P02792)** contiene 1 dominio de dihierro similar a ferritina y pertenece a la familia de la ferritina. Almacena hierro en una forma soluble, no tóxica, fácilmente disponible que es importante para la homeostasis del hierro. El hierro se recoge en la forma ferrosa y se deposita como hidróxidos férricos después de la oxidación. La ferritina está compuesta por 24 subunidades de las cadenas pesadas y ligeras. La variación en la composición de la subunidad de ferritina puede afectar las tasas de captación y liberación de hierro en diferentes tejidos.

- 45 Los defectos en esta proteína son la causa del síndrome hereditario de hiperferritinemia con cataratas (HHCS) y neuroferritinopatía, conocida como enfermedad de los ganglios basales de aparición en la edad adulta (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P02792>).

- 50 **FLAVINA REDUCTASA (BLVRB) (P30043)**. Esta proteína citoplásmica cataliza la transferencia de electrones de nucleótidos de piridina reducidos a flavinas, además de azul de metileno, pirroloquinolinaquinona, riboflavina, o metahemoglobina. Se ha sugerido una posible función de esta proteína en proteger las células del daño oxidativo o en regular el metabolismo del hierro. En el hígado, convierte la biliverdina en bilirrubina.

Se expresa predominantemente en hígado y eritrocitos, y a menores niveles en corazón, pulmón, glándula suprarrenal y cerebro (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P30043>).

Se ha descrito que se expresa en exceso en carcinoma bucal de células escamosas (39).

5 **GALECTINA-1 (LEG1) (P09382)**, también llamada lectina de unión a beta-galactósido. Esta proteína puede regular la apoptosis celular y diferenciación celular. Se expresa en músculo cardíaco, liso y esquelético, neuronas, timo, riñón, placenta y células hematopoyéticas. La galectina-1 puede unirse a varios glucoconjugados tales como la laminina de glucoproteínas de la membrana basal, y participa en muchos acontecimientos biológicos que incluyen adhesión celular (42). También se une a beta-galactósido, CD45, CD3 y CD4. Inhibe la actividad de fosfatasa de la proteína CD45 y, por tanto, la desfosforilación de Lyn cinasa.

10 Además, se ha descrito un aumento significativo en la expresión de esta proteína en células cancerosas en comparación con endometrio adyacente normal (70).

15 **GLUTATIÓN TRANSFERASA OMEGA-1 (GSTO1) (P78417)**. Esta proteína citoplásmica pertenece a la superfamilia de GST, familia omega. Presenta actividades de tior transferasa y deshidroascorbato reductasa dependiente de glutatión, y también cataliza la reducción de monometilarsinato, un producto intermedio en la ruta de biotransformación del arsénico (72). Se expresa ubicuamente, con la mayor expresión en hígado, músculo esquelético y corazón, y la menor expresión en cerebro, placenta y pulmón. GSTO1 también se ha ligado a la edad en la aparición de tanto enfermedades de Alzheimer como de Parkinson (72).

20 **GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GSTP1) (P09211)** es una proteína citoplásmica que pertenece a la superfamilia de GST, familia Pi, que son enzimas de fase II xenobióticas-desintoxicantes que catalizan la conjugación de glutatión reducido para un amplio número de electrófilos hidrófobos exógenos y endógenos, que incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), que están ampliamente presentes en el entorno humano y son conocidos por ser carcinogénicos (29).

Se ha sugerido una asociación entre la incidencia de la endometriosis y los genotipos GST de pacientes (28).

25 **PRECURSOR DE GLICODELINA (PAEP) (P09466)**, pertenece a la familia de la lipocalina y es secretado por el epitelio glandular del endometrio tras la estimulación por progesterona y por las vesículas seminales (48). Cuantitativamente, es la principal proteína sintetizada y secretada en el endometrio de la mitad de la fase lútea del ciclo menstrual y durante el primer semestre del embarazo (71).

30 Dependiendo del sitio de origen, el mismo esqueleto de proteína está glucosilado de diferentes formas, dando glicodelinas con diferentes acciones biológicas. Se encuentran al menos dos formas diferencialmente glucosiladas: la glicodelina-A derivada de endometrio humano (PAEP), con actividades anticonceptivas e inmunosupresoras, y la glicodelina-S del plasma seminal, cuya función todavía no se conoce (47, 57). Se ha descrito que la actividad inmunosupresora de PAEP es debida a su capacidad para inducir la apoptosis en linfocitos T activados, y que la actividad apoptótica requiere la presencia de residuos de ácido siálico sobre los glicanos complejos (46).

35 En relación con la endometriosis, se han descrito elevados niveles en suero de proteína PAEP en pacientes con endometriosis avanzada (32, 67), y se ha sugerido su función en promover la neovascularización y proliferación celular en el establecimiento de esta enfermedad (16).

LACTOILGLUTATIÓN LIASA (LGUL) (Q04760). Perteneciendo a la familia de la glioxalasa I, esta proteína participa en la ruta del glioxal que cataliza la conversión de hemimercaptal, formado a partir de metilglioxal y glutatión, en S-lactoilglutatión.

40 Existe en tres isoformas separables que se originan a partir de dos alelos en el genoma. Éstos se corresponden con dos homodímeros y un heterodímero compuesto de dos subunidades que muestran propiedades electroforéticas diferentes.

Se ha descrito que se expresan en exceso en tejidos tumorales, tales como tumores de ovario y colon (30, 53).

45 **PROTEÍNA BETA 1 DE CHOQUE TÉRMICO (HSPB1) (P04792)**. Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico pequeñas (HSP20). Su localización es citoplásmica en células de la interfase, se co-localiza con los husos mitóticos en células mitóticas y se transloca al núcleo durante el choque térmico. Participa en la resistencia al estrés (se expresa en respuesta a estreses medioambientales tales como choque térmico, o estimulación por estrógenos en células MCF-7) y organización de actina.

Los defectos en HSPB1 son la causa de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2F (CMT2F), el trastorno heredado más común del sistema nervioso periférico, y de neuropatía motora hereditaria distal (dHMN), una neuropatía periférica motora pura sin anomalías sensoriales.

50 En adultos se encuentra en varios tipos de células tales como mama, útero, cuello uterino, placenta, piel y plaquetas (9).

En carcinomas endometriales, su presencia está correlacionada con el grado de diferenciación tumoral. Adicionalmente, su expresión parece ser un factor de pronóstico negativo para cáncer gástrico (8) y se ha descrito que se expresa en exceso en carcinoma bucal de células escamosas (38).

SUBUNIDAD BETA DE HEMOGLOBINA (HBB) (Q9BX96). Esta proteína presente en glóbulos rojos pertenece a la familia de la globina y participa en el transporte del oxígeno del pulmón a los diversos tejidos periféricos. La proteína hemoglobina es un heterotetrámero, que consiste en dos cadenas alfa y dos beta en hemoglobina adulta.

Los defectos en HBB son la causa de beta-talasemia, cuyo distintivo es un desequilibrio en la producción de cadenas de globina en la molécula de hemoglobina adulta, y de anemia de células falciformes, caracterizada por glóbulos rojos anormalmente formados que producen anemia crónica y episodios periódicos de dolor, infecciones graves y daño a los órganos vitales (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P68871>).

INHIBIDOR DE LA ELASTASA DE LEUCOCITOS (LEI) (P30740) es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de la serpina, subfamilia Ov-serpina. Tiene actividad de inhibidor de endopeptidasa tipo serina, regulando la actividad de las proteasas de neutrófilos elastasa, catepsina G, proteinasa-3, quimasa, quimotripsina y calicreína-3 (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P30740>).

MOESINA (MSN) (P26038) es una proteína citoplásmica que participa en las conexiones de las principales estructuras citoesqueléticas a la membrana plasmática, regulando el citoesqueleto de actina, control de la forma de la célula, adhesión y motilidad, y modulación de rutas de señalización (27, 61).

Se ha descrito que mantiene la integridad de células epiteliales que antagonizan la actividad de Rho GTPasa pequeña (26).

En *Drosophila*, células que carece de moesina pierden las características epiteliales y adoptan comportamiento migratorio invasivo (60).

PEPTIDIL-PROLIL CIS-TRANS ISOMERASA A (PPIA) (P62937), también llamada ciclofilina A, es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de la PPIasa tipo ciclofilina, subfamilia PPIasa A. Contiene un dominio tipo ciclofilina de PPIasa y cataliza la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos imídicos de prolina en oligopéptidos. Las PPIasas aceleran el plegamiento de proteínas (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P62937>).

Se ha informado que esta proteína se expresa en exceso en células cancerosas, especialmente en tumores sólidos (7, 25).

FOSFOGLICERATO MUTASA 1 (PGAM1) (P18669) es una enzima de la ruta glucolítica que pertenece a la familia de la fosfoglicerato mutasa, subfamilia PGAM dependiente de BPG. Participa en la interconversión de 3- y 2-fosfoglicerato con 2,3-bisfosfoglicerato como cebador de la reacción. En tejidos de mamífero hay dos tipos de isozimas fosfoglicerato mutasa: tipo M en músculos y tipo B en otros tejidos, siendo la PGAM1 una proteína tipo B (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P18669>).

La Rho GTPasas, Rac y Cdc42, regulan la ruta glucolítica mediante Pak (quinasas activadas por p21), que interaccionan con PGAM1 y la inactivan (58).

FOSFOMEVALONATO CINASA (PMVK) (Q15126) se localiza en el peroxisoma. Cataliza una etapa clave en la biosíntesis de isoprenoide/esterol, convirtiendo el mevalonato 5-fosfato y ATP en mevalonato 5-difosfato y ADP (24).

A pesar de la importancia bien documentada de esta ruta en la causa y prevención de enfermedad humana y que es la raíz biosintética de una enorme y diversa clase de metabolitos, el mecanismo de la fosfomevalonato cinasa de cualquier organismo no está todavía bien caracterizado (50).

Se expresa en corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas, y a menor nivel en cerebro, placenta y pulmón.

PROTEÍNA DE UNIÓN 1 DE POLI(rC) (PCBP1) (Q15365) funciona de proteína de unión de ácido nucleico monocatenario que se une preferencialmente a oligo dC. Puede estar localizada tanto en el núcleo como el citoplasma. Se expresa abundantemente en músculo esquelético, timo y leucocitos de sangre periférica, mientras que se observa una menor expresión en próstata, bazo, testículos, ovarios, intestino delgado, corazón, hígado, glándulas suprarrenales y tiroides. Las proteínas de unión de poli(C) (PCBP) tienen funciones en la estabilización del ARNm, activación traduccional y silenciamiento traduccional, sugiriendo un conjunto complejo y diverso de rutas de control postranscripcionales (41).

PIRIDOXINA-5'-FOSFATO OXIDASA (PNPO) (Q9NVS9). Pertenecer a la familia de las piridoxamina 5'-fosfato oxidasa y oxida piridoxina 5'-fosfato (PNP) y piridoxamina 5'-fosfato (PMP) en piridoxal 5'-fosfato (PLP), una forma metabólicamente activa de la vitamina B6.

Los defectos en PNPO son la causa de deficiencia de piridoxina-5'-fosfato oxidasa (deficiencia de PNPO); también conocida como encefalopatía epiléptica neonatal relacionada con PNPO, cuya característica principal es la aparición en el plazo de horas desde el nacimiento de un grave trastorno convulsivo que no responde a fármacos anticonvulsivos y puede ser mortal. Las convulsiones pueden cesar con la administración de PLP, siendo resistente al tratamiento con piridoxina (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q9NVS9>).

SUBUNIDAD BETA DEL PROTEASOMA TIPO 3 (PSB3) (P49720). Esta proteína, localizada en tanto el núcleo como el citoplasma, pertenece a la familia de la peptidasa T1 B. El proteasoma está compuesto de al menos 15 subunidades no idénticas que forman una estructura en forma de anillo altamente ordenada. Su actividad catalítica es la escisión de enlaces peptídicos con especificidad muy ancha.

Se ha descrito que PSB3 se coexpresa con el oncogén ERBB2 en 34 biopsias de cáncer de mama, mapeando dentro de la misma localización cromosómica que el gen ERBB2 (15).

SUBUNIDAD REGULADORA DEL PROTEASOMA 26S NO ATPasa 7 (PSD7) (P51665). Esta proteína pertenece a la familia de la peptidasa M67A y actúa de subunidad reguladora del proteasoma 26S, que participa en la degradación dependiente de ATP de proteínas ubiquitinadas (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P51665>).

SUBUNIDAD REGULADORA DEL PROTEASOMA 26S NO ATPasa 10 (PSD10) (075832), también llamada p28 o gankirina, es un componente del complejo PA700. Actúa de subunidad reguladora del proteasoma 26S, que participa en la degradación dependiente de ATP de proteínas ubiquitinadas.

La gankirina aumenta la hiperfosforilación de Rb (proteína de retinoblastoma) y, por tanto, activa la síntesis de la transcripción dependiente de E2F de genes de la síntesis de ADN. Mediante la unión a Mdm2, aumenta la ubiquitinación y degradación de p53 y previene la apoptosis. Por tanto, es una nueva oncoproteína con potente función reguladora del ciclo celular y de propiedades apoptóticas. También se describe que se expresa en exceso pronto en hepatocarcinogénesis y en carcinomas hepatocelulares (11, 40, 43).

PROTEÍNA BETA/ALFA 14-3-3 (1433B) (P31946). Proteína citoplásmica. La isoforma alfa se diferencia de la isoforma beta en que está fosforilada.

PROTEÍNA GAMMA 14-3-3 (1433G) (P61981), también llamada proteína 1 inhibidora de la proteína cinasa C (KCIP-1), es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de las proteínas 14-3-3. Altamente expresada en el cerebro, músculo esquelético y corazón.

14-3-3 SIGMA (1433S) (P31947). La proteína citoplásmica secretada que se ha descrito es un inhibidor regulado por p53 de la progresión de G2/M.

Está presente principalmente en tejidos enriquecidos en epitelio queratinizante escamoso estratificado.

PROTEÍNA THETA 14-3-3 (1433T) (P27348) es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de la proteína 14-3-3. Se expresa abundantemente en cerebro, corazón y páncreas, y a menores niveles en riñón y placenta. Regulada por incremento en la médula espinal lumbar de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) esporádica en comparación con controles, con mayores niveles de expresión en individuos con participación predominante de las neuronas motoras inferiores.

PROTEÍNA ZETA/DELTA 14-3-3 (1433Z) (Q6P3U9) también llamada proteína 1 inhibidora de la proteína cinasa C, es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de las proteínas 14-3-3. La isoforma delta se diferencia de la isoforma zeta en que está fosforilada.

14-3-3 es una familia de proteínas ácidas altamente conservadas, compuesta de siete isoformas en mamíferos. Las proteínas 14-3-3 participan en la regulación de un gran espectro de rutas de señalización, que se unen a un gran número de componentes (puede interactuar con más de 200 proteínas diana) normalmente por reconocimiento de un motivo de fososerina o fosotreonina, produciendo la modulación de la actividad del componente de unión. Las proteínas diana incluyen factores de transcripción, enzimas biosintéticas, proteínas citoesqueléticas, moléculas de señalización, factores de apoptosis y supresores tumorales.

Las proteínas 14-3-3 controlan la progresión mediante el ciclo celular, iniciación y mantenimiento de los puntos de regulación del daño de ADN, crecimiento, diferenciación, supervivencia, apoptosis, migración y diseminación celular, activación de MAP cinasas, y coordinación de la señalización de integrinas y dinámica citoesquelética. Se ha descrito una función de proteínas 14-3-3 en enfermedad humana, particularmente cáncer (13, 44, 73).

INHIBIDOR DE LA DISOCIACIÓN DE Rho GDP (GDI) ALFA, ARHGDI (P52565) es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de Rho GDI. Regula la reacción de intercambio de GDP/GTP de las proteínas Rho (que participan en la regulación del ciclo celular) inhibiendo la disociación de GDP de ellas, y la posterior unión de GTP a ellas (12, 14).

La forma unida a GDP complejada con Rho GDI no está activada por el factor de intercambio GDP/GTP.

Se ha descrito que Rho GDI interacciona directamente con el sistema de ezrina/radixina/moesina (ERM), que participa en la reorganización de los filamentos de actina (65).

Adicionalmente, se ha mostrado que la Rho GDI alfa se expresa en exceso en múltiples tipos de tumores tales como cáncer de ovario y de mama (54).

INHIBIDOR 2 DE LA DISOCIACIÓN DE Rho GDP (GD15) (P52566). Esta proteína citoplásmica pertenece a la familia de Rho GDI, y regula la reacción de intercambio de GDP/GTP de las proteínas Rho inhibiendo la disociación de GDP de ellas, y la posterior unión de GTP a ellas. Las proteínas Rho ciclan entre las formas inactivas unidas a GDP y las formas activas unidas a GTP (que reciben señales aguas arriba mediante sus reguladores y que transducen señales para dianas aguas abajo).

Se sabe que la familia Rho regula principalmente la reorganización del citoesqueleto de actina, y que el sistema de Rho GDI desempeña una función importante en la determinación espacial en el control citoesquelético de actina (55).

Se ha descrito recientemente que el inhibidor 2 de la disociación de Rho GDP se expresa en exceso en carcinoma bucal de células escamosas (37).

RIBOSA-FOSFATO PIROFOSFOCINASA II (PRPS2) (P11908). Pertenecer a la familia de la ribosa-fosfato pirofosfoquinasa, y cataliza la siguiente reacción: $ATP + D\text{-ribosa } 5\text{-fosfato} = AMP + 5\text{-fosfo-}\alpha\text{-D-ribosa } 1\text{-difosfato}$. Se activa por magnesio y fosfato inorgánico, y se inhibe competitivamente o no competitivamente por ADP, 2,3-bisfosfoglicérido o GDP (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P11908>).

SEPTINA-11 (SEP11) (Q9NVA2). Esta proteína que pertenece a la familia de la septina puede ensamblarse en una proteína multicomponente. Las septinas son una familia de proteínas GTPasas citoesqueléticas conservadas que participan en diversos procesos que incluyen tráfico de vesículas, apoptosis, remodelación del citoesqueleto, infección, neurodegeneración y neoplasia (20, 21).

Con referencia a situaciones patológicas, una aberración cromosómica que implica SEPT11 puede ser una causa de leucemia neutrófila crónica. También se ha descrito que la perturbación de la expresión de septina se extiende en enfermedad y tumores de diversos tejidos (19).

PROTEÍNA SERINA/TREONINA CINASA Nek7 (NEK7) (Q8TDX7) es una proteína citoplásmica que pertenece a la familia de la proteína Ser/Thr cinasa, subfamilia NIMA (nunca en el gen de la mitosis a). Contiene 1 dominio de proteína cinasa.

Se expresa altamente en pulmón, músculo, testículos, cerebro, corazón, hígado, leucocito y bazo. Tiene menor expresión en ovarios, próstata y riñón, y no se ha observado expresión en intestino delgado (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q8TDX7>).

Los miembros de la familia de cinasas relacionadas con NIMA (NRK) son reguladores fundamentales de diversos aspectos del ciclo celular. La proteína Nek7 está enriquecida en el centrosoma de un modo independiente de microtúbulos y su expresión anómala produce defectos de la morfología celular y progresión mitótica (74).

ÁCIDO SIÁLICO SINTASA (SAS) (Q9NR45) es una proteína citoplásmica con actividad de N-acilneuraminato citidililtransferasa y especificidad de tejido ubicua. Produce ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonónico (KDN). También puede usarse 6-fosfato de N-acetilmanosamina y 6-fosfato de manosa como sustratos para generar formas fosforiladas de Neu5Ac y KDN, respectivamente (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q9NR45>).

Los ácidos siálicos son una familia de alfa-cetoácidos de nueve carbonos que desempeñan una amplia variedad de funciones biológicas en la naturaleza. En mamíferos, se encuentran en los extremos distales de los glucoconjugados de la superficie celular, y así son determinantes importantes del reconocimiento celular y acontecimientos de adhesión (66).

PROTEÍNA TUMORAL TRADUCCIONALMENTE CONTROLADA (TCTP) (P13693). Esta proteína citoplásmica pertenece a la familia de TCTP, y participa en la unión de calcio y estabilización de microtúbulos. Se encuentra en varias células sanas y tumorales que incluyen eritrocitos, hepatocitos, macrófagos, plaquetas, queratinocitos, células de eritroleucemia, gliomas, melanomas, hepatoblastomas y linfomas, pero no puede detectarse en riñón y carcinoma de células renales (RCC). Se expresa en placenta y próstata.

Esta proteína evolutivamente altamente conservada participa en muchas funciones celulares tales como crecimiento celular, progresión del ciclo celular, transformación maligna y en la protección de células contra diversas condiciones de estrés y apoptosis. Además, se ha establecido una función similar a citocina extracelular para TCTP (3, 6).

CADENA BETA DE TUBULINA (TBB5) (P07437). Esta proteína pertenece a la familia de la tubulina, siendo la tubulina el principal constituyente de los microtúbulos. La tubulina es un dímero de las cadenas alfa y beta, y une dos moles de GTP, uno en un sitio intercambiable sobre la cadena beta y uno en un sitio no intercambiable sobre la cadena alfa.

Esta proteína se expresa ubicuamente a los mayores niveles en bazo, timo y cerebro inmaduro (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/P07437>).

DOMINIO 1 DE REPETICIÓN DE WD (WDR1) (075083), también llamado proteína 1 de interacción con actina (AIP1), pertenece a la familia AIP1 de repetición de WD. Está localizada en el citoplasma, en el citoesqueleto. Induce el desensamblaje de filamentos de actina conjuntamente con las proteínas de la familia de ADF/cofilina, y su deficiencia produce defectos en la dinámica de actina (34).

Se ha descrito la expresión en exceso de WDR1 como resultado de la muerte de células apoptóticas inducida por estaurosporina en la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano (59).

Físicamente y funcionalmente interacciona con la caspasa-11, una caspasa pro-inflamatoria de mamífero que regula la migración de células durante la inflamación (34).

La presente memoria descriptiva también proporciona un procedimiento *in vitro* no invasivo sensible, eficaz y rápido para diagnosticar y monitorizar la endometriosis usando aspirados endometriales o suero como muestras biológicas. La endometriosis puede detectarse analizando el patrón de expresión de uno o más biomarcadores de endometriosis en el aspirado endometrial o suero. Así, la detección de al menos una proteína diferencialmente expresada en una muestra de prueba de aspirado endometrial o muestra de suero de una mujer con endometriosis en comparación con una muestra de aspirado endometrial sano o suero es indicativa de endometriosis.

La normalización es esencial para explicar diferencias en la concentración de proteína total y para eliminar el sesgo de muestra a muestra. Los niveles de expresión de una proteína de control, cuyo contenido en muestra endometrial o suero es siempre constante, pueden usarse para normalizar los niveles de señales.

En un ejemplo, la etapa a) comprende medir al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que se ha definido anteriormente.

En un ejemplo, la etapa a) comprende medir al menos tres biomarcadores seleccionados del grupo que se ha definido anteriormente.

En un ejemplo, la etapa a) comprende medir al menos cuatro biomarcadores seleccionados del grupo que se ha definido anteriormente.

En un ejemplo, la etapa a) comprende medir 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ó 51 biomarcadores seleccionados del grupo que se ha definido anteriormente.

En un ejemplo, el procedimiento se usa para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico (incluyendo la etapa o gravedad de la enfermedad), o pronóstico de endometriosis o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

En un ejemplo, la muestra de un individuo es aspirado endometrial o suero.

En un ejemplo, la muestra que va a analizarse se obtiene de un individuo no previamente diagnosticado con endometriosis.

En un ejemplo, la muestra que va a analizarse se obtiene de un individuo que se ha diagnosticado previamente con endometriosis.

En un ejemplo, la muestra que va a analizarse se obtiene de un individuo que recibe tratamiento contra endometriosis.

En un ejemplo, el procedimiento comprende obtener un extracto de proteínas de la muestra.

En un ejemplo, la medición de los biomarcadores comprende una primera etapa, en la que el extracto de proteínas de la muestra se pone en contacto con una composición de uno o más anticuerpos específicos, contra uno o más epítopes de la proteína o proteínas, y una segunda etapa, en la que se cuantifican los complejos formados por los anticuerpos y las proteínas.

En un ejemplo, dichos anticuerpos son humanos, humanizados o de origen no humano y se seleccionan de anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos intactos o recombinantes de anticuerpos, combicuerpos y fragmentos Fab o

scFv de anticuerpos.

En un ejemplo, para la detección o cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y proteínas, las técnicas usadas están seleccionadas de transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitiva (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (sándwich de doble anticuerpo-ELISA), técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, tecnología de matrices de anticuerpos en suspensión basada en microesferas y citometría de flujo, ensayos basados en la precipitación de oro coloidal en formatos tales como tiras reactivas; o por técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

En un ejemplo, el kit se usa para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico (incluyendo la etapa o gravedad de la enfermedad), o pronóstico de endometriosis o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

Para los fines de la presente invención se han usado las siguientes definiciones:

El término "conjuntos de proteínas de la invención" se refiere al grupo de proteínas que comprende ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PPIA, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDIA, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1.

El término "individuo" se refiere a todas las especies de animales clasificadas como mamíferos e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, y preferentemente se refiere a un ser humano femenino de cualquier edad o raza.

El término "endometriosis" se refiere a la enfermedad que normalmente se caracteriza por la presencia de células del estroma o glandulares endometriales fuera de la cavidad uterina.

El término "aspirado endometrial" se refiere a un aspirado de líquido endometrial (no lavado uterino), también denominado un aspirado de la secreción uterina en la cavidad uterina.

El término "muestra normal" se refiere a una muestra obtenida de un individuo libre de endometriosis.

El término "proteínas diferencialmente expresadas" se refiere a aquellas proteínas que se expresan diferencialmente en el aspirado endometrial o suero de una paciente con endometriosis y en el aspirado endometrial o suero de una mujer sin endometriosis. Aquellas proteínas incluyen los 51 biomarcadores seleccionados del grupo que comprende ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PPIA, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDIA, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1, además de cualquier proteína de un aspirado endometrial o muestra de suero, cuya cuantificación está alterada cuando se comparan dos muestras de aspirado endometrial o de suero diferentes, una de un individuo sano y una de un paciente con endometriosis.. El término "proteína diferencialmente expresada" puede referirse tanto a una proteína expresada en exceso como a una proteína reprimida.

El término "biomarcador de endometriosis" se refiere a cada una de las "proteínas diferencialmente expresadas" en el aspirado endometrial o suero de una paciente con endometriosis y en el aspirado endometrial o suero de una mujer sin endometriosis, cuya presencia/ausencia y/o cuantificación puede distinguir entre pacientes con endometriosis y sin endometriosis.

El término "proteínas constantemente expresadas" se refiere a aquellas proteínas que se expresan igualmente en el aspirado endometrial o suero de una paciente con endometriosis y en el aspirado endometrial o suero de un control sin endometriosis.

El término "inversamente expresadas" se refiere a dos proteínas diferencialmente expresadas cuyos patrones de expresión son opuestos (es decir, en una muestra una se expresa en exceso mientras que la otra está reprimida o viceversa).

El término "etapa I de la endometriosis" se refiere a un individuo que padece endometriosis mínima según la clasificación de la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva* (ASRM)

El término "etapa II de la endometriosis" se refiere a un individuo que padece endometriosis leve según la clasificación de la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva* (ASRM)

El término "etapa III de la endometriosis" se refiere a un individuo que padece endometriosis moderada según la clasificación de la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva* (ASRM)

El término “etapa IV de la endometriosis” se refiere a un individuo que padece endometriosis grave según la clasificación de la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva* (ASRM)

El término “tratamiento” se refiere a cualquier procedimiento, acción, aplicación o similares, en el que un individuo se somete a ayuda médica con el objetivo de mejorar su afección, directamente o indirectamente.

5 El término “cirugía” se refiere al procedimiento de eliminar las lesiones endometriósicas.

El término “diagnóstico” de la endometriosis se refiere al procedimiento de identificar o determinar la naturaleza y etapa de la endometriosis mediante la evaluación de uno o más biomarcadores de la endometriosis.

10 El término “especificidad” se refiere a la capacidad de una prueba para excluir la presencia de una enfermedad cuando no está verdaderamente presente. La especificidad es la proporción de pacientes no enfermos para los que hay una prueba negativa correcta, expresada como el número de negativos verdaderos dividido entre la suma de negativos verdaderos y positivos falsos.

15 El término “sensibilidad” se refiere a la capacidad de una prueba para detectar una enfermedad cuando está verdaderamente presente. La sensibilidad es la proporción de todos los pacientes enfermos para los que hay una prueba positiva, determinada como el número de positivos verdaderos dividido entre la suma de los positivos verdaderos y negativos falsos.

El término “gen” se refiere a una región de una cadena molecular de desoxirribonucleótidos que codifica una proteína y puede representar una porción de una secuencia codificante o una secuencia codificante completa.

20 El término “proteína” se refiere a al menos una cadena de aminoácidos molecular unida intermolecularmente mediante tanto enlaces covalentes como no covalentes. El término incluye todas las formas de modificaciones de proteína postraduccionales, por ejemplo, glucosilación, fosforilación o acetilación.

Los términos “péptido” y “polipéptido” se refieren a cadenas de aminoácidos moleculares que representan un fragmento de proteína. Los términos “proteína” y “péptido” se usan indistintamente.

25 El término “anticuerpo” se refiere a una proteína con forma de Y (conocida como inmunoglobulina) sobre la superficie de linfocitos B que es secretada en la sangre o linfa en respuesta a un estímulo antigénico, tal como una proteína exógena, bacteria, virus, parásito u órgano trasplantado, y que presenta una actividad de unión específica por una molécula diana llamada un “antígeno”. La región de unión al antígeno de inmunoglobulinas puede dividirse en tanto fragmentos F(ab')₂ como Fab. El término “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales y policlonales, tanto fragmentos intactos como derivados de ellos; e incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de origen no humano. Un “anticuerpo no humano” es un anticuerpo generado por una especie animal distinta de *Homo sapiens*. Un “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo genéticamente manipulado en el que la parte de ratón mínima de un anticuerpo murino está fusionada con un anticuerpo humano. Generalmente, los anticuerpos humanizados son 5-10 % de ratón y 90-95 % humanos. Un “anticuerpo humano” es un anticuerpo derivado de ratones transgénicos que lleva genes de anticuerpo humano o de células humanas. Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones de anticuerpos altamente específicos homogéneas dirigidas contra un único sitio antigénico o “determinante” de la molécula diana. “Anticuerpos policlonales” incluyen poblaciones de anticuerpos heterogéneos que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos de la molécula diana.

El término “anticuerpo específico” se refiere a un anticuerpo generado contra una proteína específica (en este caso contra un marcador de endometriosis particular).

40 El término “complejo formado por los anticuerpos” se refiere a un complejo formado por un antígeno y su anticuerpo específico.

El término “combicuerpo” (anticuerpo combinatorio) se refiere a un anticuerpo expresado sobre fagos filamentosos, que permite el cribado directo de bibliotecas de ADNc para la expresión de anticuerpos reactivos de la superficie celular, sin la necesidad de producción y purificación de anticuerpos usando bacterias o sistemas de células eucariotas.

45 El término “anticuerpo recombinante Fab” se refiere a un anticuerpo recombinante que solo contiene el fragmento Fab que es univalente y útil cuando el anticuerpo tiene una avidéz muy alta por su antígeno. Puede obtenerse recombinantemente si se conoce la secuencia de proteínas.

El término “fragmento de anticuerpo scFv” se refiere a un fragmento variable monocatenario (scFv) que puede expresarse en cultivos bacterianos.

50 El término “epítipo” se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que reconoce un anticuerpo específico. Tales epítipes pueden comprender un estiramiento contiguo de

aminoácidos (epítipo lineal) o de aminoácidos no contiguos que se ponen en proximidad entre sí en virtud del plegamiento tridimensional de la cadena de polipéptidos (epítipos discontinuos).

El término “fase sólida”, como se usa en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que el anticuerpo puede unirse. Ejemplos de materiales para la fase sólida incluyen, pero no se limitan a, vidrio, polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamida, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. Ejemplos de formas en fase sólida son el pocillo de una placa o una columna de purificación.

El término “tira reactiva” se refiere a un dispositivo sumergido en un líquido para realizar algún tipo de prueba que podría ser de cantidad o de las propiedades químicas del líquido. Este tipo de tira reactiva está normalmente hecho de papel o cartón y se impregna con reactivos cuyos cambios de color indican alguna característica del líquido.

El término “vehículo” se refiere a un mecanismo o dispositivo por el que algo se transporta o conduce.

El término “envase” se refiere a la contención y embalaje antes de la venta con el fin primario de facilitar la compra y uso de un producto.

El término “biochip” se refiere a un conjunto de sitios de prueba miniaturizados (micromatrices) dispuestos sobre un sustrato sólido que permite realizar muchas pruebas al mismo tiempo con el fin de lograr mayor rendimiento y velocidad.

Un ejemplo se refiere a un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende la cuantificación de una o más relaciones entre dos proteínas diferentes seleccionadas de estos conjuntos de proteínas en un aspirado endometrial o suero de un individuo.

Otro ejemplo se refiere a un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende la cuantificación de una o más relaciones entre dos proteínas diferentes seleccionadas de estos conjuntos de proteínas en un aspirado endometrial o muestra de suero de un individuo, en el que las dos proteínas diferentes se expresan inversamente.

En otro ejemplo, la etapa de desarrollo de la enfermedad de endometriosis se determina por la determinación cuantitativa de una o más proteínas seleccionadas de estos conjuntos de proteínas tanto solas como en combinación en la misma muestra.

En otro ejemplo, el procedimiento permite determinar la progresión de la enfermedad cuando la misma proteína se compara en diferentes muestras obtenidas en momentos diferentes.

En otro ejemplo, puede usarse una o más proteínas seleccionadas de estos conjuntos de proteínas para monitorizar la eficacia de otro tratamiento farmacológico o quirúrgico.

En otro ejemplo, la detección y/o cuantificación de una o más de la proteína o proteínas comprende una primera etapa, en la que el extracto de proteínas de la muestra se pone en contacto con una composición de uno o más anticuerpos específicos, contra uno o más epítipos de la proteína o proteínas, y una segunda etapa, en la que los complejos formados por los anticuerpos y las proteínas se cuantifican.

En otro ejemplo, los anticuerpos específicos usados para la detección de una o más proteínas seleccionadas de estos conjuntos de proteínas son humanos, humanizados o de origen no humano y se seleccionan de anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos intactos o recombinantes de anticuerpos, combicuerpos y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos.

En otro ejemplo, las técnicas se usaron para la detección y/o cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y proteínas, las técnicas usadas están seleccionados del grupo comprendido por: transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (sándwich de doble anticuerpo-ELISA), técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, tecnología de matrices de anticuerpos en suspensión basada en microesferas y citometría de flujo, ensayos basados en la precipitación de oro coloidal en formatos tales como tiras reactivas; o por técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

Otro ejemplo se refiere al uso de una o más secuencias derivadas de una o más proteínas seleccionadas de estos conjuntos de proteínas para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico (incluyendo la etapa), y/o pronóstico de endometriosis y/o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad y/o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

Otro ejemplo se refiere al uso de una o más secuencias de nucleótidos o de péptidos derivadas de una o más proteínas seleccionadas de los conjuntos de proteínas, solos o en cualquier combinación, en procedimientos para cribar, identificar, desarrollar y evaluar la eficiencia de otros compuestos para endometriosis, en el que las proteínas están presentes en

aspirado endometrial o suero.

Otro ejemplo se refiere a un kit para realizar un procedimiento como se ha definido previamente que comprende cualquier combinación de anticuerpos que reconoce específicamente una o más de estas proteínas y un vehículo en envase adecuado, empleándose el kit para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico (incluyendo la etapa), y/o pronóstico de endometriosis y/o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad y/o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

Hay una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y/o cuantificar la formación de complejos de antígeno-anticuerpo específicos; previamente se han descrito numerosos ensayos de unión a proteína competitivos o no competitivos y un gran número de éstos están comercialmente disponibles. Por tanto, pueden cuantificarse una o más proteínas seleccionadas de los conjuntos de proteínas con anticuerpos tales como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, tanto fragmentos intactos como recombinantes de estos, combicuerpos y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos para una o más proteínas seleccionadas de los conjuntos de proteínas; estos anticuerpos son humanos, humanizados o de origen animal. Los anticuerpos usados en estos ensayos pueden estar marcados o sin marcar; los anticuerpos pueden usarse en un amplio intervalo de ensayos. Moléculas de marcador que pueden usarse para marcar anticuerpos incluyen radionúclidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados. Cuanto mayor sea la especificidad de unión del anticuerpo, menor será la concentración de antígeno que puede detectarse.

Hay una amplia variedad de ensayos muy conocidos para aquellos expertos en la materia que puede usarse, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la membrana de Western o transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (sándwich de doble anticuerpo-ELISA), técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, tecnología de matrices de anticuerpos en suspensión basada en microesferas y citometría de flujo o precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas para detectar y/o cuantificar una o más proteínas seleccionadas de los conjuntos de proteínas incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina. Se prefieren micromatrices de proteínas, matrices de anticuerpos en suspensión y sándwich de doble anticuerpo-ELISA (DAS-ELISA). En estos inmunoensayos puede usarse cualquier anticuerpo, o combinación de anticuerpos, que son específicos contra uno o más epítopes de los conjuntos de proteínas. Como un ejemplo de uno de los muchos posibles formatos de este ensayo, un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos anticuerpos que reconocen uno o más epítopes de los conjuntos de proteínas, están unidos a la superficie de un soporte de fase sólida y puestos en contacto con la muestra que va a analizarse e incubarse durante un tiempo específico y en condiciones apropiadas para formar los complejos de antígeno-anticuerpo. Después de lavar en condiciones apropiadas para eliminar complejos no específicos, un indicador reactivo, que consiste en un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos y que reconoce uno o más epítopes de los conjuntos de proteínas de la invención, unido a una molécula generadora de señales, se incuba con los complejos de antígeno-anticuerpo en condiciones apropiadas de tiempo y temperatura. La presencia de la una o más proteínas seleccionadas de los conjuntos de proteínas en la muestra que va a analizarse se detecta y, si están presentes, se cuantifican y la señal generada se mide. La cantidad de una o más proteínas seleccionadas de los conjuntos de proteínas en la muestra que va a analizarse es proporcional a estas señales.

Como se indica anteriormente, el procedimiento implica monitorizar la etapa de endometriosis cuantificando las proteínas diferencialmente expresadas solubles dentro de un aspirado endometrial o muestra de suero mediante anticuerpos específicos. Como será apreciado por aquellos expertos en la materia, se contempla cualquier medio para identificar y cuantificar específicamente estas proteínas.

En la siguiente descripción, se desvela el procedimiento usado para obtener y analizar el contenido de proteína total de muestras de aspirado endometrial humanas. El procedimiento implica la recogida y procesamiento de muestras, el uso de electroforesis 2D para separar proteínas dentro de la muestra, el análisis de imágenes de los proteomas obtenidos de cada muestra para comparar las proteínas que están presentes, análisis estadístico de los niveles de expresión de las proteínas de las muestras, identificación de las proteínas diferencialmente expresadas (proteínas estadísticamente significativas) y el uso de una o más de las proteínas diferencialmente expresadas para generar anticuerpos específicos de proteína que van a usarse como marcadores de endometriosis. También se describirán aquellos procedimientos de validación de biomarcadores y el desarrollo final de un kit para un diagnóstico no invasivo de endometriosis.

Se realizó análisis de proteomas comparativo entre muestras de aspirado endometrial obtenidas de individuos sanos (controles) y pacientes de individuos sanos (controles) y pacientes diagnosticados con endometriosis (I: mínima, II: leve, III: moderada, IV: grave) en un intento por identificar proteínas diferencialmente expresadas en las diversas etapas de endometriosis (sanos frente a endometriosis I-II frente a endometriosis III-IV). Las proteínas que mostraron expresión

diferencial se identificaron por huellas de masas peptídicas usando espectrometría de masas y búsqueda de base de datos.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por los datos obtenidos de los experimentos.

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA USADA

- 5 Para identificar proteínas diferencialmente expresadas en enfermedad de endometriosis, se compararon perfiles de proteínas de mujeres diagnosticadas con endometriosis con perfiles de proteínas de mujeres con un diagnóstico de no endometriosis usando enfoques proteómicos.

Población estudiada

- 10 La muestra usada en la presente invención se refiere a un aspirado del fluido endometrial (no lavado uterino), también denominado un aspirado de la secreción uterina en la cavidad uterina, de mujeres que han sido diagnosticadas con endometriosis, además del aspirado obtenido de mujeres sanas.

Con el fin de incluir muestras en el estudio, se han establecido algunos criterios de inclusión y de exclusión:

Pacientes

Criterios de inclusión:

- 15 1. Mujeres de 18 a 45 años
2. Pacientes quirúrgicamente diagnosticados por laparoscopia
3. Endometriosis de etapa I-IV
4. Ciclos regulares (24-35 días)
5. Recogida de muestras en la fase secretora (LH+4/+12)
20 6. Consentimiento firmado

Criterios de exclusión:

1. Otras patologías ginecológicas (cáncer de ovario o endometrial, hidrosálpinx, etc...)
2. Tratamiento hormonal durante los 3 meses previos a la recogida de muestras

Controles

25 Criterios de inclusión:

1. Mujeres de 18 a 45 años
2. Pacientes quirúrgicamente diagnosticados por laparoscopia
3. Sin evidencia quirúrgica de endometriosis
4. Ciclos regulares (24-35 días)
30 5. Recogida de muestras en la fase secretora (LH+4/+12)
6. Consentimiento firmado

Criterios de exclusión:

1. Otras patologías ginecológicas (cáncer de ovario o endometrial, hidrosálpinx, etc...)
2. Tratamiento hormonal durante los 3 meses previos a la recogida de muestras

- 35 Las muestras de aquellas mujeres se obtuvieron de hospitales de la red sanitaria española y centros de fertilidad, y se clasifican del siguiente modo (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de las muestras usadas en el análisis de imágenes.

	Número de imágenes obtenidas
Control sano	32
Endometriosis I	9
Endometriosis II	5
Endometriosis III	13
Endometriosis IV	19
Total	78

Se agruparon las etapas de la endometriosis I y II, además de las etapas de la endometriosis III y IV, teniendo un total de tres grupos para comparar: 32 controles sanos frente a 14 endometriosis I-II frente a 32 endometriosis III-IV.

Recogida de muestras

- 5 Se recogieron muestras durante la fase secretora postovulatoria del ciclo menstrual (del día LH+4 a LH+12) debido a la mayor cantidad de proteína presente en esta fase, y dependencia de estrógenos de la enfermedad. Con el fin de recoger el líquido endometrial, se introdujo una cánula flexible de 2-3 mm de diámetro conectada a una jeringa de 20 ml en la cavidad uterina y se aplicó vacío con la jeringa. Los aspirados se expulsaron a tubos criogénicos de 2 ml convencionales y se congelaron inmediatamente a -80 °C o nitrógeno líquido. Los volúmenes de aspirado típicos varían de 5 a 100 µl.
- 10 Las muestras fueron muy heterogéneas, oscilando de secreción viscosa blanca-transparente a roja con coágulos de sangre o que contenían tejido endometrial.

Extracción de proteína

- 15 Primero, las muestras deben resuspenderse en 500 µl de PBS y purificarse usando el kit *Vivapure Anti-HAS/IgG* (Vivascience AG, Hannover, Alemania) para eliminar albúmina (especialmente si la muestra está contaminada con sangre) e inmunoglobulinas de clase G. Después de esta etapa, las muestras se precipitaron con 15 % en peso/volumen de ácido tricloroacético durante una hora a 4 °C, seguido de centrifugación (10 min, 16000 x g, 4 °C). Los sedimentos se lavaron con 1 ml de acetona previamente enfriada y se centrifugaron. Después de secar los sedimentos a temperatura ambiente durante 20 min, se rehidrataron con 470 µl de disolución de rehidratación que contenía urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS al 2 %. El contenido de proteína de las muestras resuspendidas se determinó por ensayo de Bradford usando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 25 Para realizar la electroforesis bidimensional (2DE), se tomaron 200 µg de cada muestra y se añadió disolución de rehidratación DeStreak al 1,2 % (Ref. 17-6003-18, GE Healthcare, Little Chalfont, RU), azul de bromofenol al 0,002 % y tampón IPG a pH 3-10 NL 0,5 % (Ref. 17-6000-88, GE Healthcare) a un volumen final de 450 µl de disolución de rehidratación. Cada muestra se cargó en gradientes de pH inmovilizados, Immobiline™ DryStrip (tiras de 24 cm, pH 3-10 NL) (Ref. 17-6002-45, GE Healthcare) y se aplicó la primera dimensión (IEF, isoelectroenfoque) en un sistema de isoelectroenfoque *Ettan™ IPGphor™ 3* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante para resolver las proteínas por su carga (punto isoelectro) en un intervalo de pH de 3-10. El voltaje aplicado fue del siguiente modo: rehidratación activa de las tiras a 50 V durante 11 horas, 250 V durante 15 minutos, voltaje creciente a 10.000 V manteniendo la intensidad a 50 pA por tira como máximo, acabando el IEF cuando el voltaje alcanzó >90.000 Vht.
- 30 A continuación, las tiras se equilibraron y se realizó la segunda dimensión (SDS-PAGE) para separar proteínas en geles de acrilamida según su peso molecular. Para este fin, se polimerizaron geles al 12,5 % de acrilamida (dimensiones: 26 x 20 cm) en el laboratorio usando *Ettan DALT twelve Gel Caster* de GE Healthcare. Las tiras se mantuvieron sobre la parte superior de los geles y se ejecutaron en el Ettan DALT twelve Large Format Vertical System siguiendo las instrucciones del fabricante hasta que el frente de electroforesis alcanzó el fondo de los geles. Entonces, los geles se tiñeron usando
- 35 nitrato de plata (kit de tinción con plata, ref 17-1150-01, GE Healthcare), y se barrieron (*ImageScanner Umax VII*, GE Healthcare) para el posterior análisis de imágenes de las manchas de proteína, se secaron al aire y se guardaron a temperatura ambiente. Para algunas muestras se ejecutó más de un gel 2D.

Se muestra un gel de imagen 2D típico obtenido de una muestra de aspirado endometrial como ejemplo representativo en la Fig. 1.

- 40 Análisis de las manchas de proteínas sobre los geles

Se usó el software *Progenesis™ 2D Evolution*, versión 2004, de Nonlinear Dynamics (RU), para analizar archivos de imágenes escaneadas en un formato de 300 dpi (puntos por pulgada) y 8 bits/canal. El software *Progenesis240* (Nonlinear Dynamics) transforma los datos de la imagen plana en una imagen 3D, en la que la intensidad de cada punto se representa por un volumen de pico que se correlaciona con la cantidad relativa de la proteína correspondiente en el aspirado endometrial del paciente. El análisis de imágenes se realizó de un modo semiautomático con las siguientes etapas, que se ilustran en la Figura 2:

- Detección de puntos y cuantificación en todos los geles.
- Deformación y correspondencia de todos los geles con respecto a un gel de referencia (un gel seleccionado que incluye idealmente todas las manchas presentes en una muestra de aspirado endometrial).
- Resta del ruido de fondo (modo sin manchas)
- Normalización de los valores del volumen de cada punto por el volumen de manchas total.

La matriz de datos correspondiente a cada expresión de manchas se exportó para el posterior análisis estadístico.

Análisis estadístico

Se hizo análisis estadístico usando el software SPSS. Se realizaron K pruebas de muestras independientes no paramétricas aplicando la prueba de Kruskal Wallis, y se detectaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre controles frente a endometriosis I-II frente a endometriosis III-IV. El cambio en veces (CV) del nivel de expresión de cada proteína entre los grupos diferentes estudiados se obtuvo comparando la mediana de los valores de intensidad de la expresión obtenidos del software Progenesis.

Se comprobaron las manchas diferenciales sobre las imágenes 2D para excluir fallos de correspondencia y cuando fuera necesario la correspondencia se corrigió y se realizó de nuevo el análisis estadístico.

Identificación de proteínas

La identificación de las manchas diferenciales se llevó a cabo por espectrometría de masas. Aquellas muestras de aspirado endometrial cuya electroforesis 2D había mostrado manchas estadísticamente significativas se enviaron de nuevo a electroforesis 2D preparativa y las manchas se cortaron del gel. Se digirieron las proteínas con tripsina y los péptidos resultantes se aplicaron a un espectrómetro de masas (MALDI-ToF, desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo de ionización). Se generaron huellas peptídicas y se determinó la secuencia de péptidos. Estas huellas se emparejaron en una base de datos Mascot.

La Tabla 2 muestra la lista de manchas estadísticamente significativas (con su valor 'p') y proteínas correspondientes identificadas por espectrometría de masas. Cada número de mancha se representa junto con el símbolo de proteína correspondiente y código Uniprot. También se incluye el cambio en veces del nivel de expresión de cada proteína entre los diferentes grupos estudiados. Las manchas con valores de CV superiores a 1 se expresan en exceso, mientras que las manchas inferiores a 1 se regulan por disminución.

Tabla 2. Identificación de manchas diferenciales estadísticamente significativas en endometriosis.

Mancha	Nombre	Símbolo	Uniprot	p	CV endo I-II frente a control	CV endo III-IV frente a control	CV endo III-IV frente a I- II
73400	Anexina A1	ANXA1	P04083	0,015	0,70	1,52	2,17
72989	Adenosilhomocisteinasa	SAHH	P23526	0,051	0,81	1,33	1,64
72989	Actina, citoplásmica 2	ACTG1	P63261	0,051	0,81	1,33	1,64
75266	Glutación S-transferasa	GSTP1	P09211	0,039	1,23	1,35	1,10
74204	Cadena ligera de ferritina	FRIL	P02792	0,019	2,08	1,50	0,72
75241	Proteína zeta/delta 14-3-3	1433Z	Q6P3U9	0,008	1,56	1,31	0,83
75242	Proteína beta/alfa 14-3-3	1433B	P31946	0,030	1,44	1,27	0,88
73152	Inhibidor de elastasa de leucocitos	LEI	P30740	0,037	0,57	0,71	1,25
73299	Ácido siálico sintasa	SAS	Q9NR45	0,012	0,90	1,98	2,19
74452	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	PPIA	P62937	0,019	1,71	1,63	0,95
75183	Proteína theta 14-3-3	1433T	P27348	0,027	1,66	1,67	1,01
73769	Proteína sigma 14-3-3	1433S	P31947	0,007	2,34	1,48	0,63
72500	Catalasa	CAT	P04040	0,050	0,69	1,01	1,47
74460	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	PPIA	P62937	0,011	1,50	1,62	1,08
75182	Proteína gamma 14-3-3	1433G	P61981	0,009	6,08	2,06	0,34
73992	Subunidad beta del proteasoma tipo 3	PSB3	P49720	0,013	1,23	1,90	1,55
74001	Proteína tumoral traducionalmente controlada	TCTP	P13693	0,035	1,36	1,81	1,33
72359	Proteína 1 de repetición de WD	WDR1	075083	0,033	0,73	1,61	2,22
72162	Moesina	MSN	P26038	0,014	0,63	1,23	1,97
72143	Moesina	MSN	P26038	0,001	0,47	1,00	2,11
74052	Flavina reductasa	BLVRB	P30043	0,025	1,94	0,96	0,49
74002	Lactoilglutación liasa	LGUL	Q04760	0,004	1,80	2,16	1,20
73892	Inhibidor 2 de la disociación de Rho GDP	GD15	P52566	0,004	0,47	1,54	3,26
73892	Proteína beta 1 de choque térmico	HSP81	P04792	0,004	0,47	1,54	3,26
73892	Precursor de glicodelina	PAEP	P09466	0,004	0,47	1,54	3,26

(continuación)

Mancha	Nombre	Símbolo	Uniprot	p	CV endo I-II frente a control	CV endo III-IV frente a control	CV endo III-IV frente a I-II
74126	Cadena pesada de ferritina	FRIH	P02794	0,001	3,29	1,69	0,51
73580	Pirofosfocinasa II de fosfato de ribosa	PRPS2	P11908	0,029	0,34	1,78	5,30
73812	Proteína de unión 1 a poli(rC)	PCBP1	Q15365	0,004	2,61	1,00	0,38
73983	Subunidad reguladora 10 no ATPasa del proteasoma 26S	PSD10	075832	0,007	2,82	1,69	0,60
73782	Sin ID			0,026	1,48	1,45	0,98
73085	Beta-actina	ACTB	P07437	0,020	1,28	0,74	0,58
72640	Cadena beta de tubulina	TBB5	P07437	0,006	2,17	1,23	0,57
73884	Inhibidor 1 de la disociación de Rho GDP	RhoGDI1	P52565	0,011	1,73	2,37	1,37
73927	Precursor de apolipoproteína A-1	APOA1	P02647	0,030	1,69	1,42	0,84
73309	Beta-actina	ATCB	P60709	0,025	0,73	2,06	2,82
74127	Fosfomevalonato cinasa	PMVK	Q15126	0,036	1,94	2,47	1,27
73814	Bisfosfoglicerato mutasa	BPGM	P07738	0,007	1,93	1,09	0,56
75164	Proteína 94 que contiene dominio de superenrollamiento	CCDC94	Q9BW85	0,021	1,77	4,05	2,29
73678	Subunidad beta de la proteína con protección de F-actina	CAPZB	P47756	0,037	0,33	0,75	2,23
74617	Subunidad beta de hemoglobina	HBB	Q9BX96	0,031	1,85	1,55	0,83
74617	Galectina-1	LEG1	P09382	0,031	1,85	1,55	0,83
72814	Septina-11	SEP11	Q9NVA2	0,035	0,64	1,53	2,40
72814	Citosol aminopeptidasa	AMPL	P28838	0,035	0,64	1,53	2,40
75213	Precursor de beta-2-glucoproteína 1	APOH	P02749	0,003	0,33	0,47	1,44
75213	Precursor de alfa-amilasa 1	AMY1	P04745	0,003	0,33	0,47	1,44
73748	Proteína serina/treonina-cinasa Nek7	NEK7	Q8TDX7	0,001	1,30	2,48	1,91
73774	Proteína 4 del canal intracelular de cloruro	CLIC4	Q9Y696	0,020	1,61	1,28	0,80

(continuación)

Mancha	Nombre	Símbolo	Uniprot	p	CV endo I-II frente a control	CV endo III-IV frente a control	CV endo III-IV frente a I-II
73749	Glutación transferasa omega-1	GSTO1	P78417	0,011	2,50	1,29	0,52
72991	Isozima 2 de adenilosuccinato sintetasa	ADSS	P30520	0,005	0,86	1,92	2,24
73871	Fosfoglicerato mutasa I	PGAM1	P18669	0,045	1,31	1,40	1,06
73862	Piridoxina-5'-fosfato oxidasa	PNPO	Q9NVS9	0,024	2,12	1,53	0,72
74129	Cadena pesada de ferritina	FRIH	P02794	0,014	2,95	2,30	0,78
74068	Sin ID			0,045	1,39	1,56	1,12
73362	Subunidad reguladora 7 no ATPasa del proteasoma 26S	PSD7	P51665	0,024	3,73	1,82	0,49
73362	Alcohol deshidrogenasa [NADP+]	AK1A1	P14550	0,024	3,73	1,82	0,49
73756	Sin ID			0,015	1,71	1,54	0,90
72803	Sin ID			0,015	0,48	2,00	4,18
73651	ADP-azúcar pirofosfatasa	NUDT5	Q9UKK9	0,047	0,31	0,79	2,57
73651	Actina, citoplásmica 2	ACTG1	P63261	0,047	0,31	0,79	2,57
72621	Aldehído deshidrogenasa 1A3	AL1A3	P47895	0,002	0,21	0,68	3,23

Validación de los biomarcadores

5 Se probarán anticuerpos monoclonales y/o policlonales (tanto comprados comercialmente como generados tras los protocolos de inmunización) para reactividad y sensibilidad para detectar los biomarcadores en aspirado endometrial y muestras de suero, usando inmunoensayos tipo ELISA y procedimientos de transferencia Western 1D y 2D.

10 También se comprarán proteínas recombinantes o prepararán específicamente para establecer la detección de los biomarcadores. Para la producción de proteínas recombinantes, ADNc disponibles (ADNc marcados) de la proteína de interés se comprarán y se expresarán en *E. coli*. La proteína expresada se purificará según la naturaleza de la marca y se migrará en un gel de SDS-PAGE.

15 Para la generación de anticuerpos contra proteínas recombinantes, las proteínas purificadas se usarán para inmunizar conejos para anticuerpos policlonales o ratones para monoclonales. Los anticuerpos se producirán usando metodologías convencionales; inmunizando animales con la proteína de interés diluida en adyuvante completo de Freund (Gibco, Grand Island, N.Y.) primero y a continuación cada mes durante tres meses con la proteína en adyuvante incompleto. Se usarán sueros de conejo o ratones (antes de la fusión, en este caso) como antisueros policlonales para mostrar si son reactivos con las preparaciones de proteína por técnica de transferencia Western convencional.

20 Para los experimentos de transferencia Western, se mezclan muestras de proteína (20 µg de proteína total) con gel de tampón de carga de SDS-PAGE complementado con 5 % de beta-mercaptoetanol y se incuban a 100 °C durante 5 min, antes de cargarse sobre geles de poliacrilamida. Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Se migran geles por duplicado y se transfieren, de manera que una membrana se prueba con anticuerpos producidos contra uno o más de los conjuntos seleccionados de proteínas, mientras que la segunda membrana se prueba con un anticuerpo producido contra actina (GE Healthcare) u otra proteína normalizante como control para la carga de proteína. Finalmente, las membranas se hibridan con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (GE

Healthcare) y la señal quimioluminiscente se detecta usando el sistema ECL (GE Healthcare) con película de quimioluminiscencia de alto rendimiento (Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

Para el procedimiento de detección de ELISA, se aplicará el siguiente protocolo: los anticuerpos se unen pasivamente durante la noche a 4 °C a la fase sólida (placas de 96 pocillos) por incubación en un tampón carbonato a pH 9,6. Los anticuerpos libres se lavan con PBST-BSA al 3 % y la placa se bloquea durante 1 hora a temperatura ambiente en PBST-BSA al 3 %. A continuación, la muestra de aspirado endometrial se añade al mismo tampón y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Después de algunos lavados con PBST para eliminar el antígeno no unido (biomarcador), se añaden anticuerpos conjugados con biotina en tampón PBST-BSA al 3 % y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con PBST para eliminar los anticuerpos marcados no unidos, se añaden complejos de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) para unirse al sándwich (en tampón PBST-BSA al 3%). Después de lavar con PBST, se añade un sustrato colorimétrico llamado TMB (SIGMA, T4319) y la reacción se detiene (disolución de parada de SIGMA, S5689) cuando se desarrolla el color. Este color se cuantifica en un espectrómetro. Las condiciones del experimento, tales como tiempos de incubación y diluciones de disolución, se optimizan para cada caso particular. Se recomienda que los anticuerpos sean contra diferentes regiones del antígeno y también se comprueban previamente por análisis de transferencia Western para garantizar su especificidad. En este sentido, también se recomienda el uso de anticuerpos monoclonales.

Desarrollo de un procedimiento no invasivo *in vitro* para el diagnóstico de endometriosis

Se desarrollará un inmunoensayo específico para la detección simultánea de los biomarcadores seleccionados incluidos en esta memoria descriptiva. El ensayo consistirá en capturar el biomarcador con un anticuerpo de cebo y una vez unido se detectará usando anticuerpos de detección marcados con biotina con el fin de unirse después a complejos de estreptavidina-fluoróforo. Dependiendo del número de biomarcadores que va a detectarse, el kit será un ensayo de ELISA convencional (si solo se incluye un marcador) o un chip de proteína o matriz de anticuerpos en suspensión (si se incluye un panel de biomarcadores). La detección se basará en la señal fluorescente o colorimétrica generada, que será proporcional a la cantidad de diana (biomarcador) unida. El sistema de detección final determinará los niveles de los biomarcadores incluidos junto con una proteína de normalización, una proteína cuyos niveles no cambian significativamente entre pacientes. Todos los anticuerpos incluidos en el ensayo serán anticuerpos monoclonales debido a su especificidad y la reproducibilidad en la etapa de producción.

En caso de desarrollar un chip de proteína, el protocolo, con modificaciones limitadas, será del siguiente modo: Se preparan portaobjetos usando un robot para la fabricación de micromatrices (Microgrid II 610, Biorobotics) en un formato múltiplex que permite el análisis simultáneo de 16 muestras (Nexterion MPX16, Schott). Cada pocillo del portaobjetos con manchas se incuba durante 15 min a temperatura ambiente con 100 ul de tampón de trabajo PBST-SBF al 3 % (PBS 1X + Tween 20 al 0,2 % + SBF al 3 %) para la etapa de bloqueo. La disolución se elimina y la incubación se repite durante 45 min a temperatura ambiente. Si se usa un control enriquecido en el ensayo, debe añadirse a cada muestra de aspirado endometrial a una concentración óptima predeterminada. Entonces, 40 ul de las muestras diluidas 1:1 en PBST-SBF al 3 % (con el control enriquecido cargado) se incuban en los pocillos durante 90 min a temperatura ambiente sobre un agitador (75 rpm). Después de 3 lavados de 5 min cada uno con 100 ul de PBST-SBF al 3 % por pocillo, se añade el conjunto de anticuerpo marcado con biotina (40 ul / pocillo) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente sobre un agitador (75 rpm). Este conjunto contiene los anticuerpos de detección para los biomarcadores y también uno dirigido contra el control enriquecido. Después de 3 lavados de 5 min cada uno con 100 ul de PBST-SBF al 3 % por pocillo, la etapa de desarrollo se realiza añadiendo 40 ul de estreptavidina-Cy3 diluida 1:100 en PBST-SBF al 3 %. Las siguientes etapas deben realizarse en la oscuridad debido a la presencia de fluoróforo. Después de 45 min de incubación, los pocillos se lavan dos veces (5 min cada uno) con 100 ul de PBST-SBF al 3 % y dos veces con 100 ul de PBS 1X. Entonces, el portaobjetos se lava dos veces (15 s cada vez) manualmente en un recipiente que contiene H₂O MQ. Finalmente, el portaobjeto se seca por centrifugación a 500 rpm durante 5 min.

Después de las etapas de incubación descritas de las muestras, anticuerpos, etc., los portaobjetos se barren a 560 nm (Axon Scanner GenePix 4100) y se cuantifican y normalizan los valores de fluorescencia del fluoróforo usando la proteína de control enriquecida. Finalmente, se realiza un análisis multifactorial para el análisis de datos (software SPSS). Se generan modelos predictivos (algoritmos) para discriminar pacientes de controles, y para cada modelo se determina la sensibilidad y especificidad.

En el caso de uso de una tecnología de matrices de anticuerpos en suspensión, se basará en microesferas y citometría de flujo. Esta tecnología usa perlas codificadas por color (internamente coloreadas con fluoróforos rojos y de infrarrojos), llamadas microesferas, en distintos conjuntos. Cada conjunto de perlas puede recubrirse con un anticuerpo específico para un marcador particular, permitiendo la captura de analitos específicos de una muestra y su posterior detección con otro anticuerpo marcado (biotinilado) específico.

Esta técnica incluye un lector que detecta perlas individuales por citometría de flujo. El ensamblaje óptico consiste en dos láser: un láser excita la mezcla de colorante dentro de las microesferas y el segundo láser excita el fluoróforo unido a la

superficie de las microesferas. Los detectores de fotodiodos miden las intensidades de emisión de la excitación de las mezclas de colorantes de clasificación de la codificación de colores dentro de las microesferas, y un tubo fotomultiplicador detecta la intensidad de emisión de la excitación de la molécula indicadora unida a la superficie de las microesferas.

Los resultados de los análisis se procesan y se proporcionan en formato de informe.

- 5 Esta tecnología permite el multiplexado de ensayos únicos dentro de una única muestra.

Lista de referencias

1. Ashley, R. H. 2003. Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins (Review). *Mol.Membr.Biol.* 20:1-11.
2. Bergqvist, A. 1992. Extragenital endometriosis. A review. *Eur.J.Surg.* 158:7-12.
- 10 3. Bommer, U. A. and B. J. Thiele. 2004. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 36:379-385.
4. Bryan, K. E., K. K. Wen, M. Zhu, N. D. Rendtorff, M. Feldkamp, L. Tranebjaerg, K. H. Friderici, and P. A. Rubenstein. 2006. Effects of human deafness gamma-actin mutations (DFNA20/26) on actin function. *J.Biol.Chem.* 281:20129-20139.
- 15 5. Buckingham, J. C., C. D. John, E. Solito, T. Tierney, R. J. Flower, H. Christian, and J. Morris. 2006. Annexin 1, glucocorticoids, and the neuroendocrine-immune interface. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1088:396-409.
6. Chen, S. H., P. S. Wu, C. H. Chou, Y. T. Yan, H. Liu, S. Y. Weng, and H. F. Yang-Yen. 2007. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol.Biol.Cell* 18:2525-2532.
- 20 7. Choi, K. J., Y. J. Piao, M. J. Lim, J. H. Kim, J. Ha, W. Choe, and S. S. Kim. 2007. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia-and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res.* 67:3654-3662.
8. Ciocca, D. R., S. Oesterreich, G. C. Chamness, W. L. McGuire, and S. A. Fuqua. 1993. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J.Natl.Cancer Inst.* 85:1558-1570.
- 25 9. Ciocca, D. R., S. Oesterreich, G. C. Chamness, W. L. McGuire, and S. A. Fuqua. 1993. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J.Natl.Cancer Inst.* 85:1558-1570.
10. Datta, S. K., O. M. Guicherit, and R. E. Kellems. 1994. Adenylosuccinate synthetase: a dominant amplifiable genetic marker in mammalian cells. *Somat.Cell Mol.Genet.* 20:381-389.
11. Dawson, S., H. Higashitsuji, A. J. Wilkinson, J. Fujita, and R. J. Mayer. 2006. Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53. *Trends Cell Biol.* 16:229-233.
- 30 12. DerMardirossian, C. and G. M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15:356-363.
13. Dougherty, M. K. and D. K. Morrison. 2004. Unlocking the code of 14-3-3. *J.Cell Sci.* 117:1875-1884.
14. Dransart, E., B. Olofsson, and J. Cherfils. 2005. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic.* 6:957-966.
- 35 15. Dressman, M. A., A. Baras, R. Malinowski, L. B. Alvis, I. Kwon, T. M. Walz, and M. H. Polymeropoulos. 2003. Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer. *Cancer Res.* 63:2194-2199.
16. Esfandiari, N., J. Ai, Z. Nazemian, M. H. Javed, L. Gotlieb, and R. F. Casper. 2007. Expression of glycodefin and cyclooxygenase-2 in human endometrial tissue following three-dimensional culture. *Am.J.Reprod.Immunol.* 57:49-54.
- 40 17. Garry, R. 2006. Diagnosis of endometriosis and pelvic pain. *Fertil.Steril.* 86:1307-1309.
18. Gupta, S., A. Agarwal, L. Sekhon, N. Krajcir, M. Cocuzza, and T. Falcone. 2006. Serum and peritoneal abnormalities in endometriosis: potential use as diagnostic markers. *Minerva Ginecol.* 58:527-551.
- 45 19. Hall, P. A., K. Jung, K. J. Hillan, and S. E. Russell. 2005. Expression profiling the human septin gene family. *J.Pathol.* 206:269-278.

20. Hall, P. A., K. Jung, K. J. Hillan, and S. E. Russell. 2005. Expression profiling the human septin gene family. *J.Pathol.* 206:269-278.
21. Hanai, N., K. Nagata, A. Kawajiri, T. Shiromizu, N. Saitoh, Y. Hasegawa, S. Murakami, and M. Inagaki. 2004. Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett.* 568:83-88.
- 5 22. Hart, M. C. and J. A. Cooper. 1999. Vertebrate isoforms of actin capping protein beta have distinct functions In vivo. *J.Cell Biol.* 147:1287-1298.
23. Hearn-Stokes, R., C. Mayers, C. Zahn, D. Cruess, J. A. Gustafsson, J. Segars, and L. Nieman. 2006. Expression of the proto-oncoprotein breast cancer nuclear receptor auxiliary factor (Brx) is altered in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil.Steril.* 85:63-70.
- 10 24. Herdendorf, T. J. and H. M. Miziorko. 2006. Phosphomevalonate kinase: functional investigation of the recombinant human enzyme. *Biochemistry* 45:3235-3242.
25. Howard, B. A., R. Furumai, M. J. Campa, Z. N. Rabbani, Z. Vujaskovic, X. F. Wang, and E. F. Patz, Jr. 2005. Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 65:8853-8860.
- 15 26. Hughes, S. C. and R. G. Fehon. 2007. Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19:51-56.
27. Hughes, S. C. and R. G. Fehon. 2007. Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19:51-56.
- 20 28. Hur, S. E., J. Y. Lee, H. S. Moon, and H. W. Chung. 2005. Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Mol.Hum.Reprod.* 11:15-19.
29. Hur, S. E., J. Y. Lee, H. S. Moon, and H. W. Chung. 2005. Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Mol.Hum.Reprod.* 11:15-19.
- 25 30. Jones, M. B., H. Krutzsch, H. Shu, Y. Zhao, L. A. Liotta, E. C. Kohn, and E. F. Petricoin, III. 2002. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics.* 2:76-84.
31. Koninckx, P. R., C. Meuleman, S. Demeyere, E. Lesaffre, and F. J. Cornillie. 1991. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil.Steril.* 55:759-765.
- 30 32. Koninckx, P. R., L. Riittinen, M. Seppala, and F. J. Cornillie. 1992. CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. *Fertil.Steril.* 57:523-530.
33. Kyama, C. M., D. T'jampens, A. Mihalyi, P. Simsa, S. Debrock, E. Waelkens, B. Landuyt, C. Meuleman, V. Fulop, J. M. Mwenda, and T. M. D'Hooghe. 2006. ProteinChip technology is a useful method in the pathogenesis and diagnosis of endometriosis: a preliminary study. *Fertil.Steril.*
- 35 34. Li, J., W. M. Brieher, M. L. Scimone, S. J. Kang, H. Zhu, H. Yin, U. H. von Andrian, T. Mitchison, and J. Yuan. 2007. Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nat.Cell Biol.* 9:276-286.
35. Li, X., Z. Zhu, D. Mo, H. Wang, S. Yang, S. Zhao, and K. Li. 2007. Comparative molecular characterization of ADSS1 and ADSS2 genes in pig (*Sus scrofa*). *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 147:271-277.
- 40 36. Lim, L. H. and S. Pervaiz. 2007. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* 21:968-975.
37. Lo, W. Y., M. H. Tsai, Y. Tsai, C. H. Hua, F. J. Tsai, S. Y. Huang, C. H. Tsai, and C. C. Lai. 2007. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clin.Chim.Acta* 376:101-107.
- 45 38. Lo, W. Y., M. H. Tsai, Y. Tsai, C. H. Hua, F. J. Tsai, S. Y. Huang, C. H. Tsai, and C. C. Lai. 2007. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clin.Chim.Acta* 376:101-107.
39. Lo, W. Y., M. H. Tsai, Y. Tsai, C. H. Hua, F. J. Tsai, S. Y. Huang, C. H. Tsai, and C. C. Lai. 2007. Identification of

- over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clin.Chim.Acta* 376:101-107.
40. Lozano, G. and G. P. Zambetti. 2005. Gankyrin: an intriguing name for a novel regulator of p53 and RB. *Cancer Cell* 8:3-4.
- 5 41. Makeyev, A. V. and S. A. Liebhaber. 2002. The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*. 8:265-278.
42. Maquoi, E., F. A. van den Brule, V. Castronovo, and J. M. Foidart. 1997. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta* 18:433-439.
- 10 43. Mayer, R. J. and J. Fujita. 2006. Gankyrin, the 26 S proteasome, the cell cycle and cancer. *Biochem.Soc.Trans.* 34:746-748.
44. Mhaweche, P. 2005. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res.* 15:228-236.
45. Morell, R. J., K. H. Friderici, S. Wei, J. L. Effenbein, T. B. Friedman, and R. A. Fisher. 2000. A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. *Genomics* 63:1-6.
- 15 46. Mukhopadhyay, D., S. SundarRaj, A. Alok, and A. A. Karande. 2004. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J.Biol.Chem.* 279:8577-8584.
47. Mukhopadhyay, D., S. SundarRaj, A. Alok, and A. A. Karande. 2004. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J.Biol.Chem.* 279:8577-8584.
- 20 48. Mukhopadhyay, D., S. SundarRaj, A. Alok, and A. A. Karande. 2004. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J.Biol.Chem.* 279:8577-8584.
49. Pejic, S., J. Kasapovic, A. Todorovic, V. Stojiljkovic, and S. B. Pajovic. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of patients with uterine myoma, endometrial polypus, hyperplastic and malignant endometrium. *Biol.Res.* 39:619-629.
- 25 50. Pilloff, D., K. Dabovic, M. J. Romanowski, J. B. Bonanno, M. Doherty, S. K. Burley, and T. S. Leyh. 2003. The kinetic mechanism of phosphomevalonate kinase. *J.Biol.Chem.* 278:4510-4515.
51. Poliness, A. E., M. G. Healey, S. P. Brennecke, and E. K. Moses. 2004. Proteomic approaches in endometriosis research. *Proteomics*. 4:1897-1902.
52. Pritlove, D. C., M. Gu, C. A. Boyd, H. S. Randeva, and M. Vatish. 2006. Novel placental expression of 2,3-bisphosphoglycerate mutase. *Placenta* 27:924-927.
- 30 53. Ranganathan, S. and K. D. Tew. 1993. Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon. *Biochim.Biophys.Acta* 1182:311-316.
54. Reimer, J., S. Bien, J. Sonnemann, J. F. Beck, T. Wieland, H. K. Kroemer, and C. A. Ritter. 2007. Reduced expression of Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor-alpha modulates the cytotoxic effect of busulfan in HEK293 cells. *Anticancer Drugs* 18:333-340.
- 35 55. Sasaki, T. and Y. Takai. 1998. The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 245:641-645.
56. Schafer, D. A., Y. O. Korshunova, T. A. Schroer, and J. A. Cooper. 1994. Differential localization and sequence analysis of capping protein beta-subunit isoforms of vertebrates. *J.Cell Biol.* 127:453-465.
57. Seppala, M., H. Bohn, and Y. Tatarinov. 1998. Glycodelins. *Tumour.Biol.* 19:213-220.
- 40 58. Shalom-Barak, T. and U. G. Knaus. 2002. A p21-activated kinase-controlled metabolic switch up-regulates phagocyte NADPH oxidase. *J.Biol.Chem.* 277:40659-40665.
59. Short, D. M., I. D. Heron, J. L. Birse-Archbold, L. E. Kerr, J. Sharkey, and J. McCulloch. 2007. Apoptosis induced by staurosporine alters chaperone and endoplasmic reticulum proteins: Identification by quantitative proteomics. *Proteomics*. 7:3085-3096.
- 45 60. Speck, O., S. C. Hughes, N. K. Noren, R. M. Kulikauskas, and R. G. Fehon. 2003. Moesin functions

antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* 421:83-87.

61. Speck, O., S. C. Hughes, N. K. Noren, R. M. Kulikaukas, and R. G. Fehon. 2003. Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* 421:83-87.

62. Suginta, W., N. Karoulias, A. Aitken, and R. H. Ashley. 2001. Chloride intracellular channel protein CLIC4 (p64H1) binds directly to brain dynamin I in a complex containing actin, tubulin and 14-3-3 isoforms. *Biochem.J.* 359:55-64.

63. Suh, K. S., M. Malik, A. Shukla, and S. H. Yuspa. 2007. CLIC4, skin homeostasis and cutaneous cancer: surprising connections. *Mol.Carcinog.* 46:599-604.

64. Suh, K. S., M. Mutoh, M. Gerdes, and S. H. Yuspa. 2005. CLIC4, an intracellular chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 10:105-109.

65. Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J.Biol.Chem.* 272:23371-23375.

66. Tanner, M. E. 2005. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg.Chem.* 33:216-228.

67. Telimaa, S., A. Kauppila, L. Ronnberg, A. M. Suikkari, and M. Seppala. 1989. Elevated serum levels of endometrial secretory protein PP14 in patients with advanced endometriosis. Suppression by treatment with danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 161:866-871.

68. Turner, M. A., X. Yang, D. Yin, K. Kuczera, R. T. Borchardt, and P. L. Howell. 2000. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem.Biophys.* 33:101-125.

69. Ulukus, M., H. Cakmak, and A. Arici. 2006. The role of endometrium in endometriosis. *J.Soc.Gynecol.Investig.* 13:467-476.

70. van den Brule, F. A., C. Buicu, A. Berchuck, R. C. Bast, M. Deprez, F. T. Liu, D. N. Cooper, C. Pieters, M. E. Sobel, and V. Castronovo. 1996. Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum.Pathol.* 27:1185-1191.

71. Waites, G. T., S. C. Bell, R. A. Walker, and P. L. Wood. 1990. Immunohistological distribution of the secretory endometrial protein, 'pregnancy-associated endometrial alpha 2-globulin', a glycosylated beta-lactoglobulin homologue, in the human fetus and adult employing monoclonal antibodies. *Hum.Reprod.* 5:487-493.

72. Whitbread, A. K., A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmuck, M. Coggan, and P. G. Board. 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401:78-99.

73. Wilker, E. and M. B. Yaffe. 2004. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. *J.Mol.Cell Cardiol.* 37:633-642.

74. Yissachar, N., H. Salem, T. Tennenbaum, and B. Motro. 2006. Nek7 kinase is enriched at the centrosome, and is required for proper spindle assembly and mitotic progression. *FEBS Lett.* 580:6489-6495.

75. Yu, H. N., E. K. Song, S. M. Yoo, Y. R. Lee, M. K. Han, C. Y. Yim, J. Y. Kwak, and J. S. Kim. 2007. Activation of NUDT5, an ADP-ribose pyrophosphatase, by nitric oxide-mediated ADP-ribosylation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 354:764-768.

76. Yu, H. N., E. K. Song, S. M. Yoo, Y. R. Lee, M. K. Han, C. Y. Yim, J. Y. Kwak, and J. S. Kim. 2007. Activation of NUDT5, an ADP-ribose pyrophosphatase, by nitric oxide-mediated ADP-ribosylation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 354:764-768.

77. Zhang, H., Y. Niu, J. Feng, H. Guo, X. Ye, and H. Cui. 2006. Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil.Steril.*

78. Zhu, M., T. Yang, S. Wei, A. T. DeWan, R. J. Morell, J. L. Effenbein, R. A. Fisher, S. M. Leal, R. J. Smith, and K. H. Friderici. 2003. Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am.J.Hum.Genet.* 73:1082-1091.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende

a) medir el biomarcador peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA), solo o en combinación con al menos uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en actina, gamma 1 (ACTG1), adenosilhomocisteína (SAHH), adenilosuccinato sintetasa (ADSS), ADP-azúcar pirofosfato (NUDT5), alcohol deshidrogenasa (NADP+) (AK1A1), aldehído deshidrogenasa 1A3 (AL1A3), precursor de alfa-amilasa 1 (AMY1), anexina A1 (ANXA1), apolipoproteína A1 (APOA1), beta actina (ACTB), precursor de beta-2-glucoproteína 1 (APOH), 2,3-bisfosfoglicerato mutasa (BPGM), catalasa (CAT), proteína 4 del canal intracelular de cloruro (CLIC4), proteína 94 que contiene dominio superenrollado (CCDC94), citosol aminopeptidasa (AMPL), subunidad beta de la proteína con protección de F-actina (CAPZB), cadena pesada de ferritina (FRIH), cadena ligera de ferritina (FRIL), flavina reductasa (BLVRB), galectina-1 (LEG1), glutatión-transferasa omega 1 (GSTO1), glutatión S-transferasa (GSTP1), precursor de glicodelina (PAEP), lactoilglutatión liasa (LGUL), proteína beta 1 de choque térmico (HSPB1), subunidad beta de hemoglobina (HBB), inhibidor de la elastasa de leucocitos (LEI), moesina (MSN), fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), fosfomevalonato cinasa (PMVK), proteína de unión 1 a poli(rC) (PCBP1), piridoxina 5'-fosfato oxidasa (PNPO), subunidad beta tipo 3 del proteasoma (PSB3), subunidad reguladora 7 no ATPasa del proteasoma 26S (PSD7), subunidad reguladora 10 no ATPasa del proteasoma 26S (PSD10), proteína beta/alfa 14-3-3 (1433B), proteína gamma 14-3-3 (1433G), sigma 14-3-3 (1433S), proteína theta 14-3-3 (1433T), proteína zeta/delta 14-3-3 (1433Z), inhibidor de la disociación de rho GDP (ARHGDIA), inhibidor 2 de la disociación de rho GDP (GD15), ribosa-fosfato pirofosfocinasa II (PRPS2), septina-11 (SEP11), proteína serina/treonina cinasa Nek 7 (NEK7), ácido siálico sintasa (SAS), proteína tumoral traduccionalmente controlada (TCTP), cadena beta de tubulina (TBB5) y dominio 1 de repetición de WD (WDR1) o sus variantes transcripcionales o postraduccionales en una muestra de un individuo, y

b) comparar

- la medición del biomarcador PPIA en la muestra con la medición del biomarcador de PPIA en una muestra normal, en el que una alteración en la medición del biomarcador de PPIA en comparación con la medición del biomarcador de PPIA en la muestra normal es indicativo de endometriosis; o

- las mediciones del biomarcador PPIA en combinación con las mediciones de al menos uno o más de dichos biomarcadores en la muestra con la medición del biomarcador PPIA en combinación con las mediciones de al menos uno o más de dichos biomarcadores en una muestra normal, en donde una alteración en las mediciones del biomarcador de PPIA y en las mediciones de uno o más de dichos biomarcadores en comparación con la medición del biomarcador de PPIA y las mediciones de uno o más de dichos biomarcadores en la muestra normal es indicativo de endometriosis.

2. Un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende a) medir una o más relaciones entre la cantidad del biomarcador peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA), solo o en combinación, con uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDIA, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales, en una muestra de un individuo y una o más proteínas de referencia independientemente seleccionadas del grupo que comprende proteínas constantemente expresadas y proteínas diferencialmente expresadas en la misma muestra, y b) comparar las relaciones del uno o más biomarcadores en la muestra con respecto a la una o más proteínas de referencia, en el que una alteración en la relación en la muestra en comparación con la relación en la muestra normal es indicativa de endometriosis.

3. Un procedimiento *in vitro* no invasivo que comprende a) medir una o más relaciones entre dos o más biomarcadores, en donde un biomarcador es peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA) y los otros están seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDIA, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales, en una muestra de un individuo, y b) comparar las relaciones obtenidas entre los dos o más biomarcadores en la muestra con las relaciones obtenidas entre los dos mismos o más biomarcadores en una muestra normal, en el que una alteración en las relaciones en la muestra en comparación con las relaciones en la muestra normal es indicativa de endometriosis.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa a) comprende medir al menos dos biomarcadores, en el que un biomarcador es PPIA y el otro está seleccionado del grupo de biomarcadores que consiste

en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDI, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa a) comprende medir al menos tres biomarcadores, en el que un biomarcador es PPIA y los otros dos están seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDI, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa a) comprende medir al menos cuatro biomarcadores, en el que un biomarcador es PPIA y los otros tres están seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDI, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa a) comprende medir 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ó 51 biomarcadores, en donde un biomarcador es PPIA y los otros están seleccionados del grupo que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDI, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se usa para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico (incluyendo la etapa o gravedad de la enfermedad), o pronóstico de endometriosis o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la muestra de un individuo es aspirado endometrial o suero o la muestra se obtiene de un individuo seleccionado del grupo que consiste en un individuo no previamente diagnosticado con endometriosis, un individuo que se ha diagnosticado previamente con endometriosis, y un individuo que recibe tratamiento contra endometriosis.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende obtener un extracto de proteínas de la muestra.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la detección y cuantificación de los biomarcadores comprende una primera etapa, en donde el extracto de proteínas de la muestra se pone en contacto con una composición de uno o más anticuerpos específicos, contra uno o más epítomos de la proteína o proteínas, y una segunda etapa, en donde se cuantifican los complejos formados por los anticuerpos y las proteínas.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en donde dichos anticuerpos son humanos, humanizados o de origen no humano y se seleccionan de anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos intactos o recombinantes de anticuerpos, combicuerpos y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos.

13. Uso *in vitro* del biomarcador peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA), solo o en combinación con una o más secuencias de péptidos derivadas de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDI, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales, para detectar la presencia de endometriosis y establecer el diagnóstico, que incluye la etapa o gravedad de la enfermedad, o pronóstico de endometriosis o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.

14. Uso *in vitro* de la secuencia de nucleótidos o de péptidos de peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA), sola o en combinación, con una o más secuencias de nucleótidos o de péptidos derivadas de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G,

1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDIA, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales, solos o en cualquier combinación, en procedimientos para cribar, identificar, desarrollar y evaluar la eficiencia de compuestos para endometriosis.

- 5 15. Uso *in vitro* de un kit que comprende cualquier combinación de anticuerpos que reconoce específicamente el biomarcador de peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA) y uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores que consiste en ACTG1, SAHH, ADSS, NUDT5, AK1A1, AL1A3, AMY1, ANXA1, APOA1, ACTB, APOH, BPGM, CAT, CLIC4, CCDC94, AMPL, CAPZB, FRIH, FRIL, BLVRB, LEG1, GSTO1, GSTP1, PAEP, LGUL, HSPB1, HBB, LEI, MSN, PGAM1, PMVK, PCBP1, PNPO, PSB3, PSD7, PSD10, 1433B, 1433G, 1433S, 1433T, 1433Z, ARHGDIA, GD15, PRPS2, SEP11, NEK7, SAS, TCTP, TBB5 y WDR1 o sus variantes transcripcionales o postraduccionales, y un vehículo en envase adecuado para detectar la presencia de enfermedad de endometriosis y establecer el diagnóstico, que incluye la etapa o gravedad de la enfermedad, o pronóstico de endometriosis o para monitorizar el efecto del tratamiento administrado a un individuo que padece esta enfermedad o para evaluar la ausencia de enfermedad después de resección quirúrgica.
- 10

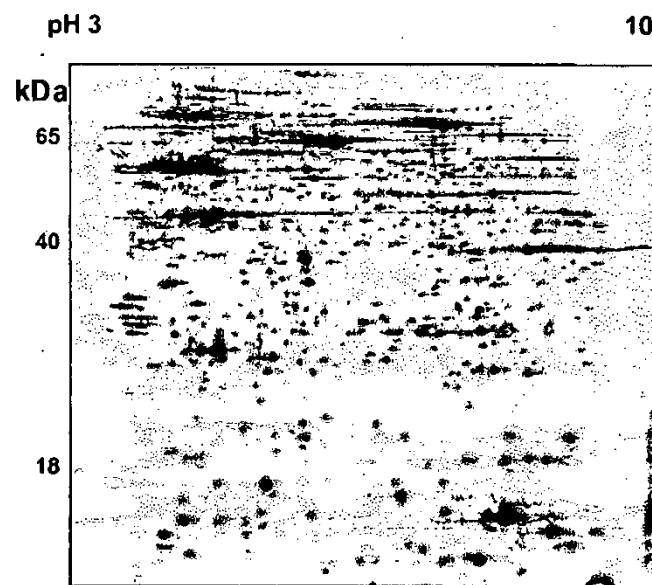


Fig 1

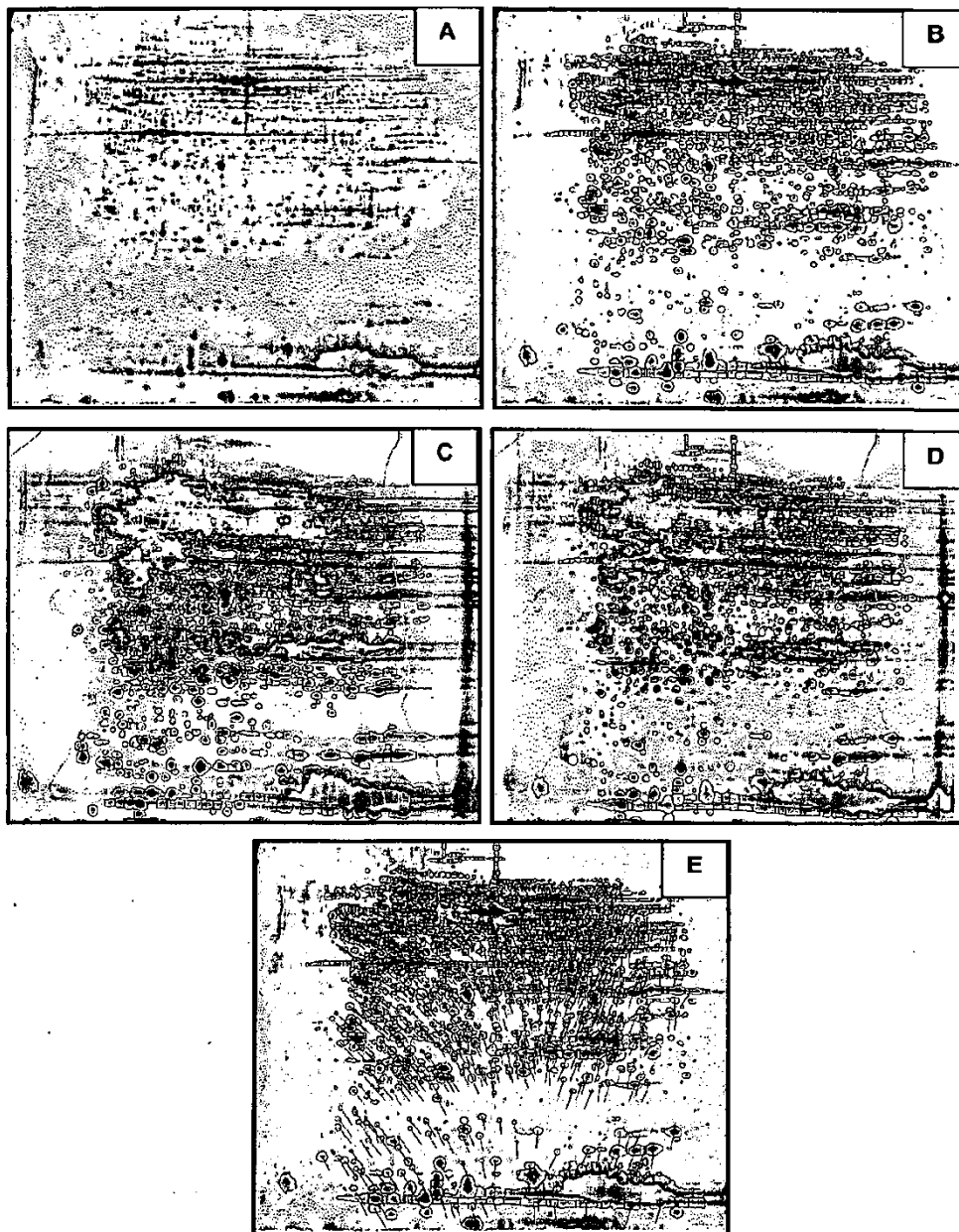


Fig. 2