



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 100**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01909382 .2**
(86) Fecha de presentación : **26.02.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1290218**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

(54) Título: **Marcadores relacionados con la endometriosis y usos de los mismos.**

(30) Prioridad: **25.02.2000 US 185063 P**
17.08.2000 US 225745 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(73) Titular/es: **Siemens Medical Solutions Diagnostics**
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591, US

(72) Inventor/es: **Baban, Soheyl;**
Bernard, Monique;
Cherry, Elana;
Gosselin, Diane;
Hugo, Patrice;
Malette, Brigitte;
Miron, Pierre;
Prive , Charles y
Shazand, Kamran

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Marcadores relacionados con la endometriosis y usos de los mismos.

5 **Antecedentes de la invención**a) **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a marcadores de endometriosis y más particularmente a métodos para determinar la posibilidad de endometriosis en sujetos femeninos, a métodos para clasificar la endometriosis en mujeres que padecen endometriosis y a métodos para tratar esta enfermedad. La invención también se refiere a polinucleótidos, sondas, cebadores y kits útiles para poner en práctica los métodos mencionados anteriormente.

b) **Breve descripción de la técnica anterior**

La endometriosis es uno de los trastornos ginecológicos más comunes, que afectan hasta el 10-15% de las mujeres en edad de procrear. Se asocia principalmente con dolor pélvico intenso y/o esterilidad, pero también con dismenorrea, dispareunia, y otros síntomas diversos tales como hemorragia intraperitoneal, dolor de espalda, estreñimiento y/o diarrea. La endometriosis se caracteriza por la implantación y el crecimiento de las células endometriales (que normalmente constituyen el revestimiento del útero) en sitios extrauterinos, lo más frecuentemente en la cavidad peritoneal. Puede clasificarse la gravedad de la enfermedad. Según la American Society of Reproductive Medicine (ASRM), la enfermedad se clasifica en cuatro estadios, concretamente, mínimo (estadio I), leve (estadio II), moderado (estadio III) y grave (estadio IV). Aunque la etiología y la patogénesis de la endometriosis siguen sin estar claras, la teoría de la menstruación retrógrada es la aceptada más ampliamente para explicar la presencia de células endometriales en sitios ectópicos. Sin embargo, la menstruación retrógrada se produce en la mayoría de las mujeres. Por tanto, una cierta predisposición o potencial genéticos, presente en las células endometriales, podría ser responsable de la presencia de la enfermedad. Inicialmente, este potencial genético podría estar relacionado con mutaciones en el genoma, pero además, también puede conducir a la posterior expresión génica alterada.

En la actualidad, la visualización directa de las lesiones endometrióticas con procedimientos quirúrgicos (laparoscopia o laparotomía) es el único método fidedigno para diagnosticar la endometriosis. Sin embargo, este método es sumamente invasivo (es decir, cirugía bajo anestesia general) y costoso. El periodo de tiempo entre el comienzo de los síntomas y el diagnóstico de la enfermedad puede ser de hasta 8 a 12 años. Idealmente, la perspectiva para diagnosticar la endometriosis más fácil, rápidamente y tan pronto como sea posible durante el transcurso de la enfermedad reduciría definitivamente el número de años durante los cuales las pacientes soportan el dolor, la esterilidad u otros síntomas.

Basándose en esta perspectiva, varios investigadores han buscado identificar marcadores biológicos (proteicos y genéticos) que pueden usarse eficazmente como herramientas de predicción para la endometriosis. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno ha sido capaz de hacerlo.

Por ejemplo, también se ha demostrado que varias proteínas se expresan de manera diferenciada en la endometriosis. Éstas incluyen el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), $\alpha_v\beta_3$ integrina, MCP-1, aromatasa P450 e inhibidores y receptor del activador del plasminógeno. Desgraciadamente, la importancia clínica de estos marcadores es incierta puesto que los parámetros de diagnóstico, tales como la sensibilidad y la especificidad de estos marcadores candidatos todavía se han definido sólo escasamente.

Se ha notificado que Bcl-2 se regula por incremento durante la fase proliferativa del ciclo ovárico en el endometrio eutópico de las mujeres enfermas (Meresman *et al.* (2000) Fertil. Steril. 74(4): 760-6) así como en las lesiones endometrióticas en ambas fases del ciclo (Jones *et al.* (1998) Hum. Reprod. 13(12): 3496-502) y en macrófagos del fluido peritoneal de mujeres que tienen endometriosis (McLaren *et al.* (1997) Hum. Reprod. 12(1): 146-52). Sin embargo, estos resultados difieren de los datos presentados en el presente documento en los que se observa la regulación por disminución de Bcl-2 en el tejido eutópico de las mujeres con endometriosis, en comparación las mujeres sin la enfermedad, independientemente de la fase del ciclo ovárico.

Se ha notificado que la conexina 43 (Cx43), una proteína implicada en uniones de huecos, se expresa de manera aberrante en el epitelio uterino glandular del tejido endometrial ectópico en las mujeres con endometriosis (Regidor *et al.* (1997) Mol. Hum. Reprod. 3:375-381). El objetivo de este estudio fue únicamente determinar la regulación hormonal de las conexinas en los tejidos endometrióticos y, en consecuencia, este informe no analizó el tejido eutópico ni en las mujeres con endometriosis ni en las mujeres sin la enfermedad. Por tanto, los hallazgos en este estudio han tenido poca relevancia clínica o diagnóstica.

La ciclooxygenasa-2 humana (COX-2) está implicada en la síntesis de prostaglandina y, como resultado, se ha implicado en el crecimiento y la diferenciación de las células del estroma endometrial, así como durante el periodo de implantación necesario para estabilizar el embarazo (Marions y Danielsson (1999) Mol. Hum. Reprod. 5:961-5). Debido a su papel en la implantación durante el embarazo, se ha postulado que COX-2 puede estar implicada en la implantación de las células endometriales en sitios ectópicos, dando lugar a la endometriosis. Sin embargo, hasta la

fecha, no ha habido ningún informe concluyente que demuestre el papel de COX-2 en la endometriosis, ni que una alteración de su expresión conduzca a la enfermedad.

Se ha descrito un aumento en la expresión en el nivel de proteínas de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) en las células glandulares endometriales de las mujeres que tienen endometriosis y adenomiosis, en comparación con un grupo control (Ota *et al.* (1997) Fertil Steril 68: 23-28). Este resultado se obtuvo mediante inmunohistoquímica. Los mismos autores, usando la misma técnica, demostraron que la óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe) y la superóxido dismutasa (SOD) también se regulaban por incremento en el endometrio de pacientes con endometriosis o adenomiosis (Ota *et al.* (1998) Fertil Steril 69: 303-308; Ota *et al.* (1999) Fertil Steril 72: 129-134). Sin embargo, estos estudios tienen un valor clínico limitado porque algunos de los experimentos no siempre se llevaron a cabo con un enfoque técnico preciso, y porque los marcadores se probaron en un pequeño número de pacientes, no produciendo resultados estadísticamente significativos. Además, en los estudios de Ota, se encontró que se producía expresión génica alterada en el tejido ectópico, en oposición a en el endometrio eutópico y, por tanto, los resultados presentados no son aplicables industrialmente.

Otros grupos que estudiaron la expresión génica han informado de que el gen de la glutatión S-transferasa (GST) tenía un grado mayor de polimorfismo en la endometriosis en comparación con un grupo control y, por tanto, representaba un sistema de detoxificación del rendimiento menos global que las mujeres predispuestas a la enfermedad (Baranova *et al.*, (1999) Mol. Hum. Reprod. 5:636-641). Estos resultados reflejan una predisposición genética para tener la enfermedad, en lugar de la posibilidad de endometriosis.

La solicitud internacional PCT WO99/63116 muestra que la protimosina, el precursor nuclear sumamente ácido de la timosina, se sobreexpresa en el tejido endometrial humano normal imitando a la endometriosis cuando se injerta en un modelo de ratón de endometriosis. La importancia clínica de este marcador no se ha demostrado porque dicha solicitud internacional PCT no demuestra que la sobreexpresión de protimosina es indicativa eficazmente de la posibilidad de endometriosis.

En general, nadie ha descrito nunca ningún método para determinar la posibilidad de endometriosis en mujeres, ningún método para identificar eficazmente a las mujeres que padecen endometriosis, ni ningún método para clasificar la endometriosis en mujeres que padecen la enfermedad.

Por tanto, existe la necesidad de un enfoque alternativo a la laparoscopia o la laparotomía para diagnosticar y determinar el estadio de la endometriosis. Más particularmente, sería sumamente deseable proporcionar métodos en los que se sometieran a ensayo muestras de células endometriales para determinar los niveles de expresión de genes específicos relacionados con la endometriosis (transcritos de ADNc o ARN o sus proteínas correspondientes), que se sabe que se expresan de manera diferenciada en las células endometriales de las mujeres con endometriosis (grupo Endo) en comparación con las mujeres sin endometriosis (grupo Control).

La presente invención cumple estas necesidades y también otras necesidades que serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la siguiente memoria descriptiva.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para determinar la posibilidad de endometriosis en sujetos femeninos.

La presente invención también tiene como objetivo proporcionar un método para clasificar la endometriosis en mujeres que padecen esta enfermedad, así como un método para tratar esta enfermedad.

La invención también se refiere a cebadores, sondas y kits útiles para poner en práctica los métodos mencionados anteriormente.

El gen FKHR (*forkhead in r*abdomiosarcoma, cabeza de horquilla en rabdomiosarcoma) en el cromosoma 13q14 (número de registro de Genbank AF032885) codifica para un factor de transcripción eucariota de la familia de los forkhead (cabeza de horquilla). Los miembros de esta familia comparten una región conservada responsable de la especificidad de unión al ADN, denominada dominio “forkhead” (“cabeza de horquilla”) o “winged-helix” (“hélice alada”). Los miembros de esta familia desempeñan un papel durante el desarrollo normal y están asociados con la progresión tumorigénica. El gen FKHR (*forkhead in r*abdomiosarcoma, cabeza de horquilla en rabdomiosarcoma) en el cromosoma 13q14 (número de registro de Genbank AF032885) está implicado en el rabdomiosarcoma alveolar. ANDERSON *et al.* (1998) han clonado y caracterizado tres genes FKHRP1, FKHRL1 y FKHRL1P1, que comparten similitudes con FKHR, y que forman con él una subfamilia de genes similares a FKHR. Aunque FKHR y FKHRL1 representan genes funcionales, FKHRP1 y FKHRL1P1 probablemente son pseudogenes procesados. BIGGS *et al.* han estudiado la regulación de FKHR1, un miembro de la subclase de FKHR de las proteínas relacionadas con la cabeza de horquilla, y han demostrado que la fosforilación mediante PKB/Akt regula negativamente FKHR1 potenciando la exportación desde el núcleo.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar la posibilidad de endometriosis en sujetos femeninos por el que se someten a ensayo los niveles de expresión de uno o más marcador(es)

relacionado(s) con la endometriosis seleccionado(s), y el nivel de expresión del marcador es indicativo de la posibilidad de endometriosis en el sujeto. En una realización preferida, el/los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis se selecciona del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a un ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR definido en i), o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al ensayo del/de los producto(s) de ácido nucleico del/de los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis en métodos para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino. Este método comprende las etapas de:

- someter a ensayo una muestra de células endometriales, preferiblemente células endometriales eutópicas, obtenidas de dicho sujeto femenino, para determinar el nivel de expresión de al menos un producto de ácido nucleico de un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1
- ii) ácidos nucleicos que dan lugar a un ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y

- determinar la posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino comparando el nivel de expresión de dicho al menos un producto de ácido nucleico con un nivel inicial, establecido sometiendo a ensayo el nivel de expresión de dicho al menos un producto de ácido nucleico de un marcador relacionado con la endometriosis en un grupo de referencia negativo de muestras de células endometriales obtenidas de mujeres sin endometriosis.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al ensayo de producto(s) de proteína del/de los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis en métodos para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino. Este método comprende las etapas de:

- someter a ensayo una muestra de células endometriales, preferiblemente células endometriales eutópicas, obtenidas de dicho sujeto femenino, para determinar el nivel de expresión de al menos un producto de proteína de un marcador relacionado con la endometriosis o al menos un fragmento de este producto de proteína, seleccionándose el al menos un marcador relacionado con la endometriosis del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a un ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y

- determinar la posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino comparando el nivel de expresión del al menos un producto de proteína con un nivel inicial, establecido sometiendo a ensayo el nivel de expresión de dicho al menos un producto de proteína de un marcador relacionado con la endometriosis en un grupo de referencia negativo de muestras de células endometriales obtenidas de mujeres sin endometriosis.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino o para clasificar la endometriosis en un sujeto femenino que padece endometriosis. El kit comprende al menos una molécula de unión para unirse al/a los producto(s) de ácido nucleico o al/a los producto(s) de proteína del/de los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis. Según una realización preferida, la molécula de unión es un ácido nucleico. En otra realización preferida, la molécula de unión es un anticuerpo aislado.

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a polinucleótidos aislados, cebadores y/o sondas y a sus usos en métodos para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino o para clasificar la endometriosis en un sujeto femenino que padece endometriosis.

La presente invención también se refiere a un método para tratar la endometriosis que comprende la etapa de modular el nivel de expresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado.

Una ventaja de la presente invención es que es rápida, no invasiva y significativamente menos complicada y costosa que la laparoscopia o la laparotomía realizadas en la actualidad. A diferencia de los métodos disponibles actualmente, es posible, según la presente invención, medir directamente los niveles de expresión de los genes relacionados con la endometriosis que se expresan de manera diferenciada en las células endometriales dependiendo de la presencia/ausencia de la endometriosis y del estadio de la enfermedad con niveles relativamente altos de sensibilidad y especificidad.

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes al leer la siguiente descripción no limitativa.

Descripción detallada de la invención

5 A) Definiciones

Durante la totalidad del texto, las palabras “pares de bases” se abrevian generalmente como “pb”, las palabras “ácido desoxirribonucleico” como “ADN”, las palabras “ácido ribonucleico” como “ARN”, las palabras “ADN complementario” como “ADNc”, las palabras “reacción en cadena de la polimerasa” como “PCR”, y las palabras “transcripción inversa” como “RT”. Las secuencias de nucleótidos se escriben en la orientación 5’ a 3’, a menos que se establezca lo contrario.

Con el fin de proporcionar una comprensión incluso más clara y más consecuente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance dado en el presente documento a tales términos, se proporcionan las definiciones siguientes:

Molécula de unión: Cualquier molécula que se adhiere a una molécula diana dada de una manera adecuada, por ejemplo, enzimas a sustratos, anticuerpos a antígenos, o una cadena de ADN a su cadena complementaria.

Derivado de: Tal como se usa en el presente documento, un ADNc “derivado de” un gen cuando este ADNc se ha sintetizado a partir de un ARN mensajero codificado por este gen. Normalmente, los ADNc se sintetizan en una reacción *in vitro* catalizada por una transcriptasa inversa viral en la que una cadena complementaria de ADN se produce a partir de un molde de ARNm aislado.

Células endometriales: Se refieren a las células que forman el tejido que reviste al útero (células estromales y epiteliales). Normalmente, las células endometriales se eliminan durante el periodo menstrual de la mujer, y después vuelven a crecer y se engrosan lentamente hasta el siguiente periodo. Tal como se usa en el presente documento, “células endometriales” engloba células endometriales eutópicas así como ectópicas, en las que las células endometriales que normalmente constituyen el revestimiento de la cavidad uterina se consideran eutópicas y las exteriores al útero se consideran ectópicas.

Marcador relacionado con la endometriosis: Se refiere a cualquier producto de aminoácido o producto de ácido nucleico para el que el nivel de expresión en el endometrio de una mujer se correlaciona con la endometriosis.

Nivel de expresión: Se refiere a la cantidad de un producto de aminoácido definido o de un producto de ácido nucleico definido en una célula o tejido dados. La “expresión” se refiere más particularmente al proceso por el que la información codificada por un gen se convierte en las estructuras presentes y que operan en la célula. Tal como se usa en el presente documento, los genes expresados incluyen los que se transcriben en el ARNm y después se traducen en proteínas y los que se transcriben en ARN pero no se traducen en proteínas (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómico). De manera similar, la expresión “*nivel de expresión inicial*” se refiere al nivel de expresión que se encuentra en condiciones normales y al nivel normal de funcionamiento (por ejemplo, mujeres sin endometriosis). Los términos “*sobreexpresión*” y “*subexpresión*” se refieren a una desviación hacia arriba o hacia abajo, respectivamente en los niveles sometidos a ensayo de expresión en comparación con el nivel de expresión inicial.

Sujeto femenino: Se refiere a hembras humanas que están en edad de procrear. Según la presente invención, el sujeto femenino presentaría preferiblemente síntomas clínicos de endometriosis, tales como esterilidad y dolor pélvico.

Fragmento: Se refiere a una sección de una molécula, tal como una proteína o un ácido nucleico, y pretende referirse a cualquier parte de la secuencia de aminoácidos o nucleótido.

Gen: Se refiere a una secuencia de ADN relacionada con una única cadena polipeptídica o proteína, y tal como se usa en el presente documento incluye las regiones no traducidas en 5’ y 3’.

Que da lugar a: Tal como se usa en el presente documento, un ácido ribonucleico “da lugar a” un ADNc cuando sirve como molde para sintetizar el ADNc. Normalmente, los ADNc se sintetizan en una reacción *in vitro* catalizada por una transcriptasa inversa viral en la que se produce una cadena complementaria del ADN a partir de un molde de ARNm aislado.

Posibilidad: Tal como se usa en el presente documento en combinación con el término “endometriosis”, se refiere más particularmente a una probabilidad existente de que un sujeto femenino padezca realmente endometriosis. No se refiere a una predisposición de padecer en el futuro la enfermedad.

Producto de ácido nucleico: Cualquier molécula que tiene uno o más nucleótido(s) derivado(s) de la expresión del gen. Tal como se usa en el presente documento en combinación con la expresión “marcador relacionado con la endometriosis”, se refiere más particularmente a un ARN y fragmentos del mismo, ADNc y fragmentos de los mismos, y etiquetas de secuencia expresada (EST) cuya expresión se correlaciona con la expresión de un marcador relacionado con la endometriosis (véase anteriormente en el presente documento).

OXPHOS: Abreviatura de “fosforilación oxidativa”. Tal como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de reacciones enzimáticas acopladas a la cadena respiratoria mitocondrial por la que se fosforila el ATP, así como a los productos de ácido nucleico y de proteína implicados en estas reacciones.

5 *Fase del ciclo estrual*: se refiere al periodo del estro en el que se producen cambios fisiológicos en las mujeres como resultado de las influencias hormonales durante el ciclo menstrual o el ovárico. En resumen, en las hembras humanas, el ciclo menstrual está dividido en dos fases, concretamente, la “fase proliferativa” (también denominada fase folicular, denominada en el presente documento fase P) y la “fase secretora” (también denominada fase lútea, denominada en el presente documento fase S). La fase proliferativa normalmente se extiende desde el día 0 hasta el
10 día 14 del ciclo menstrual, y la fase secretora normalmente se extiende desde el día 15 hasta el día 28, produciéndose la ovulación en el día 14 de un ciclo menstrual normal.

Producto de proteína: se refiere a moléculas orgánicas que contienen dos o más aminoácidos que están unidos mediante la formación de enlaces peptídicos durante la traducción ribosómica de un ARN mensajero. Tal como se usa
15 en el presente documento en combinación con la expresión “marcador relacionado con la endometriosis”, se refiere más particularmente a péptidos, proteínas, glucoproteínas, y fragmentos de proteínas cuya expresión se correlaciona con la expresión de un marcador relacionado con la endometriosis (véase anteriormente en el presente documento).

20 B) Visión general de la invención

La presente invención se refiere a la detección, diagnóstico, pronóstico, clasificación y tratamiento tempranos de la endometriosis. Se describen marcadores de endometriosis en la forma de secuencias de ácido nucleico, proteínas y péptidos aislados de células endometriales humanas. Los niveles de expresión de estos “marcadores relacionados con la endometriosis” son indicativos de la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino y del estadio de la
25 endometriosis en un sujeto femenino al que ha diagnosticado que tiene endometriosis. El marcador relacionado con la endometriosis de la invención se selecciona del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- 30 ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR, o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii).

35 La tabla 2 enumera las secuencias de nucleótidos de algunos de estos marcadores relacionados con la endometriosis, también denominados por los inventores DD1 a DD16 (SEQ ID NO: 1 a 16).

C) Métodos para determinar la posibilidad de endometriosis

40 i) Marcadores relacionados con la endometriosis

Según un aspecto de la invención, los marcadores relacionados con la endometriosis se usan en un método para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino. Este método comprende las etapas de:

- 45 - someter a ensayo una muestra de células endometriales, preferiblemente células endometriales eutópicas, e incluso más preferiblemente células endometriales epiteliales eutópicas, obtenidas de dicho sujeto femenino, para determinar el nivel de expresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:
 - 50 i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
 - ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
 - 55 iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR definido en i), o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii).

Según este método, el nivel de expresión del/de los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis es indicativo de la posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino. El método comprende además la etapa de comparar el nivel de expresión para el marcador relacionado con la endometriosis con un nivel establecido de expresión inicial. El
60 nivel inicial para el/los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis se establece sometiendo a ensayo el nivel de expresión para el/los mismo(s) marcador(es) en un grupo de referencia negativo de muestras de células endometriales obtenidas de mujeres sin endometriosis.

Según una realización preferida, la subexpresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis es
65 indicativa de una mayor posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino, seleccionándose dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;

- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR tal como se define en i), o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii).

Los inventores también han encontrado que algunos marcadores relacionados con la endometriosis se modulan dependiendo de si las células endometriales se obtienen en la fase proliferativa o en la fase secretora del ciclo estrual del sujeto femenino. Las tablas 6 y 7 más adelante en el presente documento proporcionan una lista de los marcadores relacionados con la endometriosis cuyos niveles de expresión se encontró que estaban modulados en las fases proliferativa y secretora, respectivamente. Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención comprende además las etapas de: i) definir en qué fase del ciclo estrual se obtuvieron las células endometriales; y ii) seleccionar el marcador relacionado con la endometriosis, para el que debe someterse a ensayo el nivel de expresión según la fase definida en i). La fase del ciclo estrual puede evaluarse mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como examen histológico (preferiblemente de tejidos endometriales), métodos para evaluar el nivel de expresión del ARN, y métodos para evaluar los niveles de esteroides sexuales, por nombrar algunos.

En una realización preferida, las células endometriales del sujeto femenino se toman como muestra en la fase proliferativa de su ciclo estrual, y el nivel de subexpresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR tal como se define en i), o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii);

es indicativo de una mayor posibilidad de endometriosis en dicho sujeto femenino en comparación con un sujeto femenino sin endometriosis.

En otra realización preferida, las células endometriales del sujeto femenino se toman como muestra en la fase secretora de su ciclo estrual, y el nivel de subexpresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR tal como se define en i), o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii);

es indicativo de una mayor posibilidad de endometriosis en dicho sujeto femenino en comparación con un sujeto femenino sin endometriosis.

En otra realización preferida de la invención, se somete a ensayo en combinación el nivel de expresión de al menos dos marcadores relacionados con la endometriosis. Mediante la combinación de los marcadores, generalmente es posible aumentar la especificidad y la sensibilidad de los métodos de la invención. La tabla 11 contiene algunos ejemplos de combinación de marcadores relacionados con la endometriosis. Se conocen bien los métodos para someter a ensayo los niveles de expresión de los marcadores genéticos y proteicos, tales como los marcadores relacionados con la endometriosis de la presente invención. Los métodos y materiales para someter a ensayo ácidos nucleicos incluyen: técnicas basadas en BioChips, membranas y matriz de vidrio de ADNc; RT-PCR, hibridación *in situ*; estudios de fusión del promotor *in vitro* en líneas celulares o modelos de cultivo primario; técnicas de estudio de la tasa de transcripción, tales como “nuclear run-on” (núcleos aislados); enfoques de hibridación por inmunotransferencia sobre membrana; marcaje directo de los ácidos nucleicos. Los métodos y materiales para someter a ensayo proteínas y péptidos incluyen: enfoques de hibridación por inmunotransferencia sobre membrana; marcaje directo de la proteína o péptido; proteómica; citometría de flujo; inmunocitoquímica; inmunohistoquímica; y enfoques basados en ELISA. Un experto en biología molecular e inmunología sabrá cómo seleccionar, adaptar y utilizar estos métodos según su necesidad específica con el fin de obtener resultados valiosos. Por ejemplo, puede ser relativamente fácil desarrollar biochips que porten marcadores genéticos considerados los mejores en lo que se refiere a la especificidad y la sensibilidad para las matrices de hibridación de ADNc para detectar mujeres, y más particularmente mujeres que tienen síntomas relacionados con la endometriosis.

En algunos casos, la sobreexpresión de ciertos marcadores genéticos y proteicos induce a la producción de auto-anticuerpos en la sangre de las pacientes. Por tanto, la medición de estos auto-anticuerpos puede ser otra alternativa, aunque indirecta, para someter a ensayo los niveles de expresión de los marcadores genéticos y proteicos según la invención.

ii) *Productos de ácido nucleico de un marcador relacionado con la endometriosis*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a someter a ensayo productos de ácido nucleico de un marcador relacionado con la endometriosis según los métodos para determinar la probabilidad de endometriosis en un sujeto femenino. Este método comprende las etapas de:

- someter a ensayo una muestra de células endometriales, preferiblemente células endometriales eutópicas, obtenidas de dicho sujeto femenino, para determinar el nivel de expresión de al menos un producto de ácido nucleico de un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:
 - i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
 - ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- determinar la posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino comparando el nivel de expresión de dicho al menos un producto de ácido nucleico con un nivel inicial establecido.

La posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino se determina sometiendo a ensayo el nivel de expresión de al menos un producto de ácido nucleico del gen FKHR.

Según otra realización preferida, la posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino se determina sometiendo a ensayo el nivel de expresión de un ácido ribonucleico que da lugar a un ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12.

El nivel inicial del/de los marcador(es) relacionado(s) con la endometriosis seleccionado(s) se establece sometiendo a ensayo su nivel de expresión en un grupo de referencia negativo de dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis que se selecciona del grupo que consiste en: mujeres sin endometriosis. Preferiblemente, el al menos un producto de ácido nucleico es un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y este ARNm sirve como molde para la síntesis de un ADNc.

El nivel de expresión del al menos un producto de ácido nucleico puede someterse a ensayo usando métodos bien conocidos tales como biochips, membranas, y métodos basados en matriz de vidrio de ADNc; RT-PCR; hibridación *in situ*; estudios de promoterfusión *in vitro* en líneas celulares o cultivos primarios; métodos de estudio de la tasa de transcripción; hibridación por inmunotransferencia sobre membrana; y marcaje. Incluso más preferiblemente, se somete a ensayo el nivel de expresión para al menos dos marcadores relacionados con la endometriosis. También puede ser deseable definir en qué fase del ciclo estrual se obtuvieron las células endometriales con el fin de seleccionar apropiadamente el marcador relacionado con la endometriosis para el que va a someterse a ensayo un producto de ácido nucleico según esta fase.

iii) *Productos de proteína de un marcador relacionado con la endometriosis*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a someter a ensayo productos de aminoácido de un marcador relacionado con la endometriosis según los métodos para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino. Este método comprende las etapas de:

- someter a ensayo una muestra de células endometriales, preferiblemente células endometriales eutópicas, obtenidas de dicho sujeto femenino, para determinar el nivel de expresión de al menos un producto de proteína de un marcador relacionado con la endometriosis, seleccionándose el al menos un marcador relacionado con la endometriosis del grupo que consiste en:
 - i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
 - ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- determinar la posibilidad de endometriosis en el sujeto femenino comparando el nivel de expresión del al menos un producto de proteína con un nivel inicial establecido.

El nivel inicial del/de los producto(s) de proteína seleccionado(s) se establece sometiendo a ensayo su nivel de expresión en un grupo de referencia negativo de mujeres sin endometriosis.

El nivel de expresión del al menos un producto de proteína puede someterse a ensayo usando métodos bien conocidos tales como hibridación por inmunotransferencia sobre membrana; marcaje; proteómica; citometría de flujo; inmunocitoquímica; inmunohistoquímica y ELISA. Incluso más preferiblemente, se somete a ensayo en combinación el nivel de expresión de al menos dos marcadores relacionados con la endometriosis. También puede ser preferible definir en qué fase del ciclo estrual se obtuvieron las células endometriales con el fin de seleccionar apropiadamente el marcador relacionado con la endometriosis, de modo que el producto de proteína se someta a ensayo según esta fase.

D) *Métodos para clasificar la endometriosis*

Los presentes inventores también encuentran que los niveles de expresión de los marcadores relacionados con la endometriosis específicos se modulaban dependiendo del estadio de la enfermedad. La tabla 8 más adelante en el presente documento proporciona una lista de los marcadores relacionados con la endometriosis cuyos niveles de expresión se encontraron que estaban modulados dependiendo del estadio de la enfermedad.

E) *Kit*

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino o para clasificar la endometriosis en un sujeto femenino que padece la enfermedad. El kit de la invención comprende:

- al menos una molécula de unión para unirse a un producto de ácido nucleico o a un producto de proteína de un marcador relacionado con la endometriosis, seleccionándose el marcador relacionado con la endometriosis del grupo que consiste en:
 - i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
 - ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
 - iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR definido en i), o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii); y
- al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en: un soporte para la(s) molécula(s) de unión, tubos de mezclado, tampones, enzimas y sustancias para la detección de la(s) molécula(s) de unión.

Según una realización preferida, la molécula de unión es un ácido nucleico que hibrida en condiciones convencionales con un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

- a) ARNm de FKHR para el que un número de registro de GENBANK™ es AF 032885;
- b) ácidos nucleicos monocatenarios que hibridan en condiciones convencionales con el ácido nucleico definido en a);
- c) ácidos nucleicos monocatenarios obtenidos mediante transcripción inversa de un ácido nucleico definido en a) o b);
- d) fragmentos de los ácidos nucleicos definidos en de a) a c).

Tal como se usa en el presente documento, hibridación de ácido nucleico se refiere al principio de que dos moléculas de ácido nucleico monocatenario que tienen secuencias de bases complementarias volverán a formar la estructura bicatenaria favorecida termodinámicamente si se mezclan en condiciones apropiadas. Por ejemplo, puede proporcionarse una condición de rigurosidad media mediante NaCl aproximadamente de 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37°C a 55°C, mientras que puede proporcionarse una condición de rigurosidad baja mediante NaCl aproximadamente de 0,15 M a 0,9 M, a temperaturas que oscilan desde aproximadamente 20°C hasta 55°C. Por tanto, las “condiciones de hibridación convencionales” varían dependiendo de los resultados deseados.

Según otra realización preferida, la molécula de unión es un anticuerpo aislado dirigido contra al menos un producto de proteína de un marcador relacionado con la endometriosis, tal como se definió anteriormente, o dirigido contra un fragmento del/de los producto(s) de proteína.

Otros tipos de moléculas de unión incluyen pequeñas moléculas tales como azúcares y glucoproteínas.

F) *Polinucleótidos, cebadores, sondas y sus usos*

Los polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en:

- a) polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 a 10, SEQ ID NO: 12 a 16, y parte de las mismas; y
- b) polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria a los polinucleótidos definidos en a),

tienen muchos usos, particularmente como marcadores biológicos según los métodos de la presente invención, como cebadores y/o como sondas para endometriosis. También podrían usarse como molde para preparar ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios útiles en los métodos de terapia génica (antisentido, silenciamiento de genes, ARN bicatenario, etc.).

La invención también se refiere al uso de cebadores y/o sondas para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino o para clasificar la endometriosis en un sujeto femenino que padece endometriosis. Según la invención, el cebador o la sonda comprende un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- a) ARNm de FKHR para el que un número de registro de GENBANK™ es AF032885;
- b) ácidos nucleicos monocatenarios que hibridan en condiciones convencionales con los ácidos nucleicos definidos en a);
- c) ácidos nucleicos monocatenarios obtenidos mediante transcripción inversa de un ácido nucleico definido en a) o b);
- d) fragmentos de los ácidos nucleicos definidos en de a) a c).

La invención también engloba los usos de los polinucleótidos y ácidos nucleicos aislados mencionados anteriormente en los métodos para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino o en los métodos para clasificar la endometriosis en un sujeto femenino que padece endometriosis. Estos métodos pueden incluir el uso de técnicas basadas en biochips, membranas y matriz de vidrio de ADNc; RT-PCR; hibridación *in situ*; estudios de fusión del promotor *in vitro* en líneas celulares o cultivos primarios; métodos de estudio de la tasa de transcripción; hibridación por inmunotransferencia sobre membrana; y marcaje. Por ejemplo, algunos de los ácidos nucleicos aislados descritos anteriormente considerados "los mejores" en lo que se refiere a la especificidad y la sensibilidad para detectar mujeres, podrían acoplarse a un biochip para detectar mujeres con endometriosis y/o para evaluar el estadio de su enfermedad.

El método diagnóstico para la detección de la endometriosis en un sujeto femenino puede comprender el uso de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para la determinación de la posibilidad, y/o los kits, polinucleótidos aislados, sondas de ácidos nucleicos y cebadores mencionados anteriormente. Dependiendo de los marcadores relacionados con la endometriosis seleccionados, particularmente si se usan en combinación, es posible, de hecho, según la presente invención, diagnosticar a mujeres que tienen endometriosis con una sensibilidad muy alta y una especificidad muy alta.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la amplia variedad de aplicaciones potenciales de la presente invención y no pretenden limitar su alcance. Pueden realizarse en ellos modificaciones y variaciones sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. Aunque puede usarse cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica para someter a prueba a la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Ejemplo 1

Marcadores genéticos

1) Problemática

En ausencia de cualquier herramienta de diagnóstico fidedigna y no invasiva para la detección de la endometriosis, el centro de atención se situó en la identificación de genes expresados de manera diferencial en el endometrio de sujetos femeninos que padecen endometriosis (grupo Endo) cuando se comparaba con sujetos sin endometriosis (grupo Control). Para lograr esto, se utilizaron tres enfoques cuantitativos, concretamente presentación diferencial, hibridación en matriz de ADNc, y RT-PCR específica. A menos que se especifique lo contrario, todos los experimentos se han llevado a cabo utilizando ARN obtenido de la fracción glandular enriquecida del endometrio. Además, para algunos análisis, los resultados también se obtuvieron a partir de ARN aislado de biopsias de endometrio no fraccionadas.

2) Materiales y métodos

A continuación se exponen los materiales y procedimientos experimentales que se usaron para el ejemplo explicado a continuación.

Inclusión de pacientes

Los prerequisites comunes para que las pacientes se incluyeran en el estudio llevado a cabo para el presente ejemplo, tanto en el grupo control sin endometriosis como en el grupo positivo para endometriosis, fueron los siguientes:

- edad premenopáusica;
- sin menstruar en la actualidad;

ES 2 287 100 T3

- ciclos menstruales entre 21 y 35 días;
- sin salpingitis aguda;
- 5 - sin VIH, diagnóstico positivo para hepatitis B o C;
- no embarazada o habiéndose quedado embarazada en los últimos tres meses;
- no está en el periodo de lactancia en la actualidad;
- 10 - no ha utilizado un compuesto seleccionado del grupo que consiste en agonistas de GnRH, Progestinas, Danazol y anticonceptivos orales en los últimos tres meses; y
- no ha utilizado un dispositivo intrauterino (D.I.U.) en los últimos tres meses.

15 Las mujeres incluidas en el grupo positivo para endometriosis que proporcionaron biopsias del endometrio se seleccionaron entre las mujeres que se sometieron a laparoscopia y para las que se confirmó la presencia de endometriosis en el momento del examen quirúrgico. Se definieron los estadios de la enfermedad según la clasificación de la American Society of Reproductive Medicine (ASRM), tal como sigue: estadio I (mínimo), estadio II (leve), estadio III (moderado), y estadio IV (grave).

20 Para ser elegible en el grupo control, las mujeres que proporcionaron biopsias tuvieron que cumplir las condiciones siguientes:

- 25 - someterse a laparoscopia para ligadura de trompas o repermabilización tubárica;
- sin lesión por endometriosis detectada en la cavidad peritoneal en la cirugía;
- sin historia de endometriosis en los parientes de primer grado; y
- 30 - sin indicación de esterilidad.

35 Las mujeres con endometriosis (Endo) se subdividieron en dos grupos experimentales, concretamente, EXP 1 (estadios I y II) y EXP 2 (estadios III y IV). Los grupos experimentales se subdividieron adicionalmente en los grupos de fase proliferativa (P) y de fase secretora (S), basándose en la fase del ciclo menstrual indicada por las últimas menstruaciones y confirmada por el examen histológico.

Muestras de tejido

40 Se obtuvieron biopsias del endometrio de las pacientes bajo anestesia antes de la laparoscopia con una legra convencional. El tejido recogido se mantuvo en hielo y se utilizó para el experimento en el plazo de cuatro horas. Los experimentos se realizaron o bien en fracciones glandulares enriquecidas o en biopsias no fraccionadas.

Aislamiento y preparación del ARN a partir de la fracción glandular enriquecida

45 Se enriquecieron las fracciones glandulares procedentes del endometrio mediante digestión enzimática. Se cortó el tejido en primer lugar en pequeños trozos en presencia de medio HBSS (LIFE TECHNOLOGIES™). Se digirieron entonces los trozos con una mezcla enzimática que contenía pancreatina 3,4 mg/ml, hialuronidasa 0,1 mg/ml y colagenasa 1,6 mg/ml (SIGMA™) durante 50 minutos a 37°C bajo CO₂ al 5%. Tras la digestión enzimática, se separaron las células glandulares de la fracción estromal mediante exclusión por tamaños. Es decir, la suspensión de células digeridas se sometió a rondas sucesivas de filtración a través de filtros de 41 µm y 11 µm. La fracción glandular consiste en las células que quedaron retenidas en los filtros.

50 Se aisló El ARN total de las células glandulares endometriales. La fracción de células glandulares se pesó y las células se resuspendieron a una concentración de 100 mg/ml de una disolución desnaturante que contenía tiocianato de guanidina 2,7 M, tiocianato de amonio 1,3 M y acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0. Se extrajo entonces la suspensión dos veces con fenol/cloroformo antes de su precipitación con 1 volumen de isopropanol. El sedimento de ARN se lavó con etanol al 80% y se resuspendió en H₂O a una concentración final de 1 µg/µl.

Aislamiento y preparación del ARN a partir de biopsias no fraccionadas

60 Se aisló el ARN celular total directamente del tejido de biopsia de endometrio. En resumen, se homogeneizaron 200-300 mg de tejido de biopsia usando un homogeneizador eléctrico en presencia de 3 ml de TRIZOL™ (LIFE TECHNOLOGIES™). Se preparó el ARN según el protocolo del fabricante de TRIZOL™. Normalmente fueron necesarias 2 ó 3 extracciones adicionales con fenol/cloroformo para obtener una superficie de contacto clara. Se precipitó entonces el ARN y se resuspendió tal como se describió anteriormente.

Presentación diferencial

Se realizó la presentación diferencial (PD) utilizando el ARN total aislado de células glandulares o biopsias no fraccionadas según Liang y Pardee (Differential Display: Methods and Protocols, 1997, Humana Press, Totowa, N.J. págs. 1-11). Se realizaron las amplificaciones en un STRATAGENE ROBOCYCLER™ (STRATAGENE™) que implicaba 40 ciclos de 94°C (1 min), 40°C (2 min), 72°C (1 min) con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Se utilizaron los reactivos siguientes: Transcriptasa inversa de VLMM (virus de la leucemia murina de Moloney) (LIFE TECHNOLOGIES™), ³³P-dATP (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™, 2500 Ci/ mmol), y *rTaq* ADN polimerasa (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™).

Clonación de los productos de PCR

Los fragmentos identificados mediante la presentación diferencial se clonaron utilizando TA CLONING KIT™ (INVITROGEN™) según las instrucciones del fabricante. Se identificaron los clones que contenían los fragmentos deseados mediante PCR de colonia, tal como se describe en Maniatis *et al.* (Maniatis *et al.*, 1992, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y utilizando el gen lacZ-20 y cebadores inversos.

Transferencia de tipo Northern inversa

Los productos de la PCR de colonia se depositaron en membranas de nylon cargadas positivamente (BOEHRINGER MANNHEIM™) y se hibridaron con sondas de presentación diferencial marcadas con ³²P. Se seleccionaron varios clones con el patrón diferencial esperado para su secuenciación. Los clones que mostraron secuencias idénticas se aceptaron como candidatos.

Secuenciación

Se llevó a cabo la secuenciación utilizando el ABI PRISM RHODAMINE CYCLE SEQUENCING KIT™ (PE APPLIED BIOSYSTEMS™) y se ejecutó en un secuenciador automático ABI PRISM 310™ (PE APPLIED BIOSYSTEMS™).

Micromatrices de ADNc

Se estudio la expresión de los genes utilizando membranas por duplicado de HUMAN and CANCER ATLAS cDNA ARRAYS™ (CLONTECH LABORATORIES™). Se sometieron a transcripción inversa el ARN glandular (3 µg) de los individuos control y las pacientes en la misma fase del ciclo menstrual en presencia de ³²P-dATP (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™, 3000 Ci/mmol). Se llevaron a cabo las hibridaciones y los análisis según el manual del usuario proporcionado por el fabricante.

RT-PCR

El ARN celular total, aislado previamente de células glandulares o biopsias no fraccionadas tal como se describió anteriormente, se usó como molde para la producción de ADNc. En resumen, se digirió 1 µg del ARN con 1 U de ADNasa 1 (LIFE TECHNOLOGIES™) según las instrucciones del fabricante. El ARN digerido se sometió entonces a transcripción inversa en ADNc usando 200 U de transcriptasa inversa del VLMM en presencia de 0,4 µM de cebadores aleatorios (LIFE TECHNOLOGIES™), 2 mM de cada uno de dGTP, dATP, dTTP y dCTP, y tampón de reacción suministrado. Tras la incubación a 37°C durante 1 hora, la reacción se terminó sometiendo a ebullición durante 5 minutos. Se llevó a cabo la amplificación por PCR del ADNc según los protocolos convencionales descritos en Maniatis *et al.* (Maniatis *et al.*, citado anteriormente). Los ADNc se normalizaron en primer lugar mediante una serie de amplificaciones por PCR del gen control interno, la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Las reacciones de PCR contenían 5 µl de ADNc (normalizado mediante GAPDH), 0,5 µM de cada uno de dos cebadores oligonucleotídicos específicos, 0,2 mM de cada uno de dGTP, dATP, dTTP y dCTP, 1 U de *rTaq* ADN Polimerasa, y tampón de reacción suministrados. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un BIOMETRA UNO II™ o T GRADIENT THERMOCYCLER™ (BIOMETRA™) que implicaron 25-40 ciclos de 94°C (45 segundos), una temperatura de hibridación específica (45 segundos), 72°C (1 minuto) con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Las temperaturas de hibridación variaron según los cebadores oligonucleotídicos específicos utilizados, mientras que el número de ciclos varió según la abundancia del molde de ADNc en cuestión.

Transferencia de tipo Southern

Las transferencias de tipo Southern se realizaron según los protocolos convencionales descritos en Maniatis *et al.* (Maniatis *et al.*, citado anteriormente). En resumen, tras la amplificación por PCR específica de los ADNc descrita anteriormente, se separaron las muestras en geles de agarosa al 1,5% y se transfirieron a membranas de 0,45 µm BIODYNE™ (PALL CORPORATION™) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se fijaron mediante radiación UV y se hibridaron durante la noche a 65°C con sondas de plásmido específicas que se marcaron con ³²P usando un kit de marcaje de cebador aleatorio (sistema de marcaje de ADN MEGAPRIME™, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™). Los productos se visualizaron mediante autorradiografía, se exploraron y se analizaron

mediante el software MOLECULAR ANALYST™ (BIO-RAD™). Se ecualizaron las intensidades de banda basándose en la intensidad de un control interno (GAPDH).

Análisis de la secuencia

Se llevaron a cabo alineaciones de la secuencia de nucleótidos con GENBANK™ a través del software BLAST disponible en el sitio web de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nih.gov). Dado un débil porcentaje de lecturas erróneas en la secuencia en los datos y en GENBANK™, las homologías del 90% o más se consideraron como una identidad.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando MICROSOFT EXCEL™. Para el análisis estadístico, se llevó a cabo la prueba de la *t* de Student y los resultados se consideraron significativos con un valor de *p* inferior o igual a 0,05.

La especificidad se define en el presente documento como la probabilidad de ausencia de un marcador de enfermedad en el grupo control, mientras que la sensibilidad es la probabilidad de presencia del marcador de enfermedad en el grupo de endometriosis. Los cálculos para la especificidad y la sensibilidad se realizaron de la siguiente forma. En primer lugar, se establece un valor arbitrario de punto de corte en la representación gráfica de la muestra (ARN, ADNc, proteína u otros) en cuestión. Para las muestras que se regulan por incremento en el grupo de enfermedad, la especificidad se calcula contando el número de pacientes en el grupo control que están por debajo del valor de punto de corte, dividido por el número total de pacientes en ese grupo y expresado como un porcentaje; la sensibilidad se calcula contando el número de pacientes en el grupo de endometriosis que está por encima del mismo valor de punto de corte, dividido por el número total de pacientes en ese grupo y expresado como un porcentaje. Para las muestras que se regulan por disminución en el grupo de enfermedad, la especificidad se calcula contando el número de pacientes en el grupo control que están por encima del valor de punto de corte, dividido por el número total de pacientes en ese grupo y expresado como un porcentaje; la sensibilidad se calcula contando el número total de pacientes en el grupo de endometriosis que están por debajo del mismo valor de punto de corte, dividido por el número total de pacientes en ese grupo y expresado como un porcentaje.

3) Resultados

I - Presentación diferencial (PD)

Las células glandulares enriquecidas se aislaron de las biopsias endometriales y se extrajo el ARN total. Se dividieron los extractos de ARN en los grupos tanto Control como Endo en dos subgrupos según la fase del ciclo menstrual, concretamente, la fase proliferativa (P) o secretora (S). Inicialmente, se seleccionaron las señales diferenciales basándose en su aspecto en más del 50% de las de muestras de un grupo, en comparación con el otro. Las señales seleccionadas se purificaron del gel y se clonaron en *E. coli*. Varios plásmidos recombinantes para cada señal se sometieron a la etapa de validación mediante transferencia de tipo Northern inversa, tal como se describe en la presente solicitud. Se determinó la secuencia de nucleótidos y se analizó para distintos plásmidos de cada serie, y se sintetizaron cebadores específicos para la etapa siguiente.

El nivel de expresión de los candidatos se analizó adicionalmente mediante RT-PCR semicuantitativa en los diferentes grupos del ARN. Se llevaron a cabo experimentos basados en el número de ciclo y en las cantidades de ADNc para garantizar la linealidad de las reacciones de PCR. Se usó el nivel de expresión de GAPDH como control interno para normalizar las mediciones. El grupo Endo se subdividió en dos grupos experimentales: EXP 1 que incluía los estados mínimo y leve (I y II) de la enfermedad y EXP 2 que consistía en los estadios moderado y grave (III y IV) de la endometriosis. La tabla 3 resume los valores promedio por grupo para todos los marcadores relacionados con la endometriosis analizados.

Los valores de punto de corte (no mostrados) se seleccionaron para estimar el valor clínico de cada marcador, concretamente, la especificidad y la sensibilidad. Por tanto, para cada marcador, se determinó el valor de punto de corte para permitir los valores máximos de especificidad y sensibilidad. La especificidad corresponde a la probabilidad de la ausencia de un marcador en el grupo control y la sensibilidad representa la probabilidad de la presencia del mismo marcador en el grupo de pacientes.

En el presente documento se facilita una lista de todos los ADNc identificados mediante el enfoque de presentación diferencial. Para cada candidato, se facilita el número de registro de GENBANK™ de los genes homólogos en la tabla 1. Los datos de la secuencia de nucleótidos y la SEQ ID NO correspondiente se enumeran en la tabla 2.

El marcador DD1 (SEQ ID NO: 1) muestra un 94% de homología en GENBANK™ con un ADNc clonado de tejido de riñón fetal. Esta secuencia de ADNc también muestra un 100% de homología con una región en el cromosoma 22q11 (AC007064). El análisis de la expresión mostró una disminución significativa en la fase secretora del grupo EXP 1, en comparación con la fase secretora del grupo control ($p = 0,01$) (tabla 3). Con un punto de corte establecido en 0,4, se obtuvieron una especificidad del 75% y una sensibilidad del 90% (tabla 5).

El marcador DD2 (SEQ ID NO: 2) corresponde a una etiqueta de secuencia de expresión (EST) que codifica para una fosfoproteína que también se ha aislado mediante presentación diferencial de células de glioma humano. La homología engloba una región en el sentido de 5' de 40 pb (97%) y una región en el sentido de 3' de 89 pb (96%). Un hueco de 40 pb está presente en el medio de la alineación entre las dos secuencias. Se obtuvo la misma alineación con el ADNc homólogo de I-myc (HSLMYCH). Esto puede deberse a un corte y empalme alterno de un gen común en tejidos diferentes o a dos genes distintos de una familia dada. La presencia de este ADNc no se ha descrito nunca en el endometrio. Tal como se muestra en la tabla 3, esta transcripción del gen estaba regulada por disminución en el grupo endo ($p = 0,04$). El valor de punto de corte de 0,13 proporciona un 65% de especificidad y un 77% de sensibilidad (tabla 5).

El marcador DD3 (SEQ ID NO: 3) mostró un 100% de homología con el origen mitocondrial de la replicación (ori). Hasta la fecha, no se ha mapeado ningún gen que codifique para ARNm en esta región del ADN mitocondrial. Según los resultados obtenidos para el presente ejemplo mostrados en la tabla 3, la expresión está notablemente disminuida en el grupo Endo ($p = 0,01$). Los parámetros del marcador con un valor de punto de corte de 0,7 son un 63% de especificidad y un 69% de sensibilidad (tabla 5).

El marcador DD4 (SEQ ID NO: 4) mostró un 98% de homología con un ADNc aislado de tumores de colon humanos. Hasta la fecha, no se ha asociado ninguna función conocida con este gen. Tal como se muestra en la tabla 3, la expresión está significativamente disminuida en la fase secretora del grupo Endo ($p = 0,04$). Con un umbral de 1,3, el gen candidato tiene una especificidad del 83% y una sensibilidad del 85% (tabla 5).

El marcador DD5 (SEQ ID NO: 5) corresponde a un gen que tiene diversos nombres, tales como Cap43, Drg1, TDD-5, rit 42, Ndr 1, Proxy-1 o RTP, siendo Cap43 el más común y el utilizado en el presente documento. El ARNm de Cap43 tiene una región de 1759 pb en 3' sin traducir y su marco de lectura abierto previsto codifica para un polipéptido de 394 residuos de aminoácidos. Los estudios anteriores han demostrado una expresión modulada del ARNm de Cap43 en diversos tipos de células, pero no en las células endometriales ni en la endometriosis. Tal como se muestra en la tabla 3, se observó una disminución general en la fase proliferativa de todas las pacientes con endometriosis ($p = 0,03$). Un valor de punto de corte de 1,2 da como resultado un 78% de especificidad y un 79% de sensibilidad (tabla 5).

La secuencia del marcador DD6 (SEQ ID NO: 6) coincide en un 97% de homología con un archivo de secuencia genómica. Además, el segmento de ADNc de DD6 contiene una secuencia alu en el extremo 3'. Tal como se muestra en la tabla 3, se observó una disminución significativa entre el Control y EXP 1 en la fase secretora ($p = 0,018$). Un valor de punto de corte de 0,4 da los parámetros siguientes: especificidad del 89%, sensibilidad del 100% para EXP 1 (tabla 5).

Varias EST fueron idénticas a la secuencia DD7 (SEQ ID NO: 7). Todas las secuencias conocidas clonadas de tejidos transformados tales como adenocarcinoma de páncreas, neoplasia intraepitelial prostática o un carcinoma endometrial moderadamente diferenciado. El ADNc de DD7 también contiene una secuencia alu. Tal como se muestra en la tabla 3, se observó una grave disminución en la expresión génica para este marcador en la fase proliferativa del grupo Endo ($p = 0,019$). Se encontró una especificidad del 80% y una sensibilidad del 70% con un valor de punto de corte de 0,5 (tabla 5).

Las homólogas de secuencia indicaron que la secuencia del marcador DD8 (SEQ ID NO: 8) era idéntica a un gen clonado de células Jurkat, cerebro y otros tejidos. En la tabla 3, se observó una ligera disminución, aunque significativa, en la expresión de DD8 en el grupo EXP 1 ($p = 0,02$), con valores de especificidad y sensibilidad del 67% y el 60% respectivamente, en un valor de punto de corte de 0,6 (tabla 5).

El marcador DD9 (SEQ ID NO: 9) corresponde a la subunidad III de la enzima mitocondrial, NADH deshidrogenasa, que está implicada en el metabolismo del oxígeno celular. Este gen desempeña un papel clave en la cadena de transporte de electrones y producción de energía. Tal como se observa en la tabla 3, se detecta un aumento sustancial en la fase proliferativa del grupo Endo (EXP 1 y EXP 2) ($p = 0,008$). Un valor de punto de corte de 0,2 proporciona una especificidad del 70% y una sensibilidad del 59% (tabla 4).

El marcador DD10 (SEQ ID NO: 10) corresponde a la subunidad II de la NADH deshidrogenasa. Como con DD9, este producto génico es parte del complejo enzimático respiratorio situado en la mitocondria. La totalidad de la enzima se compone de 12 polipéptidos diferentes. En la tabla 3, la validación de este marcador mostró un nivel de expresión mayor en la fase proliferativa del grupo EXP 1 ($p = 0,04$). Se evaluó el valor diagnóstico el gen con un valor de punto de corte de 0,2 dando una especificidad del 71% y una sensibilidad del 71% (tabla 4).

El marcador DD11 (SEQ ID NO: 11) corresponde a la citocromo oxidasa (CO3) (descrita más adelante).

El marcador DD12 (SEQ ID NO: 12) corresponde al dominio de proteína Forkhead (FKHR) del factor de transcripción. Su presencia en el endometrio no se ha notificado nunca en la bibliografía. En la tabla 3, el análisis de la expresión de este marcador en ARN de tejido endometrial no fraccionado mostró una disminución de expresión en el grupo Endo ($p = 0,015$). Se evaluó el marcador con un valor de punto de corte de 23 con una especificidad del 81% y una sensibilidad del 56% cuando se consideraron ambas fases (tabla 5). Cuando se analizó la expresión de DD12 mediante transferencia de tipo Northern en muestras de ARN de biopsia no fraccionada, se detectó una disminución significativa en el grupo en comparación con los controles ($p = 0,05$) (tabla 5). Usando un valor de punto de corte

de 0,4, la especificidad fue del 55% y la sensibilidad fue del 68%. Este resultado está de acuerdo con la observación inicial del inventor al usar RT-PCR.

El marcador DD13 (SEQ ID NO: 13) corresponde a un ARN mensajero del gen hUCC1. El mismo ADNc se clonó previamente a partir de cáncer de colon. En la tabla 3, el análisis de la expresión de este marcador con ARN de tejido no fraccionado mostró un nivel de expresión mayor en el grupo EXP 2 ($p = 0,04$). Se evaluó el valor diagnóstico del gen con un valor de punto de corte de 0,5 dando una especificidad del 62% y una sensibilidad del 64% en el grupo EXP 2 (tabla 4).

La secuencia del marcador DD14 (SEQ ID NO: 14) es idéntica en un 98% a un ADNc humano clonado recientemente que codifica para una supuesta proteína morforreguladora unida a la membrana que muestra homología con paralemmina, una proteína morforreguladora unida a la membrana. Tal como se observa en la tabla 3, se detecta un aumento en el grupo Endo (EXP 1 y EXP 2) con ARN de biopsia no fraccionada ($p = 0,04$). Un valor de punto de corte de 1,2 proporciona una especificidad del 78% y una sensibilidad del 58%, cuando sólo se considera la fase S (tabla 4).

El marcador DD15 (SEQ ID NO: 15) corresponde a la proteína de transporte de citrato, uno de los marcadores del síndrome de DiGeorge en la región de 22q11. Tal como se muestra en la tabla 3, este marcador muestra en el ARN de biopsia no fraccionada un aumento sustancial de la expresión en el grupo Endo ($p = 6,10^{-4}$). Se obtuvieron una especificidad del 85% y una sensibilidad del 79% con un valor de punto de corte de 0,18 (tabla 4).

La secuencia del marcador DD16 (SEQ ID NO: 16) muestra un 90% de homología con algunas EST humanas y un 82% de homología con el gen de ARNr 12S mitocondrial humano. Tal como se muestra en la tabla 3, la expresión de este marcador estaba regulado por disminución en el grupo Endo del ARN de biopsia no fraccionada ($p = 3 \times 10^{-5}$). Con un valor de punto de corte de 2, este marcador mostró una especificidad del 70% y una sensibilidad del 78% (tabla 5).

II - Otros enfoques

En el presente ejemplo, se usó otra técnica semicuantitativa, concretamente transferencia de tipo Northern inversa con matrices de ADNc, para identificar a otros genes que se expresaban de manera diferenciada en la endometriosis. El análisis de validación final se realizó mediante RT-PCR normalizada, de manera similar al enfoque de presentación diferencial. La tabla 1 facilita el número de registro de GENBANKTM conocido para cada gen que se identificara, según la presente invención, como un marcador relacionado con la endometriosis.

El factor 1α inducido por hipoxia (HIF- 1α) es una de las dos subunidades de un factor de transcripción implicado en el estrés oxidativo. Tal como se observa en la tabla 3, el análisis estadístico mostró un aumento significativo del ARNm de HIF- 1α en el grupo Endo ($p = 0,028$). Con un valor de punto de corte de 1,1, se obtuvieron una especificidad del 65% y una sensibilidad del 72%. Cuando se analizó la expresión de HIF- 1α mediante transferencia de tipo Northern en muestras de ARN de biopsia no fraccionada, se detectó un aumento significativo en la fase P del grupo Endo, en comparación con la fase P control ($p = 0,019$) (tabla 4). Usando un valor de punto de corte de 0,95, la especificidad fue del 83% y la sensibilidad fue del 80%. Este resultado está de acuerdo con la observación inicial de los inventores en el ARN de las células epiteliales.

El translocador nuclear del receptor del hidrocarburo de arilo (ARNT) (o HIF- 1β) es la segunda subunidad del complejo de transcripción inducido por hipoxia. De hecho, el ARNT tiene un doble papel: puede acoplarse a HIF- 1α como en el caso de la hipoxia, pero también puede formar un heterodímero con el receptor de hidrocarburo aromático (arilo) (AhR) para contrarrestar situaciones tóxicas. En la endometriosis, el gen de ARNT se transcribe a una tasa mayor que la observada para su pareja, HIF- 1α . Tal como se observa también en la tabla 3, se registró un aumento significativo en las pacientes en fase proliferativa del grupo Endo ($p = 0,02$). La especificidad de este marcador fue del 67% y la sensibilidad del 83% con un valor de punto de corte de 0,6 (tabla 4). Estos parámetros son comparables con los de HIF- 1α en la fase proliferativa. Los patrones de expresión comparables para HIF- 1α y ARNT es un fuerte argumento en favor de la implicación de la ruta de estrés oxidativo (OXPHOS) en la endometriosis.

La adenilato cinasa es una enzima ubicua que contribuye a la homeostasis de la composición de adenina y guanina celular. La isoforma de isoenzima 3 de adenilato cinasa (AK3) se ubica exclusivamente en la membrana interna de la mitocondria y su actividad está implicada en la transferencia de energía. Su modulación se ha asociado con la hipoxia y, más específicamente, con la actividad de HIF- 1α . En la tabla 3, se observó una intensa regulación por disminución de la expresión de AK3 en el grupo EXP 1 ($p = 0,005$). El punto de corte de 0,75 produjo una especificidad del 68% y una sensibilidad del 82% (tabla 5).

La isoforma 1 del transportador de la glucosa (Glut-1) desempeña un papel importante en el metabolismo de la energía celular. Tal como se mencionó anteriormente, la expresión de Glut-1 está regulada por el complejo de factor de transcripción HIF- 1α /ARNT. Además, la expresión de Glut-1 se induce en diversas circunstancias, tales como estrés oxidativo o transformación celular. En la tabla 3, se observó una regulación por incremento significativa en la expresión de Glut-1 en el grupo EXP 2, en comparación con el grupo control ($p = 0,037$). Además, la especificidad y la sensibilidad de Glut-1 son del 71% y del 67% respectivamente, cuando se usa un valor de punto de corte de 1 (tabla 4).

La respiración celular que se produce en la mitocondria da como resultado la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS). La exposición crónica a ROS puede dar como resultado la lesión oxidativa permanente a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos celulares y mitocondriales. Para protegerse frente a la lesión oxidativa producida por estos productos tóxicos, las células de mamífero han desarrollado mecanismos protectores. Las enzimas detoxificantes incluyen manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidase (GPx), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST). MnSOD se regula por incremento en la transcripción en la mitocondria para detoxificar en anión superóxido (O_2^-) convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El análisis de la expresión de MnSOD en la tabla 3 demuestra una regulación por incremento general y significativa en la totalidad del grupo Endo, en comparación con el grupo control ($p = 0,017$). Con un punto de corte de 0,9, la especificidad de MnSOD fue del 76% y su sensibilidad fue del 58%. Se obtuvieron resultados similares con ARN de biopsia no fraccionada, y se detectó una elevación significativa en todo el grupo Endo ($p = 0,003$). Con un valor de punto de corte de 0,9, el marcador mostró una especificidad del 81% y una sensibilidad del 53% (tabla 4).

Tal como se trató anteriormente, GPx está implicado en la ruta de detoxificación de ROS en la mitocondria. Más específicamente, GPx convierte el H_2O_2 producido por MnSOD en H_2O . El análisis estadístico mostró un aumento significativo en la expresión del ARNm de en el grupo Endo, en comparación con los controles ($p = 1,7 \times 10^{-11}$), tal como se muestra en la tabla 3. Esto dio como resultado una especificidad del 100% y una sensibilidad del 87,5%, cuando se usa un valor de punto de corte de 1,2 (tabla 4).

En los sitios extra-mitocondriales, tales como peroxisomas, el H_2O_2 producido por MnSOD se convierte en H_2O por la catalasa (CAT). Por tanto, CAT funciona en la detoxificación de ROS protegiendo a las células del H_2O_2 que se genera dentro de ellas. En el presente ejemplo, se observó una disminución significativa en la expresión de ARNm de CAT en el ARN de biopsia no fraccionada en la fase secretora del grupo Endo, en comparación con los controles ($p = 0,001$), tal como se muestra en la tabla 3. Usando un valor de punto de corte de 0,2, la especificidad y la sensibilidad de CAT es del 83% y del 78%, respectivamente (tabla 5).

La superfamilia de genes de la glutatión S-transferasa (GST) es uno de los principales sistemas de eliminación de radicales libres y detoxificación en células de mamífero. En el presente ejemplo, se observó una disminución significativa en la expresión de GST en el grupo EXP 1, en comparación con los controles ($p = 0,026$), tal como se ilustra en la tabla 5. Un análisis directo de la tabla 3 también muestra un aumento en la expresión de GST en el grupo EXP 2. Según un valor de punto de corte de 0,21, los parámetros para el grupo EXP 1 serían una especificidad del 54% y una sensibilidad del 74% (tabla 5).

La óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe) cataliza la oxidación de la L-arginina para dar óxido nítrico (ON) y citrulina. Los informes previos han descrito una regulación por incremento en el nivel de proteína en el endometrio de las pacientes con endometriosis durante la fase secretora del ciclo (Ota *et al.*, Fertility and Sterility (1998) 69:303-308). En el presente ejemplo, se observó una disminución significativa en la expresión de ONSe cuando se compararon las fases proliferativas del grupo control y las fases proliferativas del grupo Endo como un todo ($p = 0,027$) (véase la tabla 3). Usando un valor de punto de corte de 0,1, podría definirse una especificidad y una sensibilidad del 77% y del 65%, respectivamente (tabla 5).

Se publicó que el gen de la denominada citocromo oxidasa 3 (CO3) estaba regulado por incremento en los hepatocitos mediante H_2O_2 y/u homocisteína. La secuencia amplificada en el presente ejemplo correspondió a varios ADNc en GENBANKTM, tales como el gen 14 inducible por hipoxia que, de hecho, estaba en la región del ARNr 16S del genoma mitocondrial humano, y con el ADNc de TI-227H, un marcador metastásico. Finalmente, la secuencia del gen de CO3 es completamente homóloga a la secuencia de DD11 (aislada mediante presentación diferencial). El análisis de la expresión génica de CO3 (y de DD11) reveló una disminución específica de la fase secretora, tal como se observa en la tabla 3, cuando se comparan los grupos control y Endo ($p = 0,002$). Cuando se usa un valor de punto de corte de 0,58, la especificidad y la sensibilidad de este marcador fueron del 83% y del 79%, respectivamente (tabla 5).

El ARNr 12S es uno de los dos genes del ARNr codificados por el genoma mitocondrial. En el presente ejemplo, se observó una disminución significativa en el ARNr 12S en ARN de biopsia no fraccionada en el grupo EXP 1, en comparación con los controles ($p = 0,02$), tal como se ilustra en la tabla 3. Usando un valor de punto de corte de 1, la especificidad y la sensibilidad del ARNr 12S son del 77% y del 67%, respectivamente (tabla 5).

TI-227H es un gen nuclear que tiene homologías con CO3, tal como se describió anteriormente. Como resultado de estas similitudes de secuencia, los presentes inventores se interesaron en determinar si las dos secuencias eran, de hecho, el mismo gen, o quizá pseudogenes. Resulta interesante que el análisis de la expresión del ARNm de TI-227H en ARN de biopsia no fraccionada, descrito en el presente ejemplo, demostró resultados diferentes de los obtenidos con CO3, lo que sugiere que las dos secuencias proceden de genes diferentes. A diferencia de la expresión de CO3 que disminuía en la totalidad del grupo Endo, la expresión de TI-227H disminuía significativamente en el grupo EXP 2, en comparación con los controles ($p = 2 \times 10^{-8}$), tal como se muestra en la tabla 3. La especificidad y la sensibilidad de TI-227H son del 81% y del 100%, respectivamente, cuando se usa un valor de punto de corte de 0,15 (tabla 5).

La citocromo oxidasa 2 (CO2) es una enzima codificada en la mitocondria que participa en la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial y, por tanto, en el proceso de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que proporciona energía esencial a las células. Tal como se muestra en la tabla 3, se encontró que la expresión de ARNm de CO2 en

ARN de biopsia no fraccionada disminuía en la fase proliferativa de EXP 1, en comparación con los controles ($p = 0,02$). Cuando se usa un valor de punto de corte de 0,2, la especificidad y la sensibilidad de CO2 son del 64% y del 69%, respectivamente (tabla 5). Hay pruebas experimentales notificadas en la bibliografía que demuestran cambios en el metabolismo del hierro en respuesta al estrés oxidativo. Una de las enzimas clave en esta ruta es la aconitasa situada en la mitocondria.

El análisis de la expresión génica de la aconitasa (tabla 3) demostró una disminución en la fase S del grupo EXP 1 ($p = 0,005$) y también en la fase P de EXP 2 ($p = 0,04$). El análisis de los valores medios de las muestras de la fase P muestra una disminución de la fase P de ambos grupos (EXP 1 y EXP 2), pero sólo el último es significativamente inferior que el grupo control. Dado que la disminución más notable se observó en la fase S de EXP 1, se evaluó el poder diagnóstico de la aconitasa partiendo de esta base. Con un punto de corte de 0,11 se calcularon una especificidad del 80% y una sensibilidad del 86% (tabla 5).

Codificado por un gen nuclear, el translocador del nucleótido de adenina 1 (ANT-1) se sitúa dentro de la membrana interna mitocondrial. ANT-1 desempeña un importante papel en OXPHOS, intercambiando ATP recién sintetizado por ADP consumido. Hasta la fecha, no se ha notificado la modulación de la expresión de ANT-1 en las biopsias de endometrio. En el presente ejemplo, se encontró que la expresión del ARNm de ANT-1 analizada mediante RT-PCR en ARN de biopsia no fraccionada disminuía en la fase proliferativa del grupo Endo, en comparación con los controles ($p = 0,007$), tal como se muestra en la tabla 3. Cuando se usa un valor de punto de corte de 1, ANT-1 tiene una especificidad del 86% y una sensibilidad del 74% (tabla 5). Este resultado se confirmó mediante transferencia de tipo Northern ($p = 0,016$) por la que los valores de la especificidad y la sensibilidad fueron del 75% y del 73%, respectivamente, cuando se usó un valor de punto de corte de 0,042 (tabla 5).

La ATP sintasa, también conocida como Complejo V de la ETC, está codificada por dos genes mitocondriales (ATPasa 6 y ATPasa 8) y 12 genes nucleares. De acuerdo con su papel crítico en OXPHOS, las mutaciones en la ATP sintasa se han asociado con enfermedades mitocondriales. Tal como se muestra en la tabla 3, la expresión la subunidad β de la ATP sintasa en ARN de biopsia no fraccionada aumentó en el grupo Endo, en comparación con los controles ($p = 1 \times 10^{-3}$). Resulta interesante que cuando se considera sólo la fase proliferativa del grupo Endo, el análisis estadístico llega a ser $p = 8 \times 10^{-4}$. Cuando se usa un valor de punto de corte de 4, la especificidad y la sensibilidad de la ATP sintasa (subunidad β) es del 77% y del 75%, respectivamente, cuando se comparan el grupo Endo y los controles. Cuando se analiza la fase P del grupo Endo, la especificidad es del 93% y la sensibilidad es del 64% (tabla 4).

La leucemia/linfoma-2 de células B (Bcl-2) es una proteína anti-apoptótica codificada en el núcleo que se sitúa en la membrana externa de la mitocondrial. Resulta interesante que la expresión de Bcl-2 parece estar dirigida por el estradiol en el endometrio durante la totalidad del ciclo ovárico, por lo que se observa una alta expresión de Bcl-2 en el endometrio proliferativo y está disminuida en la fase secretora (Vaskivuo *et al.* (2000) Mol Cell Endocrinol 165:75-83). Estudios anteriores han analizado la expresión de Bcl-2 en las células glandulares frente a las estromales, y en las fracciones endometriales eutópicas frente a las ectópicas (Meresman *et al.* (2000) Fertil. Steril. 74(4): 760-6; Jones *et al.* (1998) Hum. Reprod. 13(12): 3496-502). En el presente estudio, la expresión de Bcl-2 en el ARN de biopsia de endometrio no fraccionada disminuyó en el grupo Endo, en comparación con los controles ($p = 0,01$), tal como se muestra en la tabla 3. La especificidad y la sensibilidad de la expresión de Bcl-2 son del 54% y del 82%, respectivamente, cuando se usa un valor de punto de corte de 4 (tabla 5).

El protooncogén humano c-jun (c-jun) es uno de los principales factores de transcripción ubicuos que forma el complejo AP1 con c-fos. En el presente ejemplo, se analizó la expresión de c-jun y se observó una regulación por incremento significativa durante la fase secretora del grupo EXP 1 ($p = 0,05$) (véase la tabla 3). Con un valor de punto de corte de 0,7, se obtuvieron los siguientes parámetros para el grupo en fase S de EXP 1: especificidad del 75%, sensibilidad 67% (tabla 4). Cuando se probó en ARN de biopsia no fraccionada, la regulación por incremento de c-jun fue significativa para el grupo Endo, en comparación con el grupo control ($p = 0,005$). Con un valor de punto de corte en 1, se determinaron una especificidad del 76% y una sensibilidad del 65% (tabla 4).

El factor de transcripción del promotor en el sentido de 5' de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TF) es un importante regulador de la P450 aromatasa (P450arom), que participa en la biosíntesis de estrógenos. En las células estromales del endometrio eutópico, la unión de COUP-TF a una región en el sentido de 5' del promotor de la aromatasa media la inhibición de la transcripción de la aromatasa, evitando así la producción aberrante de estrógenos. Tal como se muestra en la tabla 3, la expresión del ARNm de COUP-TF disminuyó en la fase secretora de las muestras de Endo, en comparación con los controles ($p = 0,01$) en biopsias de ARN no fraccionadas. Usando un valor de punto de corte de 0,075, la especificidad y la sensibilidad de COUP-TF son del 83% y del 78%, respectivamente (tabla 5).

Las interleucinas participan en el proceso inflamatorio, tal como se encuentra en enfermedades como la endometriosis. El análisis de la transcripción de la IL-1 β en el presente ejemplo reveló un patrón de expresión totalmente afectado en el grupo Endo, mientras que el nivel es bastante constante en el grupo control (véase la tabla 3). En particular, se observó una disminución significativa en la expresión de IL-1 β en el grupo EXP 2 ($p = 0,0002$). Basándose en un gráfico de dispersión (no mostrado) se determinaron dos valores de punto de corte, uno para un valor medio para el grupo control y el otro para su desviación estándar correspondiente. Los valores fuera de este intervalo se identificaron como que correspondían a pacientes con una alta posibilidad de padecer endometriosis. Se determinaron una especificidad del 78% y una sensibilidad del 93% para el valor medio del grupo control de $0,98 \pm 0,28$ (tabla 5).

Las conexinas participan en las interacciones celulares y, más específicamente, en estructuras tales como uniones de huecos. Su expresión está regulada generalmente por esteroides. La conexina 43 (Cx43) parece estar regulada por el estradiol. Generalmente en el endometrio, la conexina 43, así como algunas otras conexinas, muestran una mayor expresión mediante inmunohistoquímica en aproximadamente 11-15 días del ciclo menstrual. Se cree que participan específicamente en la implantación, por ejemplo durante el embarazo. Una publicación notificó una expresión aberrante de la conexina 43 en todas las muestras de tejido epitelial ectópico en lesiones de endometrio. Ningún estudio ha medido nunca el nivel de expresión de la conexina 43 en células endometriales eutópicas. En el presente ejemplo, se observó una regulación por incremento del ARNm de Cx43 en el grupo EXP 1, en comparación con los controles ($p = 0,048$) (tabla 3), una diferencia que fue incluso más significativa cuando sólo se consideró la fase proliferativa del grupo EXP 1 ($p = 0,02$). Con un valor de punto de corte de 1,3, se obtuvieron una especificidad del 74% y una sensibilidad del 48% para el grupo EXP 1 (tabla 4). Considerando la fase proliferativa del grupo EXP 1, el marcador es más potente, puesto que la especificidad y la sensibilidad son del 77% y del 64%, respectivamente (tabla 4). Las proteínas de choque térmico (HSP) a menudo se inducen para proteger a las células frente a diversos estreses. Más específicamente, la proteína de choque térmico 70 (HSP 70) se induce en respuesta al plegamiento erróneo de proteínas, al daño en el ADN, al estrés oxidativo metabólico y la hipoxia. En el presente ejemplo se informa de que la modulación del ARNm de HSP 70 en mujeres con endometriosis está tremendamente elevado en el grupo Endo, en comparación con el grupo control ($p = 0,01$) (véase la tabla 3). Como marcador para la endometriosis, la especificidad y la sensibilidad de HSP 70 fueron del 73% y del 61%, respectivamente, cuando se usa un valor de punto de corte de 0,6 (tabla 4). Con ARN de biopsia no fraccionada, también se detectó un aumento significativo en la fase proliferativa ($p = 0,014$), teniendo por tanto el marcador una especificidad del 71% y una sensibilidad del 78% con un punto de corte en 0,25 (tabla 4).

La proteína de choque térmico 90 (HSP 90) es parte de un sistema de proteína chaperona que participa en la señalización inducible por esteroides e inducible por toxinas exógenas. En el presente ejemplo, el análisis de HSP 90 con respecto a la endometriosis reveló una marcada disminución en la expresión génica cuando se compararon mujeres en el grupo EXP 2 con los controles ($p = 4,3 \times 10^{-5}$) (véase la tabla 3). Cuando se usó un valor de punto de corte de 0,17 en el análisis del grupo EXP 2 en comparación con el grupo control, la especificidad y la sensibilidad fueron del 75% y del 100%, respectivamente (tabla 5).

La fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa 4 (GPx4 o PHGPx) es responsable de reducir los hidroperóxidos que se producen en las membranas peroxidadas y en las lipoproteínas oxidadas. En el ARN de biopsia no fraccionada, mostrado en la tabla 3, la expresión del ARNm de GPx4 disminuyó en la fase secretora del grupo EXP 1, en comparación con los controles ($p = 5 \times 10^{-3}$). Utilizando un punto de corte de 0,1, la especificidad de GPx4 es del 83% y la sensibilidad es del 75% (tabla 5).

La proteína regulada por glucosa 78 (GRP 78) es una proteína de respuesta al estrés relacionada con HSP70 que está inducida por agentes o estados que afectan adversamente a la función del retículo endoplasmático, tal como la homocisteína. En el presente ejemplo, la expresión de GRP 78 en ARN de biopsia no fraccionada disminuyó en la fase secretora del grupo Endo, en comparación con los controles ($p = 6 \times 10^{-3}$), tal como se muestra en la tabla 3. La especificidad y la sensibilidad de GRP 78 son del 92% y del 78%, respectivamente, cuando se usa un valor de punto de corte de 3.

La ciclooxigenasa-2 (cox2), también denominada prostaglandina sintasa-2 (PG-2), participa en la síntesis de prostaglandinas. Se ha tratado su posible implicación en la endometriosis en relación con el aumento de la actividad de la aromataasa en las lesiones ectópicas pero, hasta la fecha, no hay pruebas de regulación errónea de cox2 en las células endometriales eutópicas. En ARN de biopsia no fraccionada, mostrado en la tabla 3, la expresión del ARNm de cox2 aumentó significativamente en el grupo EXP 1, en comparación con los controles ($p = 0,01$). Usando un valor de punto de corte de 6, la especificidad de COX2 es del 69% y la sensibilidad es del 62% (tabla 4).

III - Combinación de marcadores

Habiendo encontrado muchos marcadores genéticos expresados de manera diferencial en los grupos control y Endo, los inventores probaron la hipótesis de que los genes expresados de manera diferencial usados en combinación podrían proporcionar una herramienta diagnóstica más poderosa que la evaluación de los genes individuales. Esto es especialmente cierto dado el alto nivel de heterogeneidad genética entre los individuos.

La tabla 11 muestra ejemplos de combinaciones de marcadores genéticos. La especificidad y la sensibilidad se calcularon tal como se describió anteriormente (véase el análisis estadístico). En resumen, la especificidad indica la ausencia de un marcador en el grupo control y la sensibilidad indica la presencia de un marcador en el grupo ENDO. Los 3 marcadores genéticos de interés se sometieron a prueba en las mismas muestras de paciente individual, permitiendo de esta forma que se realizaran combinaciones. Para cada muestra de paciente, a la presencia de un marcador dado se le asignó una puntuación de 1, mientras que a la ausencia del mismo marcador se le asignó una puntuación de 0 (la presencia y la ausencia de un marcador se definen según esté por encima o por debajo del valor de punto de corte asignado). Tras la aplicación de este algoritmo a los 3 genes de interés, las puntuaciones del marcador se combinaron y se convirtieron en porcentajes según lo siguiente: para las combinaciones de 2 marcadores, 0% representa una puntuación de 0 para ambos marcadores, 50% representa una puntuación de 0 para 1 marcador y una puntuación de 1 para el otro marcador, y 100% representa una puntuación de 1 para ambos marcadores; para las combinaciones de 3 marcadores, 0% representa una puntuación de 0 para los 3 marcadores, 33% representa una

puntuación de 1 para 1/3 de los marcadores, 67% representa una puntuación de 1 para 2/3 de los marcadores, y 100% representa una puntuación de 1 para los 3 marcadores. Estos porcentajes se representaron entonces en gráficos y se calcularon nuevos valores de especificidad y sensibilidad (estos valores se indican en la tabla 11).

- 5 Un ejemplo de la potencia de las combinaciones de los marcadores se muestra en la tabla 11, en el que una combinación de dos marcadores aumentó la sensibilidad del diagnóstico hasta el 100%. Una combinación de tres marcadores aumentó tanto la especificidad como la sensibilidad. Otras combinaciones de numerosos marcadores también producirán una especificidad y sensibilidad aumentadas, mejorando así los métodos y el kit según la presente invención.

10 4) *Conclusión*

- Los resultados presentados en el presente documento muestran que los marcadores genéticos enumerados en la tabla 1 son todos excelentes marcadores de la endometriosis. El uso de genes expresados de manera diferencial representa, por tanto, un medio alternativo para identificar individuos enfermos y clasificar la endometriosis. Mediante la combinación de dos, tres y más de estos marcadores, también es posible aumentar la especificidad y la sensibilidad del diagnóstico.

- Muchos de los genes entre los marcadores de la presente invención están asociados con las mitocondrias. Cinco de dieciséis marcadores DD estaban en esta categoría. Esta observación condujo a los inventores a investigar adicionalmente en este campo. De hecho, fisiológicamente varias reacciones metabólicas clave, tal como la fosforilación oxidativa (OXPHOS) implican a la mitocondria. Por tanto, tal como se muestra en la tabla 3, se observó la modulación de 22 genes relacionados con OXPHOS y/o con la mitocondria, tales como HIF-1 α , ARNT o NADH deshidrogenasa, en el tejido endometrial de pacientes con endometriosis. Esto sugiere fuertemente que la ruta de OXPHOS está implicada en la endometriosis y que es posible determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino sometiendo a ensayo una muestra de células endometriales para determinar el nivel de expresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis implicado en la ruta de fosforilación oxidativa y/o la ruta de sensores de potenciales redox (OXPHOS) interna de dichas células endometriales.

- Resulta interesante que tres ADNc que se expresaban de manera diferenciada que contenían secuencias alu se aislaron y se identificaron como marcadores relacionados con la endometriosis. De manera similar, otro grupo heterogéneo de marcadores relacionados con la endometriosis fueron los marcadores del estrés celular (proteínas de choque térmico, CAP43, Conexina 43, ARN helicasa). Por tanto, es tentador especular que la mayoría de los genes que contienen una secuencia alu y/o marcadores de estrés celular podrían usarse como marcadores relacionados con la endometriosis según la presente invención.

35 Ejemplo 2

Marcadores proteicos

40 1) *Problemática*

- Habiendo encontrado muchos marcadores genéticos que se expresan de manera diferenciada en los grupos control y Endo de mujeres, los inventores probaron la hipótesis de la medición de proteínas de producto(s) de proteína derivado(s) de estos marcadores genéticos también podría ser un enfoque adecuado para el diagnóstico de la endometriosis.

- Dado que el marcador DD5 (concretamente Cap43) estaba mal regulado en el nivel del ARNm en el endometrio de las mujeres que padecen endometriosis, los presentes inventores han caracterizado la expresión de la proteína codificada por el mismo gen. Esto se llevó a cabo mediante inmunotransferencia tipo Western.

- El ARNm de Cap43 tiene una región de 1759 pb en 3' sin traducir y su marco de lectura abierto previsto codifica para una poliproteína de 394 residuos de aminoácidos con un peso molecular deducido de 43.400 Dalton y un punto isoeléctrico de 5,3. Estudios anteriores han demostrado una expresión modulada del ARNm del gen de Cap43 en diversos tipos de células. Sin embargo, la proteína Cap43 nunca se ha usado como un marcador en ninguna enfermedad, incluyendo la endometriosis. En el presente ejemplo, los extractos de proteína aislados de biopsias de tejido endometrial procedentes de poblaciones control y enfermas se exploraron para determinar la expresión de la proteína Cap43 y los resultados presentados en el presente documento muestran que esta proteína es un marcador adecuado para la endometriosis.

60 2) *Materiales y métodos*

Inclusión de pacientes y muestras de tejidos

- Se obtuvieron biopsias de tejido procedentes de poblaciones control y positivas para endometriosis, tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1 en el presente documento.

Aislamiento y preparación de proteínas de biopsias no fraccionadas

Se aislaron extractos de proteínas celulares totales directamente de las biopsias de tejido. En resumen, se homogeneizaron 200-300 mg de tejido de biopsia usando un homogeneizador eléctrico en presencia de 3 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 que contiene NaCl 0,1 M, SDS al 2%, EDTA 5 mM y leupeptina 0,5 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml y PMSF 200 µg/ml) a temperatura ambiente, se lisaron durante 10 minutos a 100°C y se centrifugaron durante 20 minutos a 14000 g. La determinación de proteínas de los sobrenadantes se realizó utilizando el ensayo de proteínas DC (BIO-RAD™) según las instrucciones del proveedor. Las muestras se diluyeron en Tris-HCl 20 mM pH 7,5 y se transfirieron en manchas sobre membranas de nitrocelulosa (2,5 y 5 µg) usando un dispositivo de transferencia de manchas de 96 pocillos GIBCO-BRL™. Las membranas se bloquearon durante la noche en leche en polvo seca al 2,5% en tampón TST (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 que contenía NaCl 100 mM y TWEEN-20™ al 0,1%), se incubaron en una disolución de o bien 1:2000 de antisuero primario anti-CAP 43 (SKULDTECH™, Université Montpellier II, Francia) o bien anti-actina (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY™) durante una hora, se lavaron dos veces durante 5 min con TST y se incubaron durante otra hora con un anticuerpo policlonal específico de inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasas del rábano (HRP) (dilución 1:2000 en leche-TST al 5%), se lavaron 3 veces durante 10 min con TST y se visualizaron con reactivo de ECL (electroquimioluminiscencia) según el protocolo del proveedor (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™). Los niveles de Cap43 con respecto a la actina se midieron explorando los autorradiogramas y se llevó a cabo la densitometría de puntos utilizando el programa MOLECULAR ANALYST™.

3) Resultados

Utilizando anticuerpos policlonales anti-CAP 43, los presentes inventores exploraron extractos de proteínas aislados de biopsias de tejido endometrial procedentes de poblaciones control y enferma. Tal como se muestra en la tabla 3, se realizaron dos tipos de experimentos. En el primer experimento, se incluyeron todos los grupos control y experimental, proliferativo y secretor, con el fin de comparar la presencia de Cap43 en ambas fases del ciclo ovárico. En el segundo experimento, sólo se sometieron a prueba los grupos de fase secretora y, de esta forma, pudo aumentarse el número de muestras analizadas.

Los resultados del primer experimento muestran que la proteína Cap43 se expresaba en niveles superiores en la fase secretora del ciclo ovárico, con una regulación por incremento media en el grupo control de más del doble en la fase secretora en comparación con la fase proliferativa ($1,92 \pm 0,21$ CTL S frente a $0,55 \pm 0,06$ CTL P). Además, mediante la comparación de los grupos control y Endo, parece que hay una disminución significativa en Cap43 en la fase secretora del grupo Endo ($p = 0,05$), con valores de especificidad y sensibilidad del 71% y del 57%, respectivamente, cuando se usa un punto de corte de 1,35 (tabla 5).

En el segundo experimento en el que sólo se analizaron muestras en la fase secretora, también hay una disminución significativa en la fase secretora del grupo Endo ($p = 0,001$). Utilizando un punto de corte de 1,1, la especificidad es del 77% y la sensibilidad es del 61% (tabla 5).

4) Conclusión

Estos resultados confirman que, a igual que el ARNm de Cap43, la proteína Cap43 se expresa de manera diferenciada en las células endometriales de mujeres sin endometriosis en comparación con mujeres que tienen endometriosis. Por tanto, está justificado creer que es lo mismo para todos los marcadores genéticos relacionados con la endometriosis enumerados en la tabla 1.

El uso de genes expresados de manera diferenciada o sus productos de proteína derivados (tales como proteínas o péptidos traducidos) representa, por tanto, un medio alternativo para determinar la probabilidad de endometriosis en mujeres y para clasificar esta enfermedad en mujeres que la padecen.

ES 2 287 100 T3

TABLA 1

Marcadores relacionados con endometriosis

Referencia del solicitante		Referencia de GENBANK™				
SEQ ID NO	Nombre arbitrario	Nombre del gen de GENBANK™	N° de registro	Tipo	N° de bases	Fecha
1	DD1	-	AL050039; AC007064	EST; EST	6241 124823	18-Feb-00 27-May-00
2	DD2	-	AF084555	EST	5171	1-Sep-99
3	DD3	-	J01415	ADN	16569	18-Abr-00
4	DD4	-	AA829538	EST	1329	29-Abr-98
5	DD5	Proteína de inducción específica de níquel (CAP43)	AF004162	ARNm	2972	24-Ene-00
6	DD6	-	AL034374	EST	101270	29-Abr-00
7	DD7	-	Al567884; AA558871; Al890794	EST; EST; EST	500 487 2501	14-May-99 9-Sep-97 7-Mar-00
8	DD8	ARN helicasa	AB028449	ARNm	7037	18-Feb-00
9	DD9	NADH deshidrogenasa	AF004342 J01415	ADN ADN	320 16569	19-Jul-97 18-Abr-00
10	DD10	NADH deshidrogenasa	AF014897 J01415	ADN ADN	1041 16569	6-May-99 18-Abr-00
11	DD11	Citocromo oxidasa 3 (CO3)	AB017708	ADN	346	26-Sep-98
12	DD12	Proteína del dominio Forkhead del factor de transcripción (FKHR)	AF032885	ARNm	5723	19-Feb-98
13	DD13	hUCC1	AJ250475	ARNm	2073	1-Jul-00
14	DD14	Paralemmína	AK000278	ARNm	2197	22-Feb-00
15	DD 15	Proteína de transporte de citrato	X96924	ADN	2270	9-Oct-97
16	DD16	-	AC022148	ADN	198751	26-Ago-00

ES 2 287 100 T3

5		ARN 12S mitocondrial (ARNr 12S)	J01415	ADN	16569	18-Abr-00
10		Factor 1 α inducido por hipoxia (HIF1 α)	NM001530	ARNm	3933	31-Oct-00
15		Translocador nuclear del receptor del hidrocarburo de arilo (ARNT)	NM001668	ARNm	2616	31-Oct-00
20		Isoenzima 3 de adenilato cinasa (AK3)	X60673	ARNm	1707	18-Ene-95
25		Isoforma 1 de transportador de glucosa (Glut-1)	aa368897	ARNm	288	21-Abr-97
30		Manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)	X14322	ARNm	977	12-Nov-90
35		Glutación peroxidasa (GPx)	X13709	ARNm	819	6-Abr-95
40		Catalasa (CAT)	NM001752	ARNm	2279	31-oct-00
45		Glutación S- transferasa (GST)	X15480	ARNm	725	12-Sep-93
50		Óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe)	M93718	ARNm	4077	27-Abr-93
55		T1227H	DD50525	ARNm	3911	10-Feb-99
60		Citocromo oxidasa 2 (CO2)	J01415	ADN	16569	18-Abr-00
65		aconitasa	NM001098	ARNm	2467	31-Oct-00

ES 2 287 100 T3

5		Translocador del nucleótido de adenina 1 (ANT-1)	NM001151	ARNm	1320	31-Oct-00
10		ATP sintasa	X03559	ARNm	1807	30-Dic-97
15		Leucemia / linfoma 2 de células B (Bcl- 2)	NM000633	ARNm	6030	3-Feb-01
20		Protooncogén humano c-jun (c-jun)	J04111	ADN	3622	6-Ene-95
25		Factor de transcripción del promotor en el sentido de 5' de la ovoalbúmina del pollo (COUP- TF)	X16155	ARNm	1513	19-Jul-95
30						
35						
40		Interleucina 1 β (IL-1 β)	m15330	ARNm	1497	6-Ene-95
45		Conexina 43 (Cx43)	m65188	ARNm	1314	1-Nov-94
50		Proteína de choque térmico 70 (HSP 70)	m11717	ADN	2691	8-Nov-94
55		Proteína de choque térmico 90 (HSP 90)	x15183	ARNm	2912	30-Ene-95
60		Fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa 4 (GPx4)	NM002085	ARNm	896	31-Oct-00
65		Proteína regulada por	m19645	ADN	5470	8-Nov-94

ES 2 287 100 T3

		glucosa 78 (GRP78)				
5		Ciclooxigenasa -2 (cox2)	m90100	ARNm	3387	31-Dic-94

TABLA 2

Secuencias de nucleótidos de marcadores relacionados con la endometriosis identificados mediante presentación diferencial

SEQ ID NO	Nombre arbitrario	Secuencia de nucleótidos
1	DD1	ggtagtaattctgcagatcgctagctcgacgattcattggctgaatagc cagtgggtgcaggacatatgcacagtgtctgacctcagtaacttcactctc atacatatgtattaggacaccaacacatgtgtgcatataagatgiatgata gatattgcaacaagtaataatttactgtcctatttataggatttttaaactt aaactactttcaccctattttccaaaaaaa
2	DD2	gactgtactgaaagggccaagagtaaatgccttcgttttgttttttctgt ttnttttgttttagctttttgttaaaacgtctatagattggcagttaatg ctgaatttgcataatcccccttccaaaattatactttgtatttaaaaaat aatgggatctacctaattttccaa
3	DD3	cgactgtatgntgaacgtaggtgagataaataataggatcgaggcagga atcaaagacagatactgcgacatagggtgctccggctccagcgtctcgc aatgctatcgctgcatacccccaa
4	DD4	cgactgtggacgagaggggaacctggtggtgggaccatggaggcagggtg cagaggtgcacaataaaaattgattatcatcgtttttgagaatgttggtg gtttccccca
5	DD5	aagctttggtcagagtgaattgaatattgtaagtgcagccactgggaccc gaggattctgggaccccgagttgggaggaggaatnagtccagccttcc aggtggcgtgagaggcaatgactcgttacctgccgcccatcaccttggga ggccttccctggccttgagtagaaaagtcggggatcggggcaagagagg cigagtacggatgggaaactattgtgcacaagtctttccanaggagttt cttaatgagagtttgtattttatttccagaccaataaatttgtaacttt gcaa
6	DD6	aagctttggtcagggatagagaatgaaagtgagatcatttagatctta gaaaggnagatgtlmgctnnggcacggtggctcacacctgtaatccc agcacttgggaagccatggtgggcagatcatttgagctcaggagtttg caaccagcctgggcaatatggcaagaccccatctgtacaa

ES 2 287 100 T3

7	DD7	ttgtatTTTTtagtaaagacggggTTTTcactatgTTggccaggctggTc tcgaactcctgacctcgtgatccaccaccttggcctcccaatcttat ttgctttacaagtcctgcttcagggttaccttccctgaccaaagctt
8	DD8	tctaatagcataataaaaatgaaaggaatcgtaaaacagtttcgttccaa aaagtcagagataaaagactatccatgaaggTtcactTTTtgaggcaaga accctTTTTtatgcaagactatgtggcatcagaaaactaaaatgtgat tcaccaacatgccagccaatgttcattaaaaatctgtcccttactaac aggtgcaacagcgaccgggaacatcaccttacacagtataacgtggaa agaaaagacaacattgggngcacttctcntctccaaaaccttatcttt cnattcagctttanctatntactgcaggactg
9	DD9	ttgattcggTtcagtctaatacctTTTTgtatcactcataggccagact tnagggttaggatgatgattaataagagggtgacataactattagtg gcaggtagttgtTTgtagggtcatggtaggggtaaaaggagggtcaat ttctagatcaaataataagaaggtaataagctactaagaagaattttat ggagaaagggacgcgggcggggggatatagggtcgaagccgcactcgta aggggtggattTTTTctatgtagccgttgaagaagctt
10	DD10	gtaggcagttgaggtggattaaaccaaaccagctacgcaaaatcctn agcatactcctcaattacccacataggatgaataatagcagttctacc gtacaaccctaataacactgcttaatttaactatttatattatccta actactaccgcattcctactactcaacttaaactccagcaccacgacc ctactactatctcgcacctgtaacaagctaacaatgactaacaccctta attccatccaccctcctctccctaggaggcctgaccccgctaancng ctTTTTgccaattgggcattancgagattca
11	DD11	gtaggcctaaaagcagccaccaattaagaaagcgttcaagctcaacac ccactacctnaaaaaatcccaaacatataactgaactcctcacacca attngnaccaatctatcacctatagaagaactaatgttagtataagt aacatgaaaacattctcctccgcataagccttgcgtcagattaaaaca ctgaactgacaattaacagcccaatatctacaatcaaccaacaagtca ttattaccctcactgtcaacccaacacaggcatgctcataaggaaagg ttaaaaaaagtaaaaggaactcggcaaatcttaccncgc
12	DD12	gactgtgacatggaatccatcattcggaatgacctcatggatggagat acattggattTTtaactTTtgacaatgtgttgcccaaccaaagcttccca cacagtgtcaagacaacgacacatagctgggtgtcaggctgagggtta gtgagcaggttacacttaaaagtacttcagattgtctgacagcaggaa ctgagagaagcagtccaaagatgtctttcaccaactccctTTtagttt tcttggttaaaaaa

ES 2 287 100 T3

13	DD13	ggttgagtttgtccattgctagggagagacttccagtaataaaaattta ctattctagatgcttctactgttatgttttatctaccatttatcttt cttagttaccaggagaaatgtgtgacacctatattataatgaaaacaa tcttattacttatagtttatctatattaaacaaatttaattgcattta aagcattctttgatattgttgcttttgcaataaatatggataatcttg gttataagggagttaaaacaatgctgtaataaataaagtgtttcatgt gatcaaa
14	DD14	tccatcatcttctttttcctcatnnatctccttccttaacctagaagg tatgtaggactttggaaggtcagggatattagcatagatgtcctcaat tgactcttctgctcttttcttctctttccactttcacagatcttataat gtcttctgttggtccgctcaattgacttttagtttctttaaaatggcctc ttccttcgttgagaagcttaagccga
15	DD15	ggcctggcttcaccgcattccaggctgcagccccctgcttctcccgcc attgccttaactgccttcgggcccctctctccgccccggacaggggtggc accaccactctcaggaccaccctgccaaggcagaataaaccggatcc tgttgc
16	DD16	aagcttgcaccatgacctaacgttttatgtaaatacttgtgtttagta ccttttaaggttttgcagaagatggcggtgtataggctgaattagcaa gagatagtgaggtttactggggtttattgattcaaa

Tabla 3: Resumen de valores promedio ($\pm$ EEM, error estándar de la media) por grupo para los marcadores relacionados con la endometriosis

Nombre	CTL Pan	CTL SH	CTL	EXP I P	EXP I S	EXP I	EXP II P	EXP II S	EXP II	ENDO P	ENDO S	ENDO
DD1 (epit)	0,24 $\pm$ 0,04	0,81* $\pm$ 0,20	0,55 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,21	0,15* $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,12	2,77 $\pm$ 1,96	1,39 $\pm$ 1,02	1,94 $\pm$ 0,97	1,36 $\pm$ 0,72	0,74 $\pm$ 0,49	1,03 $\pm$ 0,42
DD2 (epit)	1,21 $\pm$ 0,62	0,42 $\pm$ 0,14	0,76* $\pm$ 0,29	0,10 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,13	0,21 $\pm$ 0,08	0,10 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,06	0,14* $\pm$ 0,03
DD3 (epit)	0,98 $\pm$ 0,09	0,64 $\pm$ 0,03	0,88* $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,10	0,60 n.d.	0,45 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,04	0,65* $\pm$ 0,05
DD4 (epit)	0,87 $\pm$ 0,18	1,29" $\pm$ 0,23	1,00 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,12	0,79 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,09	0,80 $\pm$ 0,36	0,36 n.d.	0,69 $\pm$ 0,28	0,78 $\pm$ 0,11	0,75* $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,08
DD5 (epit)	1,92* $\pm$ 0,38	3,65 $\pm$ 1,85	2,86 $\pm$ 1,02	0,85 $\pm$ 0,25	1,61 $\pm$ 0,50	1,19 $\pm$ 0,27	1,11 $\pm$ 0,62	28,06 $\pm$ 23,75	17,70 $\pm$ 14,73	0,92* $\pm$ 0,24	13,37 $\pm$ 10,65	7,32 $\pm$ 5,51
DD5 (biop PROT*) (2 experimentos)	n.d. 0,55 $\pm$ 0,06	1,81* $\pm$ 0,17 1,92* $\pm$ 0,21	n.d. 1,28 $\pm$ 0,18	n.d. 0,62 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,11 1,45 $\pm$ 0,13	n.d. 1,05 $\pm$ 0,11	n.d. n.d.	1,34 $\pm$ 0,29 0,93 $\pm$ n.d.	n.d. n.d.	n.d. n.d.	1,12* $\pm$ 0,10 1,41* $\pm$ 0,12	n.d. 1,04 $\pm$ 0,11
DD6 (epit)	2,18 $\pm$ 1,32	0,83* $\pm$ 0,23	1,42 $\pm$ 0,59	0,49 $\pm$ 0,12	0,15* $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,72	0,54 $\pm$ 0,20	0,74 $\pm$ 0,29	0,73 $\pm$ 0,30	0,36 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,15
DD7 (epit)	1,49* $\pm$ 0,39	2,47 $\pm$ 1,37	2,02 $\pm$ 0,76	0,38 $\pm$ 0,12	0,35 $\pm$ 0,09	0,37 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,21	0,99 $\pm$ 0,34	0,73 $\pm$ 0,24	0,35* $\pm$ 0,10	0,65 $\pm$ 0,18	0,51 $\pm$ 0,11
DD8 (epit)	0,81 $\pm$ 0,14	1,01 $\pm$ 0,20	0,88* $\pm$ 0,11	0,59 $\pm$ 0,10	0,52 $\pm$ 0,12	0,56* $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,22	0,73 $\pm$ n.d.	0,70 $\pm$ 0,17	0,62 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,11	0,58 $\pm$ 0,07
DD9 (epit)	0,14* $\pm$	0,41 $\pm$	0,29 $\pm$	0,29 $\pm$	0,44 $\pm$	0,36 $\pm$	0,76 $\pm$	0,35 $\pm$	0,52 $\pm$	0,43* $\pm$	0,40 $\pm$	0,42 $\pm$

ES 2 287 100 T3

	0,03	0,14	0,08	0,06	0,22	0,10	0,23	0,06	0,11	0,09	0,13	0,08
DD10 (epit)	0,17* ±	0,23 ±	0,19 ±	0,27* ±	0,13 ±	0,20 ±	0,21 ±	0,08	0,18 ±	0,26 ±	0,13 ±	0,20 ±
DD11 (biop)	0,03	0,02	0,02	0,04	0,02	0,03	0,06	n.d.	0,05	0,03	0,02	0,02
DD12 (btbp)	Véase	CO3										
DD12 (biop NB)	27,92 ± 5,01 0,47 ± 0,14	40,20 ± 5,46 1,15 ± 0,26	34,73* ± 3,97 0,78* ± 0,15	14,48 ± 229 0,46 ± 0,15	35,42 ± 3,85 0,52 ± 0,15	26,11 ± 3,42 0,49 ± 0,10	17,10 ± 1,91 0,27 ± 0,13	42,96 ± 5,10 0,53 ± 0,33	20,79 ± 3,04 0,31 ± 0,12	16,05 ± 1,46 0,37 ± 0,10	36,67 ± 3,35 0,52 ± 0,13	23,78* ± 2,35 0,42* ± 0,09
OD13 (biop)	0,72 ± 0,13	0,24 ± 0,08	0,45* ± 0,09	0,83 ± 0,17	0,24 ± 0,06	0,48 ± 0,10	0,87 ± 0,17	0,47 ± 0,11	0,82* ± 0,15	0,86 ± 0,12	0,28 ± 0,06	0,63 ± 0,09
DD14 (biop)	1,36 ± 0,25	0,77 ± 0,12	1,03* ± 0,16	2,65 ± 0,83	1,23 ± 0,18	1,86 ± 0,41	1,18 ± 0,15	2,06 ± 0,13	1,31 ± 0,15	1,77 ± 0,37	1,37 ± 0,18	1,62* ± 0,24
DD15 (biop)	0,12 ± 0,07	0,10 ± 0,06	0,11* ± 0,05	0,49 ± 0,12	0,32 ± 0,08	0,43 ± 0,08	0,48 ± 0,15	0,12 ± 0,12	0,39 ± 0,13	0,49 ± 0,09	0,28 ± 0,07	0,42* ± 0,07
DD16 (biop)	2,54 ± 0,35	2,46 ± 0,32	2,50* ± 0,23	0,63 ± 0,16	1,49 ± 0,11	0,98 ± 0,15	1,63 ± 0,33	1,90 ± 0,19	1,70 ± 0,24	0,96 ± 0,19	1,58 ± 0,11	1,19* ± 0,14
HIF1α (epit)	0,84 ± 0,10	1,34 ± 0,15	0,99* ± 0,10	1,29 ± 0,13	1,23 ± 0,16	1,26 ± 0,10	1,47 ± 0,33	2,27 n.d.	1,62 ± 0,34	1,33 ± 0,12	1,31 ± 0,17	1,32* ± 0,10
HIF1α (biop NB)	0,78* ± 0,08	1,82 ± 0,35	1,20 ± 0,18	1,06 ± 0,14	1,82 ± 0,32	1,35 ± 0,18	1,16 ± 0,14	1,27 ± 0,71	1,19 ± 0,21	1,11* ± 0,10	1,61 ± 0,32	1,28 ± 0,13
ARNT (epit)	0,53* ± 0,11	1,38 ± 0,65	1,00 ± 0,37	1,04 ± 0,19	1,76 ± 0,61	1,37 ± 0,30	1,03 ± 0,17	10,13 ± 7,93	6,49 ± 4,80	1,04* ± 0,14	5,72 ± 3,78	3,44 ± 1,96
AK3 (epit)	0,60 ± 0,17	1,62 ± 0,32	1,14* ± 0,22	0,22 ± 0,07	0,62 ± 0,18	0,41* ± 0,10	3,16 ± 2,12	13,83 ±10,70	8,91 ± 5,83	1,40 ± 0,89	6,78 ± 5,10	4,10 ± 2,59

ES 2 287 100 T3

Glut-1 (epit)	0,51 ± 0,12	0,86 ± 0,18	0,69* ± 0,11	0,63 ± 0,21	1,28 ± 0,65	0,81 ± 0,29	1,23 ± 0,39	2,33 ± 0,77	1,87* ± 0,49	0,81 ± 0,19	1,77 ± 0,50	1,26 ± 0,27
MnSOD (epit)	0,62 ± 0,04	0,96 ± 0,23	0,84* ± 0,15	0,10 ± 0,23	3,89 ± 2,32	2,62 ± 1,32	5,35 ± 4,12	6,29 ± 2,85	5,90 ± 2,27	2,81 ± 1,73	4,94 ± 1,77	4,03* ± 1,25
MnSOD (biop)	0,68 ± 0,06	0,09 ± 0,16	0,76* ± 0,08	0,92 ± 0,18	2,20 ± 0,41	1,56 ± 0,26	0,89 ± 0,07	1,36 ± 0,30	0,98 ± 0,29	0,90 ± 0,09	2,00 ± 0,33	1,30* ± 0,16
DD11 (biop)	Véase	CO3										
GPx (epit)	0,34 ± 0,08	0,80 ± 0,11	0,49* ± 0,08	1,50 ± 0,18	2,01 ± 0,19	1,75 ± 0,14	1,83 ± 0,36	2,80 n.d.	2,02 ± 0,33	1,57 ± 0,16	2,08 ± 0,18	1,80* ± 0,13
catalasa (biop)	0,60 ± 0,08	0,49* ± 0,08	0,55 ± 0,06	0,88 ± 0,25	0,13 ± 0,04	0,59 ± 0,17	0,46 ± 0,18	0,14 n.d.	0,41 ± 0,16	0,74 ± 0,18	0,13* ± 0,03	0,55 ± 0,14
GST (epit)	0,40 ± 0,09	0,38 ± 0,12	0,39* ± 0,07	0,21 ± 0,08	0,15 ± 0,03	0,19* ± 0,05	0,80 ± 0,48	0,67 ± 0,21	0,71 ± 0,20	0,35 ± 0,13	0,42 ± 0,13	0,39 ± 0,09
ONSE (epit)	0,35* ± 0,08	0,39 ± 0,20	0,36 ± 0,08	0,17 ± 0,05	0,40 ± 0,09	0,27 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,04 n.d.	0,06 ± 0,02	0,15* ± 0,04	0,37 ± 0,09	0,24 ± 0,05
CO3/DD11 (epit)	0,44 ± 0,09	0,77* ± 0,11	0,55 ± 0,08	0,51 ± 0,08	0,31 ± 0,07	0,41 ± 0,06	0,35 ± 0,19	0,03 n.d.	0,29 ± 0,16	0,47 ± 0,07	0,29* ± 0,07	0,39 ± 0,05
ARNr 12S (biop)	4,12 ± 1,02	3,02 ± 0,70	3,61* ± 0,63	0,78 ± 0,42	2,82 ± 1,19	1,56* ± 0,55	4,57 ± 1,83	1,68 n.d.	4,16 ± 1,60	1,98 ± 0,74	2,69 ± 1,06	2,21 ± 0,60
T1227H (biop)	0,33 ± 0,04	0,30 ± 0,06	0,32* ± 0,04	0,43 ± 0,12	0,45 ± 0,18	0,44 ± 0,10	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,05	0,03* ± 0,01	0,30 ± 0,09	0,37 ± 0,15	0,33 ± 0,08
CO2 (biop)	0,58* ± 0,16	0,37 ± 0,15	0,48 ± 0,11	0,16* ± 0,04	0,40 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,83 ± 0,20	2,42 n.d.	1,06 ± 0,28	0,37 ± 0,10	0,62 ± 0,23	0,45 ± 1,10
aconitasa (biop)	0,43 ± 0,10	0,18* ± 0,02	0,31 ± 0,06	0,30 ± 0,07	0,07* ± 0,02	0,21 ± 0,05	0,20 ± 0,03	0,30 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,21 ± 0,03

ANT-1 (biop)	0,02* ±	0,03 ±	0,03 ±	0,01 ±	0,08 ±	0,03 ±	0,02 ±	0,00	0,01 ±	0,01* ±	0,07 ±	0,03 ±
ANT-1 (biop)	0,003	0,01 0,02	0,004	0,001	0,02	0,01	0,01	n.d.	0,005	0,002	0,02	0,01
NB)	0,09* ±	± 0,01	0,06 ±	0,05 ±	0,02 ±	0,04 ±	0,02 ±	0,10 ±	0,05 ±	0,04* ±	0,05 ±	0,04 ±
ATP sintasa,	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,06	0,02	0,01	0,03	0,01
(biop)	2,28 ±	5,28 ±	3,67* ±	5,06 ±	9,43 ±	6,72 ±	11,26 ±	13,14	11,53 ±	7,02 ±	9,85 ±	7,93* ±
	0,32 2,28*	1,53 5,28	0,77	1,05	1,43	0,85	2,19	n.d.	1,87	1,18	1,33	0,93
	± 0,32	± 1,53	3,67 ±	5,06 ±	9,43 ±	6,72 ±	11,26 ±	13,14	11,53 ±	7,02* ±	9,85 ±	7,93 ±
Bcl-2 (biop)	4,61 ±	6,11 ±	5,30* ±	3,96 ±	0,82 ±	2,76 ±	0,99 ±	2,81	1,25 ±	3,02 ±	1,04 ±	2,38* ±
	1,13	1,64	0,97	0,90	0,31	0,65	038	n.d.	0,41	0,70	0,35	0,51
DD11 (biop)	Véase	CO3										
c-jun (epit)	0,51 ±	0,51* ±	0,51 ±	0,53 ±	0,85* ±	0,66 ±	0,63 ±	0,10	0,50 ±	0,55 ±	0,77 ±	0,64 ±
	0,09	0,08 1,02	0,07	0,10	0,11	0,08	0,31	n.d.	0,26	0,09	0,12	0,08
c-jun (biop)	0,68 ±	± 0,18	0,82* ±	0,98 ±	1,84 ±	1,38 ±	1,35 ±	1,55 ±	1,38 ±	1,19 ±	1,78 ±	1,38* ±
	0,11		0,11	0,26	0,40	0,25	0,21	0,45	0,18	0,16	0,32	0,16
COUP-TF	0,05 ±	0,22* ±	0,13 ±	0,08 ±	0,06 ±	0,07 ±	0,10 ±	0,12	0,10 ±	0,09 ±	0,07* ±	0,08 ±
(biop)	0,01	0,05	0,03	0,04	0,03	0,02	0,06	n.d.	0,05	0,03	0,02	0,02
IL-1β(epit)	1,02 ±	0,86 ±	0,98* ±	1,31 ±	1,14 ±	1,23 ±	0,31 ±	0,06	0,25* ±	1,13 ±	1,05 ±	1,10 ±
	0,09	0,10	0,07	0,36	0,28	0,23	0,15	n.d.	0,12	0,31	0,27	0,21
Cx43(epit)	1,06 ±	0,72 ±	0,95* ±	1,69 ±	1,06 ±	1,39* ±	1,30 ±	0,26	1,04 ±	1,61 ±	0,98 ±	1,33 ±
	0,15 1,06*	0,32 0,72	0,14	021	0,19	0,16	0,27	n.d.	0,32	0,18	0,18	0,14
	± 0,15	± 0,32	0,95 ±	1,69* ±	1,06 ±	1,39 ±	1,30 ±	0,26	1,04 ±	1,61 ±	0,98 ±	1,33 ±
			0,14	0,29	0,19	0,16	0,27	n.d.	0,32	0,18	0,18	0,14
HSP70(epit)	0,56 ±	0,30 ±	0,42* ±	1,04 ±	0,91 ±	0,98 ±	2,61 ±	2,75 ±	2,70 ±	1,50 ±	1,78 ±	1,65* ±
	0,09 0,26*	0,07 1,38	0,06	0,28	0,26	0,19	1,01	1,67	1,10	0,38	081	0,46
HSP 70 (biop)	± 0,13	± 0,44	0,86 ±	0,80 ±	0,80 ±	0,80 ±	1,06 ±	0,10	0,99 ±	0,96* ±	0,71 ±	0,89 ±
			0,28	0,20	0,31	018	033	n.d.	0,31	0,22	0,2,8	0,18

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
HSP 90 (epit)	0,38 ± 0,08	0,32 ± 0,06	0,36* ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,19 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,05 ± 0,02	n.d. n.d.	0,05* ± 0,02	0,30 ± 0,06	0,19 ± 0,03	0,25 ± 0,04	
GPx4 (biop)	0,07 ± 0,01	0,21* ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,07* ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,81 n.d.	0,19 ± 0,10	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,08	0,10 ± 0,03	
GRP78 (biop)	4,76 ± 0,57	7,97* ± 1,75	6,24 ± 0,90	6,49 ± 1,38	1,63 ± 0,71	4,64 ± 1,03	1,66 ± 0,41	4,60 n.d.	2,08 ± 0,54	4,97 ± 1,08	1,96* ± 10,71	3,10 ± 0,80	
cox2 (biop)	3,04 ± 0,98	5,88 ± 2,10	4,35* ± 1,12	9,2,8 ± 1,97	9,73 ± 2,91	9,46* ± 1,60	2,67 ± 0,79	3,75 n.d.	2,83 ± 0,68	7,20 ± 1,53	9,07 ± 2,65	7,80 ± 1,33	

TABLA 4

Marcadores relacionados con la endometriosis sobreexpresados

Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p)*
DD9 (epit)	70%	70%	↑pαα	1 y 2	0,008
DD10 (epit)	71%	71%	↑P	1	0,04
DD13 (biop)	62%	64%	↑P y Sα	2	0,04
DD14 (biop)	78%	58%	↑P y S	1 y 2	0,04
DD15 (biop)	85%	79%	↑P y S	1 y 2	0,0006
HIF1α(epit)	65%	72%	↑P y S	1 y 2	0,028
HIF1α (biop NB)	83%	80%	↑P	1 y 2	0,019
ARNT (epit)	67%	83%	↑P	1 y 2	0,02
Glut-1 (epit)	71%	67%	↑P y S	2	0,037
MnSOD (epit)	76%	58%	↑P y S	1 y 2	0,017
MnSOD (biop)	81%	53%	↑P y S	1 y 2	0,003
GPx (epit)	100%	87,5%	↑P y S	1 y 2	$1,7 \times 10^{-11}$
ATP sintasa	77%	75%	↑P y S	1 y 2	10^{-3}
(biop)	93%	64%	↑P	1 y 2	8×10^{-4}
c-jun (epit)	75%	67%	↑S	1	0,05
c-jun (biop)	76%	65%	↑P y S	1 y 2	0,005
Cx43 (epit)	74%	48%	↑P y S	1	0,048
	77%	64%	↑P	1	0,02
HSP 70 (epit)	73%	61%	↑P y S	1 y 2	0,01
HSP 70 (biop)	71%	78%	↑P	1 y 2	0,014
cox2 (biop)	69%	62%	↑P y S	1	0,01

ES 2 287 100 T3

TABLA 5

Marcadores relacionados con la endometriosis subexpresados

Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p)*
DD1 (epit)	75%	90%	↓ S	1	0,01
DD2 (epit)	65%	77%	↓ P y S	1 y 2	0,04
DD3 (epit)	63%	69%	↓ P y S	1 y 2	0,01
DD4 (epit)	83%	85%	↓ S	1 y 2	0,04
DD5 (epit)	78%	79%	↓ P	1 y 2	0,03
DD5 (PROT biop) +	77% 71%	61% 57%	↓ S ↓ S	1 y 2 1 y 2	0,001 0,05
DD6 (epit)	89%	100%	↓ S	1	0,018
DD7 (epit)	80%	70%	↓ P	1 y 2	0,019
DD8 (epit)	67%	60%	↓ P y S	1	0,02
DD12 (biop)	81%	56%	↓ P y S	1 y 2	0,015
DD12 (biop NB)	55%	68%	↓ P y S	1 y 2	0,05
DD16 (biop)	70%	78%	↓ P y S	1 y 2	$3,5 \times 10^{-5}$
AK3 (epit)	68%	82%	↓ P y S	1	0,005
catalasa (biop)	83%	78%	↓ S	1 y 2	0,001
GST (epit)	54%	74%	↓ P y S	1	0,026
ONSe (epit)	77%	65%	↓ P	1 y 2	0,027
CO3/DD11 (epit)	83%	79%	↓ S	1 y 2	0,002
ARNr 12S (biop)	77%	67%	↓ P y S	1	0,02
TI227H (biop)	81%	100%	↓ P y S	2	2×10^{-8}
CO2 (biop)	64%	69%	↓ P	1	0,02
aconitasa (biop)	80%	86%	↓ S	1	0,005
ANT-1 (biop)	86%	74%	↓ P	1 y 2	0,007
ANT-1 (biop NB)	75%	73%	↓ P	1 y 2	0,016
Bcl-2 (biop)	54%	82%	↓ P y S	1 y 2	0,01
COUP-TF	83%	78%	↓ S	1 y 2	0,01

(biop)					
IL-1β	78%	100%	↓ P Y S	2	0,0002
(epit)					
HSP 90	75%	100%	↓ P Y S	2	4,3 x 10 ⁻⁵
(epit)					
GPx4	83%	75%	↓ S	1	5 x 10 ⁻³
(biop)					
GRP78					
(biop)	92%	78%	↓ S	1 y 2	6 x 10 ⁻³

TABLA 6

Marcadores relacionados con la endometriosis modulados en la fase proliferativa

	Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p)*
25	DD5 (epit)	78%	79%	↓ paa	1 y 2	0,03
30	DD7 (epit)	80%	70%	↓ P	1 y 2	0,019
	DD9 (epit)	70%	70%	↑ P	1 y 2	0,008
	DD10 (epit)	71%	71%	↑ P	1	0,04
35	HIF1 α (biop NB)	83%	80%	↑ P	1 y 2	0,019
40	ARNT (epit)	67%	83%	↑ P	1 y 2	0,02
	ONSe (epit)	77%	65%	↓ P	1 y 2	0,027
45	CO2 (biop)	64%	69%	↓ P	1	0,02
	ANT-1 (biop)	86%	74%	↓ P	1 y 2	0,007
50	ATP sintasa (biop)	93%	64%	↑ P	1 y 2	8 x 10 ⁻⁴
55	Cx43 (epit)	77%	64%	↑ P	1	0,02
60	HSP 70 (biop)	71%	78%	↑ P	1 y 2	0,014
	DD2 (epit)	65%	77%	↓ P Y S α	1 y 2	0,04
65	DD3 (epit)	63%	69%	↓ P Y S	1 y 2	0,01
	DD8 (epit)	67%	60%	↓ P Y S	1	0,02

ES 2 287 100 T3

	DD12 (biop)	81%	56%	↓ P Y S	1 Y 2	0,015
5	DD12 (biop NB)	55%	68%	↓ P Y S	1 Y 2	0,05
	DD13 (biop)	62%	64%	↑ P Y S	2	0,04
10	DD14 (biop)	78%	58%	↑ P Y S	1 Y 2	0,04
	DD15 (biop)	85%	79%	↑ P Y S	1 Y 2	0,0006
15	DD16 (biop)	70%	78%	↓ P Y S	1 Y 2	$3,5 \times 10^{-5}$
20	HIF 1α(epit)	65%	72%	↑ P Y S	1 Y 2	0,028
	AK3 (epit)	68%	82%	↓ P Y S	1	0,005
25	Glut-1 (epit)	71%	67%	↑ P Y S	2	0,037
	MnSOD (epit)	76%	58%	↑ P Y S	1 Y 2	0,017
30	MnSOD (biop)	81%	53%	↑ P Y S	1 Y 2	0,003
35	GPx (epit)	100%	87,5%	↑ P Y S	1 Y 2	$1,7 \times 10^{-11}$
	GST (epit)	54%	74%	↓ P Y S	1	0,026
40	ARNr 12S (biop)	77%	67%	↓ P Y S	1	0,02
	TI227H (biop)	81%	100%	↓ P Y S	2	2×10^{-8}
45	ANT-1 (biop NB)	85%	75%	↓ P Y S	1 Y 2	0,016
50	ATP sintasa (biop)	77%	75%	↑ P Y S	1 Y 2	10^{-3}
55	Bcl-2 (biop)	54%	82%	↓ P Y S	1 Y 2	0,01
	c-jun (biop)	76%	65%	↑ P Y S	1 Y 2	0,005
60	IL-1β(epit)	78%	100%	↓ P Y S	2	0,0002
	Cx43 (epit)	74%	48%	↑ P Y S	1	0,048
65	HSP 70 (epit)	73%	61%	↑ P Y S	1 Y 2	0,01

ES 2 287 100 T3

HSP 90 (epit)	75%	100%	↓ P y S	2	4,3 x 10 ⁻⁵
cox2 (biop)	69%	62%	↑ P y S	1	0,01

TABLA 7

Marcadores relacionados con la endometriosis modulados en la fase secretora

Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p)*
DD1 (epit)	75%	90%	↓ S	1	0,01
DD4 (epit)	83%	85%	↓ S	1 y 2	0,04
DD6 (epit)	89%	100%	↓ S		0,018
catalasa (biop)	83%	78%	↓ S	1 y 2	0,001
C03/DD11 (epit)	83%	79%	↓ S	1 y 2	0,002
aconitasa (biop)	80%	86%	↓ S	1	0,005
c-jun (epit)	75%	67%	↑ S	1	0,05
COUP-TF (biop)	83%	78%	↓ S	1 y 2	0,01
GPx4 (biop)	83%	75%	↓ S	1	5 x 10 ⁻³
GRP78 (biop)	92%	78%	↓ S	1 y 2	6 x 10 ⁻³
DD2 (epit)	65%	77%	↓ P y S	1 y 2	0,04
DD3 (epit)	63%	69%	↓ P y S	1 y 2	0,01
DD8 (epit)	67%	60%	↓ P y S	1	0,02
DD12 (biop)	81%	56%	↓ P y S	1 y 2	0,015
DD12 (biop NB)	55%	68%	↓ P y S	1 y 2	0,05
DD13 (biop)	62%	64%	↓ P y S	2	0,04
DD14 (biop)	78%	58%	↑ P y S	1 y 2	0,04
DD15	85%	79%	↑ P y S	1 y 2	0,0006

ES 2 287 100 T3

	(biop)					
	DD16	70%	78%	↓ P Y S	1 Y 2	3,5 x 10 ⁻⁵
5	(biop)					
	HIF1α	65%	72%	↑ P Y S	1 Y 2	0,028
	(epit)					
10	AK3 (epit)	68%	82%	↓ P Y S	1	0,005
	Glut-1	71%	67%	↑ P Y S	2	0,037
	(epit)					
15	MnSOD	76%	58%	↑ P Y S	1 Y 2	0,017
	(epit)					
	MnSOD	81%	53%	↑ P Y S	1 Y 2	0,003
20	(biop)					
	GPx (epit)	100%	87,5%	↑ P Y S	1 Y 2	1,7 x 10 ⁻¹¹
	GST (epit)	54%	74%	↓ P Y S	1	0,026
25	ARNr 12S	77%	67%	↓ P Y S	1	0,02
	(biop)					
	T1227H	81%	100%	↓ P Y S	2	2 x 10 ⁻⁸
30	(biop)					
	ANT-1	85%	75%	↓ P Y S	1 Y 2	0,016
	(biop NB)					
35	ATP	77%	75%	↑ P Y S	1 Y 2	10 ⁻³
	sintasa					
	(biop)					
40	Bcl-2	54%	82%	↓ P Y S	1 Y 2	0,01
	(biop)					
	c-jun	76%	65%	↑ P Y S	1 Y 2	0,005
45	(biop)					
	IL-1β(epit)	78%	100%	↓ P Y S	2	0,0002
	Cx43	74%	48%	↑ P Y S	1	0,048
50	(epit)					
	HSP 70	73%	61%	↑ P Y S	1 Y 2	0,01
	(epit)					
55	HSP 90	75%	100%	↓ P Y S	2	4,3 x 10 ⁻⁵
	(epit)					
	cox2	69%	62%	↑ P Y S	1	0,01
60	(biop)					

65

ES 2 287 100 T3

TABLA 8

Marcadores relacionados con la endometriosis modulados según el estadio de la enfermedad

	Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p)*
5	DD1 (epit)	75%	90%	↓ S	1	0,01
10	DD6 (epit)	89%	100%	↓ S	1	0,018
	DD8 (epit)	67%	60%	↓ P y S	1	0,02
15	DD10 (epit)	71%	71%	↑ P	1	0,04
	AK3 (epit)	68%	82%	↓ P y S	1	0,005
	GST (epit)	54%	74%	↓ P y S	1	0,026
20	ARNr 12S (biop)	77%	67%	↓ P y S	1	0,02
	CO2 (biop)	64%	69%	↓ P	1	0,02
	aconitasa (biop)	80%	86%	↓ S	1	0,005
25	c-jun (epit)	75%	67%	↑ S	1	0,05
	Cx43 (epit)	74%	48%	↑ P y S	1	0,048
		77%	64%	↑ P	1	0,02
30	GPx4 (biop)	83%	75%	↓ S	1	5 x 10 ⁻³
	COx2 (biop)	69%	62%	↑ P y S	1	0,01
	DD13 (biop)	62%	64%	↑ P y S	2	0,04
35	Glut-1 (epit)	71%	67%	↑ P y S	2	0,037
	Tl227H (biop)	81%	100%	↓ P y S	2	2 x 10 ⁻⁸
	IL-1β (epit)	78%	100%	↓ P y S	2	0,0002
40	HSP 90 (epit)	75%	100%	↓ P y S	2	4,3 x 10 ⁻⁸

TABLA 9

Marcadores relacionados con la endometriosis sobreexpresados en el estadio I o II (EXP 1), o en el estadio III o IV (EXP 2) de la enfermedad

	Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p)*
50	DD10 (epit)	71%	71%	↑ P	1	0,04
55	c-jun (epit)	75%	67%	↑ S	1	0,05
	Cx43 (epit)	74%	48%	↑ P y S	1	0,048
		77%	64%	↑ P	1	0,02
60	cox2 (biop)	69%	62%	↑ P y S	1	0,01
	DD13 (biop)	62%	64%	↑ P y S	2	0,04
	Glut-1 (epit)	71%	67%	↑ P y S	2	0,037

ES 2 287 100 T3

TABLA 10

Marcadores relacionados con la endometriosis subexpresados en el estadio I o II (EXP 1), o en el estadio III o IV (EXP 2) de la enfermedad

Nombre	Especificidad	Sensibilidad	Fase modulada	Grupo EXP modulado	Significación (valor de p) *
CO2 (biop)	64%	69%	↓ P	1	0,02
DD1 (epit)	75%	90%	↓ S	1	0,01
DD6 (epit)	89%	100%	↓ S	1	0,018
aconitasa (biop)	80%	86%	↓ S	1	0,005
GPx4 (biop)	83%	75%	↓ S	1	5 x 10 ⁻³
DD8 (epit)	67%	60%	↓ P y S	1	0,02
AK3 (epit)	68%	82%	↓ P y S	1	0,005
GST (epit)	54%	74%	↓ P y S	1	0,026
ARNr 12S (biop)	77%	67%	↓ P y S	1	0,02
T1227H (biop)	81%	100%	↓ P y S	2	2 x 10 ⁻⁸
IL-1β (epit)	78%	100%	↓ P y S	2	0,0002
HSP 90 (epit)	75%	100%	↓ P y S	2	4,3 x 10 ⁻⁵

Leyenda para las tablas 3 a 10

CTL: grupo control (mujeres sin endometriosis)

ENDO: grupo Endo (mujeres que tienen endometriosis)

EXP: Se refiere al grupo Endo: EXP1: mujeres en los estadios I y II de la enfermedad EXP2: mujeres en los estadios III y IV de la enfermedad

epit: marcador derivado de ARN de célula epitelial

biop: marcador derivado de ARN de biopsia no fraccionada

PROT⁺ biop: marcador derivado de proteína de biopsia no fraccionada

*: indica una diferencia significativa según la prueba de la t de Student de los grupos comparados descritos

S: fase secretora

P: fase proliferativa

NB: indica el marcador derivado de ARN de biopsia no fraccionada obtenidos mediante análisis de transferencia de tipo Northern

n.d.: no disponible

ES 2 287 100 T3

TABLA 11

Combinaciones de marcadores genéticos relacionados con la endometriosis

		Especificidad	Sensibilidad
Marcadores individuales solos	GRP 78	92%	78%
	Catalasa	83%	78%
	COUP-TF	83%	78%
Combinación de 2 marcadores	GRP 78 y catalasa	75%	100%
	GRP 78 y COUP-TF	75%	89%
	Catalasa y COUP-TF	75%	100%
	GRP 78 y catalasa y COUP-TF	92%	89%

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la posibilidad de endometriosis en un sujeto femenino, que comprende las etapas de:

- someter a ensayo una muestra de células endometriales obtenidas de dicho sujeto femenino para determinar el nivel de expresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis,
- comparar el nivel de expresión de dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis con un nivel de expresión inicial, establecido sometiendo a ensayo el nivel de expresión de dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis en un grupo de referencia negativo de muestras de células endometriales obtenidas de mujeres sin endometriosis;

en el que dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis se selecciona del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a un ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR, o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii);

siendo indicativo el nivel de expresión de dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis de la posibilidad de endometriosis en dicho sujeto femenino.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de subexpresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a un ADNc que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR, o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii);

es indicativo de una mayor posibilidad de endometriosis en dicho sujeto femenino en comparación con un sujeto femenino sin endometriosis.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que las células endometriales de dicha muestra de dicho sujeto femenino se obtuvieron en la fase proliferativa de su ciclo estrual, y en el que el nivel de subexpresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR, o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii);

es indicativo de una mayor posibilidad de endometriosis en dicho sujeto femenino en comparación con un sujeto femenino sin endometriosis.

4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que las células endometriales de dicha muestra de dicho sujeto femenino se obtuvieron en la fase secretora de su ciclo estrual, y en el que el nivel de subexpresión de al menos un marcador relacionado con la endometriosis seleccionado del grupo que consiste en:

- i) el gen FKHR tal como se enumera en la tabla 1;
- ii) ácidos ribonucleicos que dan lugar a ADNc que comprenden la secuencia SEQ ID NO 12; y
- iii) péptidos o proteínas codificados por el gen FKHR, o codificados por los ácidos ribonucleicos definidos en ii);

es indicativo de una mayor posibilidad de endometriosis en dicho sujeto femenino en comparación con un sujeto femenino sin endometriosis.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas células endometriales son células endometriales eutópicas.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas células endometriales son células endometriales epiteliales.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de expresión de dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis se somete a ensayo usando un método seleccionado del grupo que consiste en biochips, membranas, y métodos basados en matriz de vidrio de ADNc; RT-PCR; hibridación *in situ*; estudios de fusión del promotor *in vitro* en líneas celulares o cultivos primarios; métodos de estudio de la tasa de transcripción; hibridación por inmunotransferencia sobre membrana; marcaje; proteómica; citometría de flujo; inmunocitoquímica; inmunohistoquímica y ELISA.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el nivel de expresión para al menos dos marcadores relacionados con la endometriosis se somete a ensayo en combinación.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además las etapas de:

- i) definir en qué fase del ciclo estrual se obtuvieron dichas células endometriales; y
- ii) seleccionar dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis, para el que debe someterse a ensayo el nivel de expresión según la fase definida en i).

10. Método según la reivindicación 9, en el que la fase del ciclo estrual en la que se obtienen dichas células endometriales se evalúa usando al menos un método seleccionado del grupo que consiste en: examen histológico, métodos para evaluar el nivel de expresión del ARN, y métodos para evaluar los niveles de esteroides sexuales.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho al menos un marcador relacionado con la endometriosis es un ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho ácido ribonucleico mensajero (ARNm) sirve como molde para la síntesis de un ADNc.

13. Uso de un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- a) ARNm de FKHR, para el que el número de registro de GENBANK™ es AF032885;
- b) ácidos nucleicos monocatenarios que hibridan en condiciones convencionales con los ácidos nucleicos definidos en a);
- c) ácidos nucleicos monocatenarios obtenidos mediante transcripción inversa de un ácido nucleico definido en a) o b);
- d) fragmentos de los ácidos nucleicos definidos en a) a c);

para determinar la posibilidad de endometriosis de una muestra de células endometriales de un sujeto femenino o para clasificar la endometriosis de una muestra de células endometriales de un sujeto femenino que padece endometriosis.

ES 2 287 100 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROCREA INC.

5 <120> MARCADORES RELACIONADOS CON LA ENDOMETRIOSIS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 029318-0013

10 <150> US 60/185.063

<151> 25-02-2000

<150> US 60/225.745

15 <151> 17-08-2000

<160> 16

20 <170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 231

25 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (1)..(231)

<223> ADNc

35 <400> 1

40	ggtagtaat tctgcagatc gctagctcga cgattcattg gctgaatagc cagtgggtgca	60
	ggacatatgc acagtgtctg acctcagtaa cttcactctc atacatatgt attaggacac	120
	caacacatgt gtgcatataa gatgtatgat agatattgca acaagtaata atttactgtc	180
45	ctattttatag gatttttaaac ttaaaactact ttcacctat ttccaaaaaa a	231

<210> 2

<211> 174

50 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (1)..(174)

<223> ADNc

60 <220>

<221> misc_feature

<222> (53)..(53)

65 <223> n = nucleótido indeterminado

ES 2 287 100 T3

<400> 2

```

5      gactgtactg aaagggccaa gagtaaatgc ctccgttttg ttttttttgt tttttttggt      60
      ttactttttt gttaaaaagt ctatagattg gcagttaatg ctgaatttgt caaatacccc      120
      ttccaaaatt atacttttga tttaaaaaat aaatgggata taactaattt ccaa      174

```

10 <210> 3

<211> 123

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (1)..(123)

<223> ADNc

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (11)..(11)

<223> n = nucleótido indeterminado

30 <400> 3

```

30      cgactgtatg ntgaacgtag gtgcgataaa taataggatc gaggcaggaa tcaaagacag      60
      atactgcgac ataggggtgt cgggtccag cgtctcgcaa tgcatacccg tgcatacccc      120
35      caa      123

```

<210> 4

40 <211> 108

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(108)

<223> ADNc

50

<400> 4

```

55      cgactgtgga cgagaggga cctgggtggt ggaccatgga ggcagggtgc agaggtgcac      60
      aataaaattg attatcatcg ttttcgagaa tgttggttgg ttccccc      108

```

<210> 5

60 <211> 297

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65 <220>

<221> misc_feature

ES 2 287 100 T3

<222> (1)..(297)

<223> ADNc

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (85)..(85)

<223> n = nucleótido indeterminado

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (237)..(237)

15

<223> n = nucleótido indeterminado

<400> 5

20

aagcttttggc cagagtgaat tgaatattgt aagtcagcca ctgggacccg aggattctgg 60

gacccccgcag ttgggaggag gaatnagtc agccttcacg gtggcgtgag agycaatgac 120

25

tcgttacctg ccgcccatca ccttggaggc ctcccttggc cttgagtaga aaagtcgggg 180

atcggggcga gagaggctga gtacggatgg gaaactattg tgcacaagtc ttccanagg 240

30

agtttcttaa tgagagtttg tatttatttc cagaccaata aatttgtaac ttgcaa 297

<210> 6

<211> 184

35

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (1)..(184)

<223> ADNc

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (55)..(55)

50

<223> n = nucleótido indeterminado

<220>

<221> misc_feature

55

<222> (63)..(63)

<223> n = nucleótido indeterminado

<220>

60

<221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> n = nucleótido indeterminado

65

ES 2 287 100 T3

<400> 6

```

5      aagccttggg cagggataga gaatgaaagt gagatcattt agatccttaga aaggnagatg      60
      ttnggctnng gcacgggtggc tcacacctgt aatcccagca ctggggaagc catgggtgggc      120
      agatcatttg agctcaggag ttgcaacca gcttgggcaa tatggcaaga ccccatctgt      180
10     acaa                                         184

```

<210> 7

<211> 143

15 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (1)..(143)

<223> ADNc

25 <400> 7

```

      ttgtattttt agtaaagacg gggtttcaat atgttggcaa ggctgggtct gaactcctga      60
30     cctcgtgata caccacacct ggctcccaa tcttatttgc ttacaagtc ctgcttcagg      120
      gttaccttcc ctgaccaaag ctt                                         143

```

35 <210> 8

<211> 319

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(319)

45 <223> ADNc

<220>

<221> misc_feature

50 <222> (259)..(259)

<223> n = nucleótido indeterminado

55 <220>

<221> misc_feature

<222> (269)..(269)

<223> n = nucleótido indeterminado

60

<220>

<221> misc_feature

<222> (290)..(290)

65 <223> n = nucleótido indeterminado

<220>

ES 2 287 100 T3

<221> misc_feature
<222> (302)..(302)
<223> n = nucleótido indeterminado

5

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)..(306)

10

<223> n = nucleótido indeterminado

<400> 8

15

tctaatagcac aataaaatga aaggaatcgt aaaacagttt cgttccaaaa agtcagagat 60

aaagactatc catgaagggt cacttttgag gcaagaaccc ttttttatgc aagactatgt 120

20

ggcatcagaa aactaaaatg tgattcacca acatgccagc caatgttcat taaaaatctg 180

tcccttacta acaggtgcaa cagcgaccgg gaacatcacc ttacacagta taacgtggaa 240

agaaaagaca acattgggng cacttctctt ctocaaaaac ttatctttctn attcagcttt 300

25

ancathtact gcaggactg 319

<210> 9

<211> 277

30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

35

<221> misc_feature

<222> (1)..(277)

<223> ADNc

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(50)

45

<223> n = nucleótido indeterminado

<400> 9

50

ttgattcggc tcaagtctaat cctttttgta tcaactatag gccagacttn agggctagga 60

tgatgattaa taagagggat gacataacta ttagtggcag qtagtgggtt gtagggctca 120

55

tggtaggggt aaaaggaggg caatttctag atcaaataat aagaaggtaa tagctactaa 180

gaagaatttt atggagaaaag ggacgcgggc gggggatata gggtcgaagc cgcactccta 240

60

aggggtggat ttttctatgt agccgttgaa gaagctt 277

<210> 10

65

<211> 320

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 287 100 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(320)
 5 <223> ADNc

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (48)..(48)
 <223> n = nucleótido indeterminado

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (284)..(284)
 <223> n = nucleótido indeterminado

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (287)..(287)
 25 <223> n = nucleótido indeterminado

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (311)..(311)
 <223> n = nucleótido indeterminado

 <400> 10
 35

 gtaggcagtt gaggtggatt aaaccaaacc cagctacgca aaatectnag catactcctc 60
 aattacccac ataggatgaa taatagcagt tctaccgtac aacctcaaca taacctgctt 120
 40 aatttaacta tttatattat cctaactact accgcattcc tactactcaa cttaaaactcc 180
 agcaccacga ccctactact atctcgccac tctaacaagc taacatgact aacaccccta 240
 attccatcca cctcctcttc cctaggagge ctgacccccc taanccngct ttttgcccaa 300
 45 ttgggcatta nccagattca 320

 <210> 11
 50 <211> 327
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(327)
 60 <223> ADNc

 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (58)..(58)
 <223> n = nucleótido indeterminado

ES 2 287 100 T3

<220>

<221> misc_feature

<222> (101)..(101)

5 <223> n = nucleótido indeterminado

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (324)..(324)

<223> n = nucleótido indeterminado

<400> 11

15

gtaggcctaa aagcagccac caattaagaa agcgttcaag ctcaacaccc actacctnaa 60

aaaatcccaa acatataact gaactcctca caccctaattg ngaccaatct atcacccctat 120

20

agaagaacta atgttagtat aagtaacatg aaaacattct cctccgcata agccttgccg 180

cagattaaaa cactgaactg acaattaaca gcccaatata tacaatcaac caacaagtca 240

25

ttattaccct cactgtcaac ccaacacagg catgtctata aggaaagggt aaaaaaagta 300

aaagggaactc ggcaaatctt accncgc 327

<210> 12

30

<211> 254

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(254)

40 <223> ADNc

<400> 12

45

gactgtgaca tggaaatccat cattcggaat gacctcatgg atggagatac attggatttt 60

aactttgaca atgtgttgcc caaccaaaagc ttccacacac gtgtcaagac aacgacacat 120

agctgggtgt caggtcgagg gttagtgagc aggttacact taaaagtact tcagattgtc 180

50

tgacaqcagg aactgagaga agcagtccaa agatgtcttt caccaactcc ctttagtttt 240

tcttggttaa aaaa 254

55

<210> 13

<211> 295

<212> ADN

60 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

65 <222> (1)..(295)

<223> ADNc

ES 2 287 100 T3

<400> 13

ggttgagctt gtccattgct agggagagac ttccagtaat aaaatttact attctagatg 60

5 cttctactgt tatgtcttat ctacccattt atctttctta gttaccagga gaaatgtgtg 120

acacctatat tataatgaaa acaatcttat tacttatagt ttatctatat taaacaaatt 180

10 taattgcatt taaagcattt ttgtatattg ttgcttttgc aataaatatg gataatcttg 240

gttataaggg agttaaaaca atgctgtaat aaataaagtg ttcatgtga tcaaa 295

15 <210> 14

<211> 218

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (1)..(218)

<223> ADNc

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (24)..(25)

<223> n = nucleótido indeterminado

35 <400> 14

ttcatcatct tctttttctt catnnatctt cttcottaac ctagaaggta tgtaggactt 60

40 tggaaggcca gggatattag catagatgtc ctcaattgac tcttctgtct tttcttctct 120

ttccactttc acagatctta taatgtcttc tgttgctcgc tcaattgact ttagtttctt 180

taaaatgggc tcttctctcg ttgagaagct taagccga 218

45 <210> 15

<211> 150

50 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (1)..(150)

<223> ADNc

60 <400> 15

ggcctggctt caccgcattc cagggtgcag cccctgctt ctcccgccat tgccttaact 60

65 gccctggggc cctctctcgc ccccggcag ggtggcacc accactctca ggaccacct 120

gccaaaggcag aataaaccgg atcctgttgc 150

ES 2 287 100 T3

<210> 16

<211> 132

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(132)

<223> ADNc

<400> 16

15

aaagcttgcac catgacctaa cgttttatgt aaatacttgt gtttagtacc ttttaagggt 60

ttgcagaaga tggcgggtgta taggctgaat tagcaagaga tagtgagggt tactgggggt 120

20

tattgattca aa 132

25

30

35

40

45

50

55

60

65