



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 703**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 35/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03020599 .1**
96 Fecha de presentación : **18.11.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1394551**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Integrina β_3 como un indicador de endometriosis.**

30 Prioridad: **19.11.1993 US 155435**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es:
**The Trustees of the University of Pennsylvania
Center for Technology Transfer
3700 Market Street, Suite 300
Philadelphia, Pennsylvania 19104-3147, US**

72 Inventor/es: **Lessey, Bruce A.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 312 703 T3

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

DESCRIPCIÓN

Integrina β_3 como un indicador de endometriosis.

5 Antecedentes de la invención

En la década pasada, los investigadores han llegado a reconocer la importancia de la matriz extracelular (ECM) en la dirección del crecimiento, la diferenciación y la función del epitelio de revestimiento. Getzenberg *et al.*, "The Tissue Matrix: Cell Dynamics and Hormone Action", *Endocrine Rev.* **1990**, *11*: 399. La interacción entre las células y la matriz extracelular (o sustrato) está mediada por varias clases de moléculas de adhesión celular, siendo unas de las más importantes las integrinas. Albelda *et al.*, "Integrins and Other Cell Adhesion Molecules", *FESEB J.* **1990**, *4*: 2868. Buck *et al.*, "Integrin, a Transmembrane Glycoprotein Complex Mediating Cell-Substratum Adhesion", *J. Cell Sci. Suppl.* **1987**, *8*: 231. Esta familia diversa de receptores de glicoproteínas se expresan en la membrana celular como subunidades de integrina α y β heterodiméricas y están implicadas tanto en la adhesión célula-célula como célula-sustrato. El reconocimiento y la unión específica de componentes de la matriz extracelular (ECM), tales como fibronectina (FN), laminina (LM) y colágeno (Col), transmiten información a la estructura citoesquelética, una interacción que puede tener un papel importante en promover la sensibilidad a hormonas y la activación genómica. Burridge *et al.*, "Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton", *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1988**, *4*: 487 y Getzenberg *et al.*, anteriormente.

Aunque existe gran cantidad de información acerca de proteínas integrinas específicas, por ejemplo, Hemler, M. E. "VLA Proteins in the Integrin Family: Structures, Functions and Their Role on Leukocytes", *Annu. Rev. Immunol.* **1990**, *8*: 365, se sabe poco respecto a la distribución de estos receptores en el tracto reproductivo femenino. En el útero, el endometrio, compuesto por un epitelio glandular y mesénquima asociado (estroma), mantiene complejas funciones temporales y espaciales en respuesta al entorno hormonal cíclico. Aunque Tabibzadeh describía que alteraciones dinámicas en la expresión de integrinas acompañan a los otros cambios histológicos que marcan temporalmente el ciclo menstrual, Tabibzadeh, S., "Patterns of Expression of Integrin Molecules in Human Endometrium Throughout the Menstrual Cycle", *Hum. Reprod.* **1992**, *7*: 876, la búsqueda de marcadores morfológicos o bioquímicos para la receptividad uterina no ha tenido éxito hasta la fecha, como se describe en Rogers y Murphy "Uterine Receptivity for Implantation: Human Studies", in *Blastocyst Implantation* **1989**, Yoshinaga, K. ed., Sero Symposium, pág. 231. Una vez que se identifiquen dichos marcadores, probablemente también podrá identificarse su papel en los fenómenos endometriales, incluyendo la implantación de embriones, la fertilidad, la anticoncepción y la maduración y receptividad endometrial. Por lo tanto, como algunas integrinas parecen cumplir los criterios para marcadores de receptividad, existe una gran necesidad de métodos de detección de moléculas de adhesión celular integrinas en el endometrio.

Se ha sugerido el asincronismo entre el desarrollo uterino y el embrionario como una causa de pérdida gestacional en base a un alineamiento erróneo entre la receptividad endometrial y embrionaria, véase, Pope *et al.*, "Uterine Asynchrony: A cause of Embryonic Loss", *Biol. Reprod.* **1988**, *39*: 999.

La relación entre la endometriosis mínima y la nuliparidad e infertilidad continúa siendo controvertida. Aunque existen muchos argumentos convincentes para apoyar esta asociación, muchos clínicos no creen todavía que las formas mínimas o leves de la enfermedad sean perjudiciales para la fertilidad de una pareja. Varios estudios que comparan mujeres con endometrio normal con mujeres con endometriosis leve o mínima han demostrado una disminución en la fecundidad del ciclo, tal como en los índices de éxito en programas de donación, IVF o GIFT, confirmado por modelos animales. Una razón para esta falta de aceptación es el descubrimiento de muchos estudios de que el tratamiento del embarazo obtiene índices de gestación tan elevados como los tratamientos usados más actualmente.

De los muchos mecanismos sugeridos para explicar la disminución en la fecundidad del ciclo de pacientes con endometriosis, una deficiencia en la receptividad uterina es quizá la que menos atención ha recibido. Fedele describía cambios específicos en el endometrio nativo en mujeres con endometriosis grave, Fedele, L., *et al.*, "Structural and Ultrastructural Defects in Preovulatory Endometrium of Normo-Ovulating Infertile Women with Minimal or Mild Endometriosis", *Fertil. Steril.* **1990**, *53*: 989. Yovich sugería que la endometriosis grave estaba asociada con una deficiencia en la implantación, en base a un experimento de IVF-ET, véase Yovich *et al.*, "Hormonal Profiles and Embryo Quality in Women with Severe Endometriosis Treated by *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer", *Fertil. Steril.* **1988**, *50*: 308. Existen datos de estudios en el conejo que sugieren que la implantación se ve afectada desfavorablemente por una endometriosis inducida quirúrgicamente, y que el efecto está mediado por el líquido peritoneal, véase, Hahn *et al.*, "Experimental Evidence for Failure to Implant as a Mechanism of Infertility Associated with Endometriosis", *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1986**, *155*: 1109.

La endometriosis es un trastorno que afecta al 2-5% estimado de la población femenina fértil general, aunque su prevalencia en mujeres infértiles alcanza el 30-50%, Peterson *et al.*, "Laparoscopy of the infertile Patient", *Obstet. Gynecol.* **1970**, *36*: 667. Aunque muchas mujeres afectadas pueden no tener síntomas, otras padecen dismenorrea (menstruación difícil y dolorosa), dispareunia (dolor durante las relaciones sexuales), alteraciones menstruales e infertilidad. Se ha sugerido que la endometriosis leve o mínima está asociada con la infertilidad en numerosos estudios, Hasson H. M., "Incidence of Endometriosis in Diagnostic Laparoscopy", *J. Reprod. Med.* **1976**, *16*: 135 y se ha revisado recientemente, Bancroft, *et al.*, "Minimal/Mild Endometriosis and Infertility. A Review", *Br. J. Obstet. Gynecol.* **1989**, *96*: 454. Se desconoce todavía el mecanismo por el que una endometriosis mínima causa infertilidad. Se han postulado efectos adversos sobre la foliculogénesis, la ovulación, el transporte del óvulo, la fertilización, la calidad del

esperma, los embriones, la función de la fase lútea y un aumento en los índices de aborto espontáneo. Estos efectos pueden estar mediados por la elaboración de factores peritoneales tales como prostaglandinas, citoquinas y factores de crecimiento; la activación de macrófagos peritoneales o alteraciones en la función inmune, tales como una actividad disminuida de células asesinas naturales. Kurzrock *et al.*, "LIF: Not Just a Leukemia Inhibitory Factor", *Endo. Rev.* **1990**, *12*: 208. Algunos autores han sugerido que la receptividad uterina para el embrión puede afectarse principalmente por la presencia de endometriosis, Muscato, *et al.*, "Sperm Phagocytosis by Human Peritoneal Macrophages: A Possible Cause of Infertility in Endometriosis", *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1982**, *144*: 503 y Yovich *et al.*, anteriormente; y datos limitados de endometriosis inducida quirúrgicamente en modelos animales confirman esta hipótesis, Hahn, *et al.*, anteriormente. Además, se han descrito anomalías estructurales en el endometrio de mujeres con endometriosis en comparación con controles fértiles normales, Fedele, *et al.*, anteriormente.

Se han investigado numerosas estrategias para identificar mujeres con endometriosis usando medios no quirúrgicos. Marcadores séricos tales como OC-125 (Barbieri, *et al.* "Evaluation of a Serological Test for the Diagnosis of Endometriosis using a Monoclonal Antibody OC-125", SGI Annual Meeting **1985**; Marzo: 331P (resumen)) están aumentados en mujeres con endometriosis, aunque el solapamiento con normales o con otras patologías limita seriamente su utilidad como un ensayo de diagnóstico, Hornstein, *et al.*, "Menstrual Cyclicity of CA-125 in Patients with Endometriosis", *Fertil. Steril.* **1992**, *58*: 279. Además, dada su elevación escalonada con la gravedad de la enfermedad, el OC-125 tiene escasa utilidad en casos de endometriosis mínima o leve. Otras modalidades, tales como MRI o ecografía también tiene su mayor sensibilidad en presencia de una endometriosis avanzada. Hasta la fecha, ningún otro método aparte de la laparoscopia ha demostrado proporcionar una eficacia probada para el diagnóstico de fases mínimas o leves de endometriosis.

Aunque la receptividad uterina continúa siendo un fenómeno escasamente conocido, se piensa que la unión inicial del embrión al revestimiento uterino maternal es una etapa crítica en el proceso de implantación. Se ha definido una ventana de implantación mediante estudios descriptivos de los años 50, así como en estudios más recientes usando tecnologías reproductivas avanzadas, Hertig *et al.*, 1956 y Navot *et al.*, 1992. La presencia de una molécula de adhesión celular integrina que aparece fielmente en las células epiteliales endometriales después del día 19 del ciclo menstrual normal, se corresponde con este supuesto tiempo de implantación, Lessey, *et al.*, "Integrin Adhesion Molecules in the Human Endometrium", *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*: 188. La expresión de esta integrina, el receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_3$, también se retrasa en mujeres con retraso de la maduración del endometrio (en las que histología endometrial se retrasa o retarda debido a niveles hormonales inadecuados o a una respuesta disminuida a los niveles de hormonas existentes). Como se ha sugerido por algunos que la infertilidad debida a endometriosis puede reflejar una deficiencia en la receptividad uterina, es de interés investigar la expresión de esta proteína en el endometrio de mujeres con infertilidad. El uso de integrinas como herramientas de diagnóstico para investigar la receptividad uterina demuestra ser de un valor significativo en la identificación de individuos afectados y ayuda a la comprensión de la etiología de la infertilidad asociada con formas leves de endometriosis.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos de predicción de la endometriosis. También están dentro del alcance de la invención métodos de uso de anticuerpos monoclonales contra la integrina β_3 .

Los métodos de predicción de la endometriosis comprenden obtener una muestra de endometrio seleccionada del día 20 al 24 del ciclo menstrual, identificar la muestra endometrial como nulípara, poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para la integrina β_3 , ensayar para determinar la integrina β_3 en la muestra y correlacionar la ausencia de integrina β_3 con endometriosis, donde el endometrio se identifica como endometriosis leve/mínima. La presente invención también es útil en la predicción de la endometriosis en la población femenina infértil general.

Los métodos de uso de anticuerpos monoclonales contra integrina β_3 para predecir la endometriosis comprenden obtener una muestra de endometrio seleccionada del día 20 al 24 del ciclo menstrual, poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para la integrina β_3 , ensayar para determinar la β_3 en la muestra, correlacionar la ausencia de β_3 con endometriosis, donde el endometrio se identifica como nulíparo o tiene una endometriosis leve/mínima.

La presente invención depende de la detección de la ventana óptima de implantación embrionaria en el endometrio por detección de la subunidad β_3 de la integrina en una muestra endometrial, preferiblemente con un anticuerpo monoclonal.

Estos y otros aspectos de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se tome junto con las siguientes Figuras.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa una tinción con inmunoperoxidasa de un endometrio normal. Las microfotografías representan el patrón de distribución para seis integrinas diferentes que no parece cambiar en todo el ciclo menstrual. Las áreas oscuras representan la tinción positiva, las áreas claras representan la ausencia de tinción (ausencia de la subunidad de integrina específica).

La tinción inmunohistoquímica de las subunidades del receptor de colágeno/laminina: α_2 (A), α_3 (B), α_6 (C) y β_4 (D) muestran una tinción marcada del epitelio ($\leftarrow$) y los microvasos ($\leftarrow$) sin una tinción estromal significativa (*) para α_2 , α_3 y β_4 . Observese tinción α_6 basolateral y tinción basal para β_4 . La tinción para las subunidades del receptor de fibronectina α_4 (E) no está presente en la fase proliferativa, α_5 (F) muestra una tinción mesenquimal predominante (*) con tinción epitelial disminuida ($\leftarrow$). Las inmunorreacciones (áreas de tinción oscura) se revelaron mediante complejo avidina-biotina-peroxidasa usando diaminobenzadina como un cromógeno. Para una mayor sensibilidad, no se aplicó una contratinción. Aumentos: 125x.

La Figura 2 muestra microfotografías de la tinción inmunohistoquímica para la subunidad α_1 de integrina en endometrio proliferativo frente a secretor. La tinción estaba en gran medida ausente en el epitelio glandular ($\leftarrow$) en la fase proliferativa (A) y era pronunciada en todas las secciones después del día 14 del ciclo menstrual (B; endometrio del día 20). La tinción de la microvasculatura ($\leftarrow$) también era pronunciada y no cambiaba en todo el ciclo menstrual. La tinción observada en las glándulas endometriales secretoras era significativamente superior a la del fondo (C). Aumentos: 125x.

La Figura 3 presenta la inmunotinción de α_v y β_3 (las dos subunidades de que se emparejan en la integrina receptor de vitronectina) en el endometrio de la fase proliferativa frente a la fase secretora. La intensidad de la tinción de α_v en la fase proliferativa (A) se juzgaba como “+” para las células estromales (*) y “ $\pm$ ” para α_v glandular ($\leftarrow$). La inmunotinción para α_v en el endometrio del día 22 (B) demuestra un aumento significativo en la tinción glandular (ejemplo de intensidad de tinción “+++”). Así mismo, la tinción para β_3 estaba ausente en el epitelio proliferativo (C; $\leftarrow$) y estaba notablemente aumentada en este endometrio secretor del día 22 (D). Aumentos: 125x.

La Figura 4 muestra una intensidad de tinción relativa para las subunidades α_v y β_3 epiteliales en 35 muestras endometriales durante todo el ciclo menstrual. El patrón de expresión para α_v se muestra en A y muestra un aumento gradual en la tinción durante todo el ciclo menstrual. Por el contrario, el patrón para β_3 en B muestra un aumento más brusco en esta subunidad de integrina aproximadamente el día 20 del ciclo menstrual. Las muestras se clasificaron en fases de acuerdo con el último ciclo menstrual. A las secciones se les asignó una puntuación de 0 (-; negativa), 1 ($\pm$; débil), 2 (+; moderada) o 3 (+++; intensa) por un observador a ciegas y se confirmó por un segundo observador.

La Figura 5 representa la intensidad de tinción de β_3 epitelial en 12 pacientes con infertilidad con maduración del endometrio retrasada. Se extirpó endometrio de mujeres que se estaban sometiendo a una evaluación para infertilidad. Las biopsias se separaron en dos grupos en base a la correlación entre criterios histológicos y el fechado del ciclo menstrual en base al momento de ovulación y/o al periodo menstrual posterior. Pacientes con biopsias endometriales 3 o más días “fuera de fase” (grupo OOP) se compararon con 25 biopsias endometriales que estaban “en fase” (normales) y se muestran en A. A las secciones se les asignó una puntuación de 0 (-; negativa), 1 ($\pm$; débil), 2 (+; moderada) o 3 (+++; intensa), en base a la intensidad de la tinción de β_3 epitelial. Los ejemplos de tinción inmunohistoquímica de una biopsia “fuera de fase” (B) y una muestra “en fase” normal (C) se incluyen para contrastar la tinción β_3 epitelial en cada grupo. Aumentos: 400x.

La Figura 6 presenta un análisis de inmunotransferencia de endometrio proliferativo y secretor teñido para la subunidad β_3 . (A) La inmunotransferencia de un extracto de plaquetas (carril 1) comparado con 2 muestras de la fase proliferativa temprana y media (carriles 2, 3) y de la fase lútea (carriles 4 y 5; días 23 y 26, respectivamente) demuestra una banda de aproximadamente 95 kD de peso molecular, que se corresponde con β_3 . Las muestras de endometrio se digirieron parcialmente con collagenasa y los elementos glandulares se obtuvieron (B) usando una modificación de los métodos de Satyaswaroop *et al.*, “Isolation and Culture of Human Endometrial Glands”, *J. Clin. Endocr. Metab.* **1979**, 48: 639. Las glándulas aparecían como estructuras huecas sin el estroma circundante. La inmunofluorescencia de muestras de los carriles 3 y 4 (C y D, respectivamente) se corresponde con la ausencia o presencia de la banda de 95 kD en A. Aumentos: 400x.

La Figura 7 es un diagrama de dispersión que muestra la tinción inmunohistoquímica para la subunidad de integrina β_3 en muestras endometriales de los días 1 a 28 del ciclo. Todas las muestras tenían un fechado endometrial conocido y ninguna estaba histológicamente fuera de fase.

La Figura 8 presenta la inmunotinción para la subunidad β_3 y el receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_3$. Las células epiteliales endometriales (puntas de flecha) experimentaron alteraciones en la expresión de β_3 durante todo el ciclo menstrual. Se obtuvieron muestras de la fase proliferativa (A), de la fase secretora temprana (B; día 18) y de la fase secretora media (C; día 22). Una biopsia endometrial a partir de un paciente con endometriosis leve (D) no tenía tinción epitelial para β_3 a pesar de haberse juzgado como “normal, en fase día 22-23” por los criterios histológicos. Las inmunorreacciones (áreas de tinción marrón) se revelaron mediante el complejo de avidina-biotina-peroxidasa usando diaminobenzadina como cromógeno. Los elementos vasculares (asteriscos) se teñían positivos para la subunidad β_3 en todas las muestras. Para un mejor contraste, las secciones se contratiñeron con verde de metilo. La tinción verde significa la ausencia de expresión de β_3 . Los patrones de tinción en A y B se corresponden con un HSCORE de 0 y en “C” con un HSCORE de 2,6. Aumentos: 200x.

La Figura 9 es una comparación de los resultados de inmunotinción para integrina β_3 endometrial en controles fértiles normales (Control; n = 20), mujeres infértiles con endometriosis y partos anteriores (con partos; n = 28) y mujeres infértiles nulíparas con endometriosis (nulíparas; n = 76). El ensayo t para muestras no relacionadas compara la media de dos grupos y determina la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar; el azar se indica

como un valor p. Usando el ensayo t para muestras no relacionadas, la HSCORE global era significativamente inferior en el último grupo en comparación con cualquiera de los otros dos. Se calcula el HSCORE como se describe.

- La Figura 10 presenta la distribución de las subunidades de integrina α_4 y β_3 durante el ciclo menstrual normal. Obsérvese que la coexpresión de ambas subunidades se corresponde con la supuesta ventana de implantación, días 6-9 postovulación.

Descripción de las realizaciones preferidas

- La presente invención se refiere a métodos de predicción de la endometriosis. También están dentro del alcance de la invención métodos de uso de anticuerpos monoclonales contra integrina β_3 .

Los métodos de predicción de la endometriosis comprenden obtener una muestra de endometrio seleccionada del día 20 al 24 del ciclo menstrual, identificar la muestra endometrial como nulípara, poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para integrina β_3 , ensayar para determinar la integrina β_3 en la muestra y correlacionar la ausencia de integrina β_3 con endometriosis, donde el endometrio se identifica como endometriosis leve/mínima. La muestra de endometrio se selecciona preferiblemente de los días 20 a 24 del ciclo menstrual, más preferiblemente de los días 20 a 23 del ciclo menstrual, aún más preferiblemente del día 22 del ciclo menstrual. Los días 20-24 del ciclo se corresponden con los días 6-10 postovulación. La presente invención también es útil en la predicción de la endometriosis en la población femenina infértil general.

Los métodos de uso de anticuerpos monoclonales contra integrina β_3 para predecir la endometriosis comprenden obtener una muestra endometrio, poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para integrina β_3 , ensayar para determinar la β_3 en la muestra, correlacionar la ausencia de β_3 con endometriosis, donde el endometrio se identifica como nulípara o tiene una endometriosis leve/mínima.

Para los fines de la presente invención, la subunidad β_3 puede ser β_3 sola o β_3 en combinación con otra subunidad de integrina, por ejemplo, α_v .

Como se usa la presente memoria, la integrina se define como una clase diversa de receptores de glicoproteínas expresados en la membrana celular. Las integrinas son moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las integrinas están compuestas por subunidades α y β heterodiméricas y están implicadas en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. La familia de las integrinas es un grupo ampliamente distribuido de receptores compuestos por parejas de heterodímeros α/β asociados de forma no covalente que median en la adhesión leucocito-leucocito y leucocito-endotelio celular, así como las interacciones celulares con los componentes de la matriz extracelular tales como colágeno, laminina, fibrinógeno y fibronectina, y la interacción célula-célula en tejidos organizados.

Aunque se encuentran integrinas en prácticamente todos los tipos celulares (siendo la excepción los glóbulos rojos), la expresión de subunidades de integrina varía de un tipo celular a otro. En el endometrio uterino humano, como se determina la presente memoria, las células epiteliales glandulares expresan principalmente las subunidades de integrina α_2 , α_3 y α_6 , que son receptores de colágeno y laminina. Las células estromales expresan predominantemente α_5 , un receptor de fibronectina. La presencia de α_1 en células epiteliales glandulares es específica del ciclo menstrual, encontrándose sólo durante la fase secretora. La expresión de ambas subunidades del receptor de vitronectina, α_v/β_3 , también experimenta cambios específicos del ciclo menstrual en las células epiteliales endometriales. La expresión de α_v aumenta durante todo el ciclo menstrual, mientras que la subunidad β_3 aparece bruscamente el día 20 del ciclo menstrual en las células epiteliales luminales y glandulares. Se descubrió también que la expresión de α_4 se interrumpía el día 23. El ensayo para la expresión de β_3 con anticuerpo monoclonal SSA6 reveló expresión de β_3 desde el día 20 en adelante en el ciclo. La expresión de α_4 comienza el día 14 y deja de expresarse después del día 23, como se terminó por el ensayo de α_4 con anticuerpo monoclonal B5G10, suministrado por Martin Hemler, Dana Farber Cancer Center, Boston, MA. Además, de acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que la expresión de α_4 y β_3 se solapa entre los días 19-21, la ventana de implantación.

Como resultado, como se observa en la Figura 10, las integrinas definen la ventana de implantación en la hembra fértil en edad reproductiva. Estas moléculas de adhesión celular están dinámicamente reguladas alrededor del momento de la implantación y sirven como excelentes proteínas marcadoras para este momento del ciclo menstrual. Como se muestra en la Figura 10, la coexpresión de α_4 y β_3 (que representa dos especies de integrinas diferentes) coincide exactamente con la ventana de implantación conocida (días 6-9 postovulación en base a los trabajos de Hertig *et al.*, 1956 y Navot *et al.*, 1992). Al contrario que la integrina β_3 , que parece estar alterada en numerosas mujeres con infertilidad, la integrina α_4 no lo está. Aunque el proceso de implantación implicará probablemente muchas proteínas o factores diferentes, tales como la coexpresión de dos integrinas diferentes como α_4 y β_3 , la pérdida de una sola entidad tal como β_3 parece ser suficiente para la pérdida de la fertilidad observada en estas pacientes con endometriosis.

La presente invención se refiere al endometrio del útero de un mamífero. La pared uterina es en su mayor parte músculo liso o miometrio. El endometrio, una capa glandular de grosor variable extremadamente sensible a las hormonas estrógenos/progesterona, reviste el miometrio. El endometrio está compuesto por varias capas funcionales. La capa más próxima al miometrio se denomina capa basal y la capa más próxima a la superficie se conoce como funcional. Este tejido está constituido por células epiteliales, células estromales (o mesenquimales) y leucocitos endo-

metriales. Las células epiteliales son glandulares (formando glándulas por debajo de la superficie del endometrio) o luminales (revistiendo la superficie del endometrio). Estos tipos diferentes de epitelio sirven para fines diferentes y los patrones de tinción para diferentes proteínas marcadoras no son siempre iguales entre el epitelio glandular y luminal. La superficie luminal será la primera que se encontrará el embrión humano y se piensa que está implicada en la unión inicial. El endometrio de niñas premenopáusicas y mujeres postmenopáusicas está atrófico debido a la falta de hormonas, estrógenos y progesterona. En las mujeres en edad reproductiva, el endometrio experimenta cambios cíclicos de desarrollo basados en el ciclo ovárico de liberación hormonal. El primer día de la menstruación es el primer día del ciclo; generalmente la menstruación se termina el día 5. Entonces se reanuda el crecimiento endometrial bajo la influencia de los estrógenos y evoluciona hasta el día 14, la fase proliferativa, y hasta aproximadamente el día 28. Desde el día 14 hasta el día 28, el endometrio también muestra signos de desarrollo glandular aumentado y secreción, la fase secretora, debido en su mayor parte a la influencia de la progesterona. Durante la fase folicular, mientras los folículos están creciendo en el ovario y el estrógeno es la hormona dominante, el endometrio se hace más grueso. Con la ovulación (típicamente del día 14 al día 28 del ciclo) las mujeres se exponen a estrógenos más progesterona. Esto se denomina la fase secretora o lútea y se observa por una serie estereotípica de cambios histológicos que avanzan a medida que continúa el ciclo. Estos cambios histológicos se usan por los patólogos para fechar el endometrio, un proceso que continúa siendo controvertido a pesar de su uso durante los últimos 40 años. No se han descrito marcadores inmunohistoquímicos fiables que hayan demostrado su utilidad en el fechado endometrial.

La disfunción de la fase lútea (LPD) es una expresión para un retraso del desarrollo del endometrio. Es una causa conocida de infertilidad debido a la falta de sincronía entre el huevo fertilizado y el endometrio. Si un embrión está listo para unirse pero el endometrio está retrasado, entonces es poco probable que se produzca la gestación. Las causas para la LPD incluyen una producción hormonal inadecuada en el ovario y pueden implicar una señalización defectuosa desde los centros superiores, tal como una producción de hormona gonadotrópica inadecuada desde la pituitaria o el hipotálamo. La LPD es una causa conocida de infertilidad y aborto espontáneo y puede corregirse con aumento de hormonas.

Las fases de la implantación embrionaria incluyen: aposición cuando las células epiteliales del embrión se unen a las células epiteliales externas (luminales) de la superficie endometrial maternal; adhesión; e invasión del trofoblasto en el estroma subyacente, donde se establece y comienza a desarrollarse. Se realiza el contacto con los vasos sanguíneos maternos para captar nutrientes y sangre oxigenada y desprenderse de productos de desecho durante la fase de invasión. La fase de desarrollo que alcanza el embrión en el momento de la implantación es la fase de blastocisto, que se produce al mismo tiempo que la eclosión. Existen pruebas de que la eclosión es necesaria antes de que se produzca la implantación, quizá porque el embrión debe tener sus células epiteliales expuestas (fuera de la cubierta de la zona pelúcida) para interactuar con las capas celulares maternas. Como se explica en la presente memoria, esta interacción se produce a través de integrinas.

Para los fines de la invención, la endometriosis se define como un acontecimiento ectópico de tejido endometrial, frecuentemente formando quistes que contienen glóbulos rojos alterados. Las fases de la endometriosis se han establecido por la American Fertility Society, AFS. American Fertility Society: Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis: 1985. *Fertil Steril* 1985; 43:351-352. La AFS define la endometriosis de fase 1 como leve y la endometriosis de fase 2 como mínima.

Como se explica en la presente invención, la infertilidad se define como una fertilidad disminuida o ausente de tal modo que un mamífero femenino tiene estructuras anatómicas adecuadas y una función equívoca con posibilidad de gestación que puede no llegar a término. El término nulípara incluye, y no se limita a, el endometrio de un mamífero hembra que no ha tenido descendencia. El término nulípara incluye hembras que han concebido descendencia y que no han llevado la gestación mas allá de las 20 semanas, teniendo en su lugar abortos espontáneos. Las con partos se definen de acuerdo con la presente invención como que han dado a luz crías vivas o muertas después de una gestación de 20 semanas y un peso de 500 gramos para seres humanos. Son aplicables duraciones de gestación y peso apropiadas para otros mamíferos, de tal modo que serían comparables con lo expuesto para seres humanos.

Para los fines de la presente invención, los mamíferos incluyen, pero sin imitación, el orden Rodentia, tal como ratones; orden Lagomorpha, tal como conejos; más particularmente, el orden Carnivora, que incluye felinos (gatos) y caninos (perros), aún más particularmente, el orden Artiodactyla, bovinos (vacas) y suinos (cerdos); y el orden Perissodactyla, que incluye equinos (caballos) y, más particularmente, el orden Primates, Ceboidea y Simoidea (monos) y Anthropeoidea (humanos y simios). Los mamíferos de las realizaciones más preferidas son seres humanos. Los anticuerpos monoclonales útiles en la práctica de la invención incluyen cualquier anticuerpo monoclonal que tenga una afinidad por o que se una a la subunidad β_3 de integrina. Un ejemplo de dicho anticuerpo monoclonal es SSA6. Puede producirse anticuerpo monoclonal SSA6 como se describe en Bennett *et al.*, *PNAS* **1983**, 80: 2417 y Brass *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260: 7876.

También pueden usarse anticuerpos monoclonales que reconocen β_3 combinada con otra subunidad de integrina. Una de dichos anticuerpos monoclonales 23C6, que puede prepararse de acuerdo con el método de Davies *et al.*, *J. Cell Biol.* **1989**, 109: 1817. La inmunotinción con anticuerpos monoclonales tales como 23C6 (específico para la integrina $\alpha_v\beta_3$ intacta, es decir, el receptor de vitronectina) produce un patrón idéntico a SSA6, que sólo mide la subunidad β_3 . Esto demuestra que mientras que los anticuerpos específicos de α_v miden todas las integrinas que contienen α_v , los anticuerpos que reconocen la integrina $\alpha_v\beta_3$ intacta o la subunidad β_3 pueden usarse para estudiar esta integrina ("receptor de vitronectina" $\alpha_v\beta_3$).

Podemos usar otros anticuerpos monoclonales. La preparación de anticuerpos monoclonales se conoce por los especialistas en la técnica. Particularmente, el método de Kohler y Milstein, *Nature* **1975**, 256: 495 puede usarse para producir anticuerpos monoclonales para el uso en la invención.

- 5 Los métodos de obtención de muestras de tejido endometrial para análisis incluyen cualquier técnica quirúrgica y no quirúrgica conocida en la técnica. Los métodos quirúrgicos incluyen, pero sin limitación, biopsia, raspado y legrado. Los métodos no quirúrgicos incluyen, pero sin limitación, lavados uterinos y cepillados uterinos con evaluación inmunocitoquímica.
- 10 Los métodos de detección de β_3 en el endometrio incluyen todos los métodos de identificación de glicoproteínas conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, técnicas inmunohistoquímicas tales como inmunotransferencia o transferencia de Western, tinción con inmunoperoxidasa, marcaje con fluoresceína, diaminobenzadina y biotinilación.
- 15 Generalmente, la inmunohistoquímica implica la tinción de muestras tisulares crioseccionadas. Como se usan en la presente memoria, las muestras de endometrio pueden crioseccionarse hasta aproximadamente 4-8 μm de grosor. El endometrio se pone en contacto un anticuerpo primario, tal como SSA6 seguido de contacto con un anticuerpo secundario, tal como anticuerpo antirrátón de cabra biotinilado. Después, el endometrio se incuba en el complejo macromolecular de peroxidasa de rábano rústico conjugada con avidina, seguido de incubación con cromógeno, tal como diaminobenzadina. Después puede añadirse fluoresceína para observar la distribución de integrinas.
- 20 como diaminobenzadina. Después puede añadirse fluoresceína para observar la distribución de integrinas.

- La inmunotransferencia implica el análisis de proteínas, en la presente memoria integrinas, en electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida SDS-PAGE. El gel se procesa en condiciones no reductoras y las muestras se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, por ejemplo. La membrana se incuba en medios que contienen anticuerpo primario, tal como SSA6. El filtro se revela usando un anticuerpo secundario, tal como anticuerpo antirrátón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina.
- 25

- Los métodos de la presente invención que se refieren a la predicción de la endometriosis comprenden obtener una muestra de endometrio, identificar la muestra de endometrio como nuli para, poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para integrina β_3 , ensayar para determinar la integrina β_3 en la muestra y correlacionar la ausencia de integrina β_3 con endometriosis, donde la endometriosis es una endometriosis leve/mínima.
- 30

- También están dentro del alcance de la invención métodos de uso de anticuerpos monoclonales contra integrina β_3 para predecir la endometriosis y comprenden obtener una muestra de endometrio, identificar la muestra de endometrio como nuli para, poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para integrina β_3 , ensayar para determinar la integrina β_3 en la muestra, correlacionar la ausencia de integrina β_3 con endometriosis, donde el endometrio se identifica como endometriosis leve/mínima.
- 35

- Como se proporciona en la presente memoria, la subunidad β_3 de la integrina aparece el día 20 del ciclo menstrual. También se proporciona en la presente memoria que α_v/β_3 en el epitelio endometrial se une a fibronectina, vitronectina y osteopontina. Estas moléculas pueden proporcionar un puente entre la integrina α_v/β_3 del endometrio y el embrión. Además, los pacientes con disfunción de la fase lútea tienen una maduración endometrial retrasada, infertilidad y tinción negativa para β_3 del día 20 al 24.
- 40

- Aunque aún no es seguro que exista una señal reguladora para la inducción de la integrina endometrial del día 19 a 20, como resultado de la presente invención, actualmente se sabe que el líquido peritoneal contiene agentes bioactivos que parecen estar relacionados con la expresión deficiente de integrinas en mujeres con infertilidad y endometriosis. Los componentes bioactivos, con un entorno peritoneal anormal, pueden conducir a un fallo en las interacciones paracrinas entre células endometriales dentro del útero. Los candidatos incluyen antagonista del receptor de interleuquina 1 β , aumentado en mujeres con endometriosis mínima y leve y que recientemente se ha demostrado que interfieren con la implantación en un modelo de roedor, Simon, C., *et al.*, Annual Meeting of the American Fertility Society, Montreal, S2-Abst O-3, 1993. Una trompa de Falopio abierta o no cerrada puede ser un requisito previo para los efectos mediados por endometriosis de la integrina β_3 endometrial.
- 45
- 50

- La presente invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 55

Ejemplos

Muestras humanas

- Se obtuvo endometrio de 35 mujeres en edad reproductiva en el momento de la histerectomía. Se obtuvo tejido desde la fase proliferativa temprana (día 5) hasta la fase secretora tardía (día 28) y todas las histerectomías se realizaron por enfermedad benigna. Se realizaron biopsias endometriales en mujeres como parte de su evaluación para infertilidad. Todas las pacientes estaban ciclando normalmente y ninguna había recibido hormonas durante al menos 3 meses antes de la cirugía. Se evaluó el fechado endometrial de acuerdo con los criterios de Noyes *et al.*, "Dating the Endometrium", *Fertil. Steril.* **1950**, 1: 3. Las biopsias endometriales se evaluaron en el contexto del momento de
- 60

la ovulación y/o el comienzo del siguiente periodo menstrual. Las muestras se juzgaron como “fuera de fase” y el fechado histológico estaba retrasado en 3 o más días con respecto al día predicho del ciclo menstrual. El endometrio proliferativo se clasificaba en base a la histología y al último periodo menstrual. Las muestras se transportaron en hielo al laboratorio y se congelaron de golpe en nieve carbónica y se almacenaron a -70°C.

Anticuerpos

Se adquirieron anticuerpos monoclonales (Mab) P1H5, P1B5, P1D6 específicos para las subunidades α_2 , α_3 , α_5 , respectivamente, de los Drs. Elizabeth Wayner y William Carter. Se adquirieron Mab TS2/7 y B-5H10 dirigidos contra las subunidades α_1 y α_4 , respectivamente, del Dr. Martin Hemler. Se adquirió GoH3, un Mab específico dirigido contra α_6 , del Dr. Arnoud Sonnenberg. Se adquirió Mab SSA6 específico para la subunidad β_3 de los Drs. Joel Bennett y James Hoxie. Se adquirió Mab LM142 contra α_v del Dr. David Chersesh. El anticuerpo β_4 se adquirió del Dr. Steven Kennel. El anticuerpo 23C6 que reconoce β_3 unido a α_v se obtuvo de Michael Horton.

Inmunohistoquímica

La tinción con inmunoperoxidasa se realizó en secciones de criostato de muestras de endometrio de todo el ciclo menstrual. Se colocaron criosecciones seriadas de 4-8 μm de grosor en portaobjetos recubiertos con poly-L-lisina fijadas en acetona a -20°C durante 10 minutos y teñidas usando el kit Vectastain Elite® ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se usó diaminobenzadina (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) como el cromógeno. Se colocó anticuerpo primario en las criosecciones después del bloqueo con albúmina de suero bovino al 1% en PBS y se dejó que se uniera a temperatura ambiente durante 1 hora. Un aclarado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7,2 a 7,3 se siguió del anticuerpo secundario, que consistía en anticuerpo antirratorón de cabra biotinilado durante 30 minutos. Después de un aclarado con PBS, las peroxidases endógenas se inactivaron con una incubación de 30 minutos con H_2O_2 al 0,3% en etanol absoluto, seguido de una rehidratación de 30 minutos en PBS. Después, se incubó complejo macromolecular de avidina:peroxidasa de rábano rusticano biotinilada (ABC) en la secciones durante 30 minutos antes de añadir diaminobenzadina durante 3 minutos para terminar la reacción. Algunas muestras se trataron con una dilución 1:200 de anticuerpos antirratorón marcados con fluoresceína durante 1 h, para microscopía inmunofluorescente. Posteriormente, las muestras se lavaron en PBS y se montaron. La tinción resultante se evaluó en un microscopio Nikon a bajos aumentos (100x) y a mayores aumentos (400x) con o sin fluorescencia. La tinción se juzgó como ausente (-), débil ($\pm$), moderada (*) o intensa (++) . Se presentan ejemplos de cada una en la Figura 3. Se realizaron microfotografías usando una película Kodak T-MAX 100 ASA.

Distribución de integrinas en endotelio normal

La distribución de las subunidades α_2 , α_3 , α_6 y β_4 , de integrinas que reconocen principalmente colágeno (Col) y/o laminina (LM) se muestra en la Figura 1 A-D. Estas subunidades estaban presentes en el epitelio glandular ($\leftarrow$) durante todo el ciclo menstrual. Su distribución dentro del endometrio era típica de la observada para la mayoría de tejidos epiteliales. Las subunidades α_2 y α_3 estaban distribuidas alrededor de la circunferencia completa de las células, mientras que las subunidades α_6 y β_4 parecían estar localizadas en la superficie basolateral adyacente a la membrana basal (BM) de las glándulas endometriales. La expresión de estas subunidades por el mesénquima (*) era menos pronunciada. Mientras que se observaba una tinción moderada para α_6 en células estromales (Figura 1C), se observaba una tinción muy ligera para β_4 . La expresión de las unidades α_4 y α_5 de integrinas que se sabe que se unen a fibronectina (Tabla 1) estaba muy restringida. La subunidad α_4 era indetectable por encima de la tinción de fondo (compárense la Figuras 1E con la Figura 2C) en el epitelio o el mesénquima. La subunidad α_5 (Figura 1F), representativa del receptor de fibronectina clásico, no se observaba en los componentes epiteliales, pero se expresaba mucho en el mesénquima que es rico en fibronectina.

TABLA 1

Distribucion de integrinas por especificidad de ligando

	Colágeno/Laminina	Fibronectina/Vitronectina
	α_1/β_1	α_4/β_1
Subunidad de integrina	α_2/β_1	α_5/β_1
	α_3/β_1	α_v/β_1
	α_6/β_1	α_v/β_3
	α_6/β_4	

Se descubrió que la intensidad de la inmunotinción para otras tres subunidades de integrinas se modificaba de una forma dependiente del ciclo menstrual. La inmunotinción para α_1 en la fase proliferativa (Figura 2A) era sólo ligeramente superior a los niveles de fondo (Figura 2C). La intensidad de la tinción aumentaba durante toda la fase secretora (Figura 2B). Esta tinción circunferencial intensa se descubrió en el epitelio glandular y luminal en todas las muestras desde el día 15 al 28. Así mismo, α_v se expresaba débilmente tanto en el epitelio como en el mesénquima en la fase proliferativa (Figura 3A) y la tinción aumentaba gradualmente durante la fase secretora hasta el nivel observado en la Figura 3B. Durante la fase proliferativa, la tinción de β_3 sólo estaba presente en las células mesenquimales (Figura 3C). El aumento de la tinción de β_3 era evidente en el epitelio endometrial sólo después del día 19 del ciclo menstrual (Figura 3D) en el epitelio luminal así como glandular y también estaba presente en una distribución pericelular. Por el contrario, la capa basal no se teñía significativamente ni para α_v ni para β_3 . Este patrón de cambio de α_v y β_3 epitelial durante todo el ciclo se estudió en 35 muestras endometriales y se representa gráficamente en la Figura 4A y 4B.

Se expresaron uniformemente durante todo el ciclo menstrual receptores de colágeno/laminina (col/LM) caracterizados por α_2 , α_3 y α_6 , véase la Tabla 2. La distribución pericelular de las subunidades α_2 y α_3 era distintivamente diferente de la de la subunidad α_6 . Característica de un receptor de laminina, α_6 se concentraba en la superficie basolateral. También se descubrió que la subunidad β_4 , que se empareja con α_6 , se distribuía en la superficie basolateral de las células epiteliales y su distribución parecía aun más restringida al polo basal. La integrina α_5/β_1 , un receptor de fibronectina principal, también se expresaba uniformemente durante todo el ciclo menstrual. A diferencia de los receptores de colágeno y laminina, la distribución de α_5/β_1 estaba limitada al mesénquima.

Se variaba el patrón de distribución temporal de α_v . La inmunotinción se detectaba primero antes de la fase secretora con un aumento en la intensidad durante todo el ciclo. Una subunidad que se sabe se empareja con α_v es β_3 . β_3 no está presente de forma característica en las células epiteliales. La aparición brusca de la subunidad β_3 después del día 19 sugiere que la expresión del receptor de fibronectina está regulada en el endometrio humano. La tinción α_v/β_3 epitelial aumentada en ciclos normales se correlaciona con una ventana de implantación dentro de la fase secretora. Aunque no se ha establecido anteriormente la base fisiológica para la ventana de implantación, un papel propuesto de las integrinas en la interacción inicial entre las células maternas y embrionarias indica un periodo de receptividad endometrial.

TABLA 2

Distribución de subunidades de integrina en el endometrio normal durante el ciclo menstrual

Tipo celular	Col/LM					FN/VN			
	α_1	α_2	α_3	α_6	β_4	α_4	α_5	α_v	β_3
Epitelial									
proliferativo	○	•	•	• ^b	• ^b	○	○	○	○
secretor temprano	•	•	•	•	•	○	○	*	○
secretor tardío	•	•	•	•	•	○	○	•	•
Estromal									
proliferativo	○	○	○	•	○	○	•	•	•
secretor temprano	○	○	○	*	○	○	*	•	•
secretor tardío	*	○	○	•	○	○	*	•	•

b= distribución basolateral de la tinción

• = + o ++ tinción

* = ± tinción

□ = - tinción

Integrinas en endometrio discordante

La presencia de la subunidad β_3 epitelial parecía ser un marcador interno constante de la maduración de la fase lútea y el momento de la expresión de β_3 se correlacionaba con el periodo de perimplantación o ventana de implantación

embrionaria. Para investigar si este fenómeno sería útil en la evaluación clínica de las biopsias endometriales, se realizó una inmunotinción en muestras endometriales de fase lútea de ciclos que mostraban pruebas de retraso en la maduración. Se compararon biopsias endometriales de 25 mujeres que tenían concordancia entre el fechado menstrual e histológico (grupo “normal”) con 12 biopsias que se identificaron con ≥ 3 días fuera de fase (OOP) y en base al momento de la ovulación o al menstruio posterior. Las muestras se inmunotñieron para las subunidades α_1 , α_v y β_3 . Todas las biopsias se realizaron los días 20 a 24 del ciclo menstrual. En todos los casos, la inmunotinción para estos tres antígenos estaba presente en el epitelio endometrial del grupo normal. En biopsias que estaban retrasadas 3 días o más, la tinción de α_1 y α_v estaba presente pero la tinción de β_3 epitelial estaba ausente. La comparación de la intensidad de tinción de β_3 en los dos grupos se muestra en la Figura 5A. Acompañando a las microfotografías de la inmunotinción de β_3 de biopsias fuera de fase (OOP; B) se incluyen biopsias “en fase” normales (C), que demuestran la discrepancia observada en la tinción de β_3 . En ciclos de tratamiento posteriores, 2 pacientes de OOP se sometieron a una biopsia repetida durante un ciclo normalizado en el momento en el que estaba presente la inmunotinción para β_3 epitelial. Esto sugiere que la falta de β_3 no es una deficiencia intrínseca en el grupo OOP. En su lugar las biopsias discordantes que carecían de β_3 todavía no habían establecido el fenotipo lúteo medio de endometrio normal del día 20 al 24.

Recogida de células y extracción con NP-40

Para demostrar adicionalmente que la tinción inmunohistoquímica reflejaba con precisión los cambios en la expresión de la subunidad β_3 en el epitelio endometrial, se realizaron inmunotransferencias (transferencias de Western) en muestras de elementos glandulares endometriales enriquecidos de fase proliferativa y secretora. Se obtuvieron cuatro muestras de endometrio para la evaluación de la subunidad β_3 en el epitelio endometrial proliferativo ($n = 2$) y secretor tardío ($n = 2$). Cada muestra se colocó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DEM; Sigma, St. Louis, MO) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Flow Laboratories, McLean, VA), glucosa (4500 mg/l), tampón Hepes (25 mM), L-glutamina (584 mg/L) y bicarbonato de sodio (3,7 g/l). El endometrio se picó en una placa de petri de plástico antes de la incubación con 6 mg de colagenasa (tipo 1A, 550 unidades/mg; Sigma, St. Louis, Mo) durante 2 horas a 37°C utilizando modificaciones de los procedimientos descritos por Satyaswaroop *et al.*, en “Isolation and Culture of Human Endometrial Glands”, *J. Clin. Endocr. Metab.* **1979**, 48: 639. La suspensión resultante se hizo pasar sucesivamente a través de un tamiz de 250 μm y un tamiz de 38 μm (Newark Wire Cloth Co, Newark NJ). El tamiz grueso (250 μm) eliminaba el material sin digerir mientras que el segundo retenía los elementos glandulares y excluía las células estromales y sanguíneas individuales. Después de un aclarado minucioso, los elementos glandulares se obtuvieron por nuevo lavado con 10 a 20 ml de DMEN. Después, las estructuras glandulares aisladas se transfirieron a un tubo de microfuga de 1,5 ml y se centrifugaron 3 veces (82 x g) durante 2 minutos con lavados intermitentes con PBS. Se prepararon extractos de membrana por adición de pequeños volúmenes (100-200 μl) de Tris-acetato 10 mM, pH 8,0, NP-40 al 0,5%, Ca^{2+} 0,5 mM (TNC) con PMSF 2 mM (fenil metil-sulfonil fluoruro) al sedimento final, se pipeteó y se incubó en hielo durante 15 minutos. El lisado se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 x g en una microcentrífuga. El sobrenadante resultante se denominó extracto de NP-40 y se congeló a -70°C hasta el uso. Una porción del tejido original sin digerir se crioseccionó para localización inmunohistoquímica de β_3 .

Electroforesis en gel e inmunotransferencias

La concentración de proteína de cada extracto de NP-40 y de un extracto de plaquetas (control positivo) se determinaron usando la técnica descrita por Lowry *et al.*, “Protein Measurement With Folin Phenol Reagent”, *J. Biol. Chem.* **1951**, 193: 265. Se añadieron muestras con cantidades equivalentes de proteína a tampón de muestras de electroforesis (Tris base 62,5 mM, SDS al 2%, glicerol al 10%, pH 6,8). Se analizaron muestras mediante SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 6%, usando condiciones no reductoras descritas en Laemmli, U. K., “Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4”, *Nature* **1970**, 227: 680. El gel se transfirió a nitrocelulosa usando un aparato de transferencia de Biorad (Biorad, Richmond, CA) y se bloqueó con BSA al 4% en PBS con Na Azida al 0,2% durante 1 hora. Después de la adición del anticuerpo primario (sobrenadante de SSA6) durante 2 horas, los geles se revelaron usando un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (Promega Corp., Madison, WI) de acuerdo con los métodos descritos por Albelda *et al.*, “EndoCAM: A Novel Endothelial Cell-Cell Adhesion Molecule”, *J. Cell Biol.* **1990**, 110: 1227.

Como se muestra en la Figura 6A, las estructuras epiteliales de la fase proliferativa tenían de escasa a ninguna inmunotinción a 95KD (carriles 2 y 3), en comparación con el control positivo (extracto de plaquetas; carril 1) o con muestras de la fase secretora (carriles 4 y 5) que demostraban una tinción intensa para β_3 . Las glándulas endometriales aisladas aparecían como estructuras tubulares sin estroma circundante (Figura 6B). La tinción inmunofluorescente para β_3 de las muestras que se corresponden con los carriles 3 y 4 (fase proliferativa media y día 23, respectivamente) se muestra en las Figura 6C y D. Obsérvese la usencia de tinción glandular en la muestra proliferativa, mientras que era evidente una inmunotinción tanto glandular como luminal en la fase secretora. Estos datos confirman que la expresión de β_3 epitelial en el endometrio humano es un fenómeno específico de ciclo.

*Determinación de endometriosis**Selección de pacientes*

Se obtuvieron biopsias de todo el ciclo menstrual de 500 mujeres que se estaban sometiendo a una evaluación para infertilidad en la Universidad de Pensilvania. Las biopsias exploraron para la participación en el estudio en base a criterios que incluían un conocimiento exacto del día de ciclo menstrual o histología “en fase” y ausencia de alteraciones del ciclo menstrual (anovulación, suspensión o cese de la ovulación), estado perimenopáusico (sangrado uterino disfuncional), deficiencia de la fase lútea (pruebas histológicas de retraso en la maduración del endometrio), la presencia o uso de un dispositivo intrauterino o endometritis (inflamación del endometrio debida a agentes infecciosos o a irritación química). Así mismo, se excluyeron pacientes con hiperplasia endometrial (un aumento en el número de células en el endometrio), neoplasia (un proceso patológico que da como resultado la formación o crecimiento de tejidos anormales o tumores benignos o malignos) y las que estaban bajo terapia hormonal (incluyendo anticonceptivos orales, terapia de reemplazo de estrógenos y progestágenos). Doscientas sesenta y ocho mujeres cumplían los requisitos para incluirse en este estudio, que variaban del día 2 del ciclo al 27. El diagnóstico primario más común era de endometriosis (41,4%), seguido de una infertilidad inexplicable (23,5%), véase la Tabla 3. Debido al criterio de participación de histología “en fase” normal, como se ha indicado anteriormente, se excluyeron todos los casos de deficiencia de la fase lútea.

TABLA 3

Diagnóstico de sujetos con infertilidad que se están sometiendo a una biopsia endometrial (N = 268)

Diagnóstico	Número %
endometriosis	111 (41,4)
enfermedad tubárica	38 (14,2)
adhesiones pélvicas	17 (6,3)
factor masculino	18 (6,7)
fibroides	9 (3,4)
pérdida gestacional habitual	6 (2,2)
exposición a DES en el útero	4 (1,5)
hiperprolactinemia	2 (0,7)
infertilidad inexplicable	63 (23,5)

Se obtuvieron biopsias endometriales de 241 pacientes después del día 19 (día 6 postovulación o posterior) en base a la hormona luteinizante urinaria LH, al pico o al próximo periodo menstrual, un momento en el ciclo menstrual cuando se expresa β_3 epitelial, Lessey, *et al.*, anteriormente. Los pacientes restantes (n = 27) se biopsiaron antes del día 20 y, por lo tanto, no se esperaba que produjeran la integrina β_3 . En base al trabajo de infertilidad de rutina que incluye diagnóstico laparoscópico, que implica el examen del contenido del peritoneo con un laparoscopio pasado a través de la pared abdominal, 105 (43,6% del grupo) de estas mujeres tenían endometriosis. Las 105 mujeres se consideraron entonces como los casos de ensayo. Veinte mujeres con endometriosis también habían documentado fertilidad anterior, habían dado a luz crías anteriormente, teniendo un número de parto ≥ 1 , donde cada mujer había tenido ≥ 1 parto anterior y se había sometido a una ligación tubárica bilateral o se había identificado claramente una infertilidad por factor masculino (o infertilidad del compañero masculino). Éstas se seleccionaron para servir como controles fértiles. Las 116 mujeres restantes (48,1% del grupo) se consideraban los controles infértiles.

Inmunohistoquímica

Se realizó una tinción con inmunoperoxidasa en las 241 muestras como se describe en Lessey, *et al.*, anteriormente. En resumen, se realizó una tinción con inmunoperoxidasa en secciones de criostato de endometrio de todo el ciclo menstrual. Se colocaron criosecciones seriadas de 4-8 μm de grosor sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se fijaron en acetona a -20°C durante 10 minutos y se tiñeron usando el kit Vectastain Elite[®] ABC (Vector Laboratories,

Burlingame, CA). Se usó diaminobenzadina (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) como el cromógeno. El anticuerpo primario que consistía en SSA6 (específico para la subunidad β_3 del receptor de vitronectina) se colocó sobre las criosecciones después del bloqueo con albúmina de suero bovino al 1% en solución salina tamponada con fosfato, PBS y se dejó que se uniera a temperatura ambiente durante 1 hora. Un aclarado con PBS, de pH 7,2 a 7,4, se siguió de un anticuerpo secundario que consistía en anticuerpo antirrátón de cabra biotinilado durante 30 minutos. Después del aclarado con PBS, las peroxidasas endógenas se inactivaron con una incubación de 30 minutos con H_2O_2 al 0,3% en etanol absoluto seguido de una rehidratación de 30 minutos en PBS. Después, se incubó el complejo macromolecular de avidina:peroxidasa de rábano rústico biotinilado (ABC) en las secciones durante 30 minutos antes de añadir diaminobenzadina durante 3 minutos para terminar la reacción. Las muestras se lavaron posteriormente en PBS y se montaron.

La inmunotinción para β_3 endometrial se realizó en cada una de las 268 biopsias endometriales obtenidas durante todo el ciclo menstrual (véase la Figura 7). Se muestran ejemplos de expresión específica de ciclo de subunidad β_3 usando la tinción inmunohistoquímica en la Figura 8A (proliferativo), Figura 8 B (día 18), Figura 8C (día 22) y una muestra del día 23 del ciclo con tinción negativa en un paciente con endometriosis cuya biopsia “en fase” se leyó como de “día 22-23” en una sección histológica (D). Como se observa en todos los casos, la inmunotinción del endotelio vascular continúa presente incluso en las muestras sin tinción epitelial para esta integrina, sirviendo de este modo como un control interno positivo para técnica de inmunotinción. En base a la distribución de β_3 que se muestra en la Figura 7 y a la teoría de que la subunidad β_3 se expresa normalmente en el endometrio desde el día 20 en adelante, todas las muestras que se fecharon histológicamente el día 20 del ciclo o después se incluyeron para una evaluación adicional (n = 241). Los casos con endometriosis conocida (102/241; 43,5%) se compararon con los controles infértiles sin endometriosis (116/241; 48,1%) y con 20 controles fértiles (20/241; 83%). Como se enumera en la Tabla 4, tanto el grupo con endometriosis como los controles infértiles eran más jóvenes que los controles fértiles. La tinción resultante se evaluó en un microscopio Nikon a bajos aumentos (100x) y mayores aumentos (400x). El HSCORE, un índice semicuantitativo que estima tanto la intensidad como la distribución de la tinción positiva para la integrina β_3 , se calculó usando la siguiente ecuación:

$$HSCORE = \sum P_i (i + 1)$$

donde i = intensidad de la tinción con un valor de 1, 2 ó 3, débil, moderada o intensa, respectivamente, y P_i es el porcentaje de células epiteliales teñidas para cada intensidad, que varía del 0-100%. Se han descrito valores intraobservador bajos (r = 0,994; p = 0,00001) en tejidos uterinos usando esta técnica por Budwit-Novotny, D. A., *et al.*, “Immunohistochemical Analyses of Estrogen Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Using a Monoclonal Antibody”, *Cancer Res.*, 1986 46: 5419-5425. Se ilustran en la Figura 8 ejemplos de HSCORE representativos que reflejan niveles cambiantes de intensidad de tinción y distribución. Se realizaron microfotografías usando una película Kodak 100 ASA.

40 *Análisis estadístico*

Se compararon pacientes con endometriosis infértiles con controles infértiles sin endometriosis y controles fértiles. También se realizaron comparaciones entre pacientes con endometriosis nulíparas y pacientes con endometriosis con partos en características seleccionadas tales como edad y HSCORE y se realizaron usando el ensayo de Wilcoxon no paramétrico. Wilcoxon F., Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bull* 1945 1: 80-85.

El análisis de las características de operador receptor (ROC) se usó para determinar el valor de corte óptimo para el HSCORE en mujeres que se iban a someter a laparoscopia en un futuro. Metz, C. E., Basic Principles of ROC analysis. *Sem Nuclear Med* 1978; 8: 283-298. Se buscaba un valor de corte de HSCORE como el valor predictivo positivo más elevado de endometriosis que significaba búsqueda de una elevada especificidad a costa de una sensibilidad moderada. Un valor predictivo positivo elevado minimiza el número de mujeres que de otro modo se someterían a una cirugía innecesaria, usando este ensayo como una modalidad de diagnóstico para la endometriosis. El valor de corte de HSCORE era de 0,7 que producía una sensibilidad de 3, una especificidad del 91% y un valor predictivo positivo del 86% para la detección de endometriosis.

La asociación entre el HSCORE y la endometriosis se evaluó primero mediante un ensayo no paramétrico (ensayo de Wilcoxon) y se evaluó adicionalmente mediante una regresión logística múltiple en la muestra de 241 mujeres cuyas biopsias eran histológicamente del día 20 del ciclo o posteriores. Como se observa en la Tabla 4, el HSCORE medio era significativamente inferior para el grupo con endometriosis infértil (p < 0,003) en comparación con controles fértiles (p < 0,002) y los controles infértiles sin endometriosis p < 0,012; (Tabla 4). De forma interesante, los controles infértiles sin endometriosis también tenían un HSCORE límite inferior para tinción de β_3 que el grupo de control fértil (p = 0,005).

TABLA 4

Características demográficas y HSCORE de sujetos cuyas biopsias endometriales eran histológicamente normales y del día 20 del ciclo o posterior

	Infértiles con endometriosis	Infértiles sin endometriosis Controles infértiles	Controles fértiles
	n = 105	n = 116	n = 20
Características			
Edad (años)			
media $\pm$ D. T.	34,1 $\pm$ 4,1*	34,5 $\pm$ 4,7**	36,9 $\pm$ 4,9
Gravedad puntuación AFS			
I	40 (38,5%)		
II	44 (42,3%)		
III	15 (14,3%)		
IV	6 (5,8%)		
HSCORE			
media $\pm$ S.D.	1,30 ($\pm$ 1,09)*	1,68 ($\pm$ 0,95)**	2,15 ($\pm$ 0,66)
mediana	1,3	1,75	2,05
máximo	3,6	3,4	3,6

*p < 0,003 frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

**p < 0,01 frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

*p < 0,02 frente a controles fértiles y p < 0,012 frente a controles infértiles sin endometriosis mediante ensayo de Wilcoxon.

**p = 0,5 frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

La gravedad de la endometriosis en base a la clasificación de la AFS parecía estar asociada con la presencia o ausencia de la inmunotinción de β_3 . Los 115 pacientes con infertilidad y endometriosis se clasificaron por la gravedad de la enfermedad. La distribución de casos mediante puntuación de la gravedad de la AFS se enumera en la Tabla 4. El HSCORE de los dos grupos basado en la puntuación de la gravedad de AFS, I y II (mínima y leve; n = 84) frente a III y IV (moderada y grave; n = 21) demostraba una diferencia significativa usando un ensayo de Wilcoxon (p = 0,0151). Por lo tanto, la expresión de β_3 defectuosa se asocia específicamente con las fases de endometriosis I y II.

Se usó una regresión logística múltiple usando EGRET para evaluar la asociación entre la endometriosis y el HSCORE después del ajuste para los efectos de la edad y el estado del número de parto y teniendo en cuenta la interacción potencial del estado del número de parto. Mauritsen, R. EGRET. Statistics and Epidemiology Research Corporation Software. Seattle, WA, 1990.

Mediante análisis logístico múltiple, el riesgo relativo bruto (RR) y el intervalo de confianza del 95% (CI) basado en un modelo con sólo HSCORE como la variable independiente y la presencia o ausencia de endometriosis como la variable dependiente (resultado) era de 0,6 (0,5-0,8) cuando se calculaba para un HSCORE de 0,7 (mediante análisis de ROC). Un riesgo relativo (RR) de 1 significa que no hay efecto, que dos grupos son iguales con respecto a riesgo para endometriosis. Un RR de 0,6 es muy significativo, los intervalos de confianza muestran el intervalo de confianza del ensayo. En su conjunto RR y CI definen un riesgo aumentado de tener endometriosis en mujeres nulíparas con un HSCORE de 0,7 o inferior. La adición de la edad al modelo no cambió el resultado pero había una interacción estadísticamente significativa con el estado de número de parto (p = 0,030). Por consiguiente, el RR ajustado (CI del 95%) era 0,6 (0,4-0,9) para mujeres nulíparas en comparación con 1,2 (0,8-1,8) para mujeres con partos. Estos resultados indican que la ausencia de β_3 (como se indicaba por el HSCORE) en mujeres nulíparas es una predicción

estadísticamente significativa de endometriosis. La restricción de los análisis a mujeres con sólo enfermedad mínima y leve no variaba el resultado sustancialmente. El RR ajustado (CI del 95%) en mujeres nulíparas era de 0,5 (0,4-0,8) en comparación con 1,2 (0,7-1,8) en mujeres con partos.

- 5 Para examinar adicionalmente esta relación entre la historia reproductiva y el HSCORE, los 105 pacientes con endometriosis se clasificaron por el número de parto y se compararon con el grupo de control fértil (Tabla 5). La población de control era de mayor edad que los grupos con endometriosis con partos y nulíparas. El HSCORE en el grupo de nulíparas con endometriosis era menor que el del grupo de mujeres con partos con endometriosis y el grupo de controles fértiles ($p < 0,0001$ para cada grupo), pero no había diferencias entre el grupo con partos con endometriosis y los controles fértiles ($p = 0,98$). La comparación entre estos tres grupos se representa gráficamente en la Figura 9.

TABLA 5

15 *Comparación entre mujeres nulíparas y con partos con endometriosis y controles fértiles normales*

Pacientes con endometriosis			
n = 105			
	Nulíparas n= 78	Con partos n=27	Controles fértiles n=20
25 Características			
Edad (años)			
media $\pm$ D. T.	34,1 $\pm$ 4,1*	34,3 $\pm$ 4,0**	36,9 $\pm$ 4,9
30 Gravedad			
puntuación AFS			
I	30 (38,5%)	10 (37,0%)	
35 II	33 (42,3%)	11 (40,7%)	
III	11 (14,1%)	4 (14,8%)	
40 IV	4 (5,1%)	2 (7,4%)	
HSCORE			
media $\pm$ D.T.	1,30 ($\pm$ 1,04)*	2,10 ($\pm$ 0,79)**	2,15 $\pm$ (0,66)
45 mediana	0,6	2,1	2,05
máximo	3,6	3,6	3,6

* $p < 0,004$ frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

50 ** $p < 0,02$ frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

* $p < 0,001$ frente a pacientes con partos con endometriosis y $p < 0,0001$ frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

55 ** $p = 0,98$ frente a controles fértiles mediante ensayo de Wilcoxon.

- 60 La observación de que hay diferencias en la expresión de integrinas se correlaciona con el diagnóstico de endometriosis dio lugar a la evaluación de la utilidad de este marcador en la predicción de este trastorno en mujeres que se van a someter a la laparoscopia de diagnóstico. Como un subgrupo de las 241 muestras originales, se obtuvieron 89 biopsias posiblemente antes de la laparoscopia de diagnóstico. Se estableció el fechado cronológico mediante la hormona luteinizante urinaria, LH, el pico y/o el comienzo del siguiente periodo menstrual. Se realizó el fechado endometrial usando los criterios Noyes *et al.*, "Dating the Endometrium", *Fertil. Steril.* **1950**, *1*: 3. Todas estas 89 mujeres se sometieron posteriormente a una laparoscopia de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de endometriosis. La gravedad de la enfermedad, cuando estaba presente, se clasificó de acuerdo con los criterios de la American Fertility Society, AFS, revisados expuestos en American Fertility Society: Revised American Fertility Society classification

of endometriosis, anteriormente. Los cirujanos que realizaban las laparoscopias de diagnóstico lo hacían a ciegas con respecto al resultado de los descubrimientos inmunohistoquímicos. Así mismo, la interpretación de los resultados de biopsia (estimación de la expresión de β_3) se realizó de una forma a ciegas usando HSCORE, que estima tanto la intensidad como la distribución de la tinción positiva para β_3 integrina. El valor de HSCORE 0,7, determinado como el corte óptimo, daba una sensibilidad del 38%, una especificidad del 91% y el valor predictivo positivo más alto de 86% para la detección a futuro de endometriosis. En su conjunto, se descubrió presuntamente en la laparoscopia que los 50 pacientes tenían endometriosis en una diversidad de fases de la AFS. La tinción negativa que indicaba que no había expresión de β_3 , basada en los análisis de ROC, se detectó en 22 muestras. De estos 22 pacientes sin tinción de β_3 , se descubrió que 19 tenían endometriosis. El análisis de ROC se realizó para establecer el valor de corte óptimo para muestras normales. Hasta donde sabe el solicitante, la presente invención es el primer ensayo no quirúrgico que se ha demostrado que predice la presencia de una endometriosis mínima o leve.

Todos los pacientes que posteriormente se descubrió que tenían endometriosis no les faltaba la subunidad β_3 . La presente invención identifica un subgrupo de pacientes de infertilidad con un déficit en β_3 que caracteriza mujeres con una receptividad uterina deficiente. Esta asociación entre la endometriosis y la expresión de integrina β_3 defectuosa puede representar la primera deficiencia específica y ciclo durante la supuesta ventana de implantación. La detección de la pérdida de β_3 puede significar pacientes con endometriosis que presentan un riesgo elevado de infertilidad debido a un factor endometrial. Aunque la implantación puede ser el resultado de una cascada de diferentes moléculas, la presente invención revela que la pérdida de un solo componente puede ser suficiente para explicar un fallo en la implantación.

La presente invención revela que la pérdida de β_3 , que normalmente se expresa en el inicio de la ventana de implantación, se asocia con mujeres que parecen ser las más infértiles. El uso a futuro de esta proteína marcadora ha demostrado que la subunidad de integrina β_3 es un ensayo útil con una elevada especificidad y un valor predictivo positivo para el diagnóstico no quirúrgico de la endometriosis mínima o leve. Como un marcador potencial de la receptividad uterina que puede predecir el potencial de fertilidad, el estudio de este subgrupo de pacientes de infertilidad permite un mayor perfeccionamiento del diagnóstico de esta enfermedad enigmática.

Determinación de la endometriosis en la población de pacientes infértiles.

Se obtendrán biopsias de todo el ciclo menstrual de mujeres que se están evaluando para infertilidad. Mujeres con partos y nulíparas se incluirán en el estudio. Las biopsias se explorarán para la participación en un estudio en base a criterios que incluyen un conocimiento preciso del día del ciclo menstrual o histología "en fase" y ausencia de alteraciones del ciclo menstrual (anovulación, suspensión o cese de la ovulación), estado perimenopáusico (sangrado uterino disfuncional), deficiencia de la fase lútea (pruebas histológicas de retraso en la maduración del endometrio), la presencia o uso de un dispositivo intrauterino o endometritis (inflamación del endometrio debida a agentes infecciosos o irritación química). Se excluirán pacientes con hiperplasia endometrial (un aumento en el número de células en el endometrio), neoplasia (un proceso patológico que da como resultado la formación o crecimiento de tejido anormal o tumores benignos o malignos), las que están bajo terapia hormonal (incluyendo anticonceptivos orales, terapia de reemplazo de estrógenos y progestágenos) y las que tienen deficiencia de la fase lútea.

Se obtendrán biopsias endometriales del día 19 (día 6 postovulación o posterior) en base a la hormona luteinizante urinaria, LH, el pico o al próximo periodo menstrual, un momento en el ciclo menstrual cuando se expresa β_3 epitelial, Lessey *et al.*, anteriormente. También se seleccionaran controles fértiles e infértiles.

Se realizará una tinción con inmunoperoxidasa en las muestras de pacientes como se describe en Lessey, *et al.*, anteriormente. En resumen, se realizará una tinción con inmunoperoxidasa en secciones de criostato del endometrio de todo el ciclo menstrual. Se colocarán criosecciones seriadas de 4-8 μm de grosor en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se fijarán en acetona a -20°C durante 10 minutos y se teñirán usando el kit Vectastain Elite[®] ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se usará diaminobenzadina (DAB; Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) como el cromógeno. Se colocará un anticuerpo primario que consiste en SSA6 (específico para la subunidad β_3 del receptor de vitronectina) en criosecciones después del bloqueo con albúmina de suero bovino al 1% en solución salina tamponada con fosfato, PBS y se dejará que se unan a temperatura ambiente durante 1 hora. Un aclarado con PBS, de pH 7,2 a 7,4, se seguirá de anticuerpo secundario que consiste en anticuerpo antirratón de cabra biotinilado durante 30 minutos. Después del aclarado con PBS, las peroxidases endógenas se inactivarán con una incubación de 30 minutos con H_2O_2 al 0,3% en etanol absoluto seguida de una rehidratación de 30 minutos en PBS. Después, se incubará un complejo macromolecular de avidina:peroxidasa rábano rusticano biotinilada (ABC) en las secciones durante 30 minutos antes de añadir diaminobenzadina durante 3 minutos para terminar la reacción. Las muestras se lavarán posteriormente en PBS y se montarán.

El HSCORE y el análisis estadístico usando el ensayo de Wilcoxon, el análisis de ROC y los valores p, para hembras infértiles se espera que sea similar al de hembras infértiles nulíparas explicado anteriormente. El valor de corte del HSCORE, y los valores de sensibilidad y especificidad se determinarán para la detección de endometriosis en pacientes infértiles. Los pacientes también se separarán según la gravedad de la endometriosis en base a la clasificación de la AFS. Se usará EGRET para evaluar la asociación entre la endometriosis y el HSCORE después de ajustar para los efectos de la edad y del estado de número de parto, véase anteriormente. El riesgo relativo bruto y los intervalos de confianza se calcularán para la endometriosis. En su conjunto, se espera que la expresión de integrina detectada por la ausencia de β_3 se correlacionará con el diagnóstico de endometriosis en hembras infértiles.

ES 2 312 703 T3

Diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria serán evidentes para los especialistas en la técnica de la descripción anterior. Dichas modificaciones también se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la endometriosis que comprende:

- a. identificar como nulípara una muestra de endometrio seleccionada del día 20 al 24 o del día 19 al 23 del ciclo menstrual;
- b. ensayar la muestra para detectar la integrina β_3 en la muestra.
- c. correlacionar la ausencia de expresión de integrina β_3 con endometriosis.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de la integrina β_3 se controla mediante una inmunohistoquímica o un método de inmunohistoquímica.

3. Un método de la reivindicación 2, en el que el método de inmunohistoquímica se selecciona de entre inmunotransferencia, transferencia de Western, tinción con inmunoperoxidasa, marcaje con fluoresceína, diaminobenzadina y biotilación.

4. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de endometrio es del día 20 del ciclo menstrual.

5. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el endometrio es humano.

6. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la β_3 se combina con otra subunidad de integrina.

7. Un método de la reivindicación 6, en el que la otra subunidad de integrina es integrina α_v .

8. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la endometriosis es una endometriosis leve/mínima.

FIG. 1A

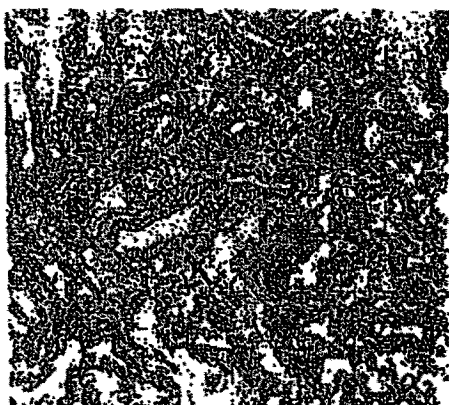


FIG. 1B

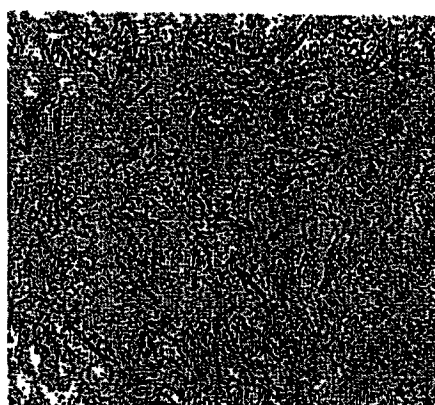


FIG. 1C



FIG. 1D



FIG. 1E



FIG. 1F

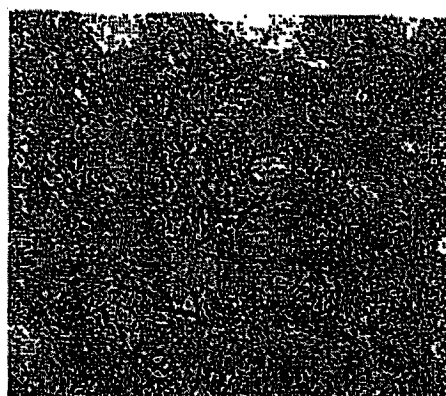


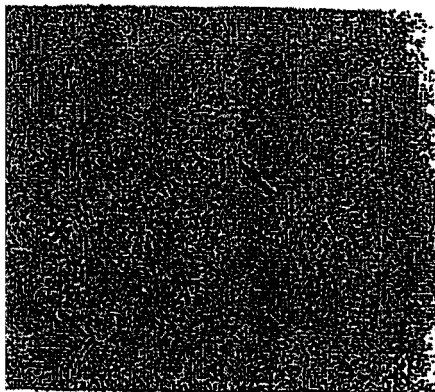
FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C



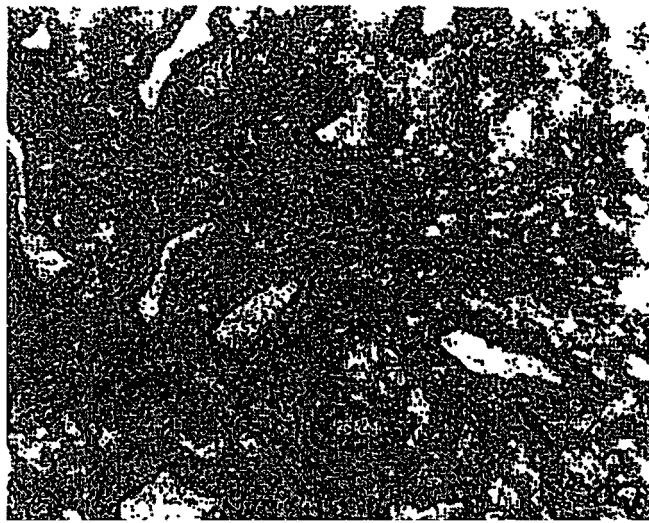


FIG. 3A

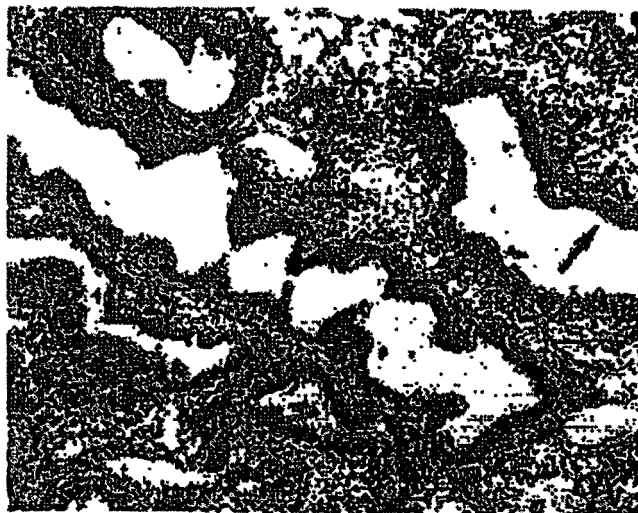


FIG. 3B

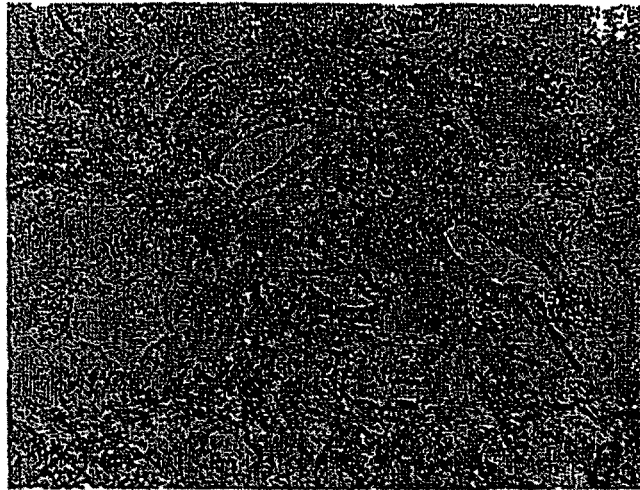


FIG. 3C



FIG. 3D

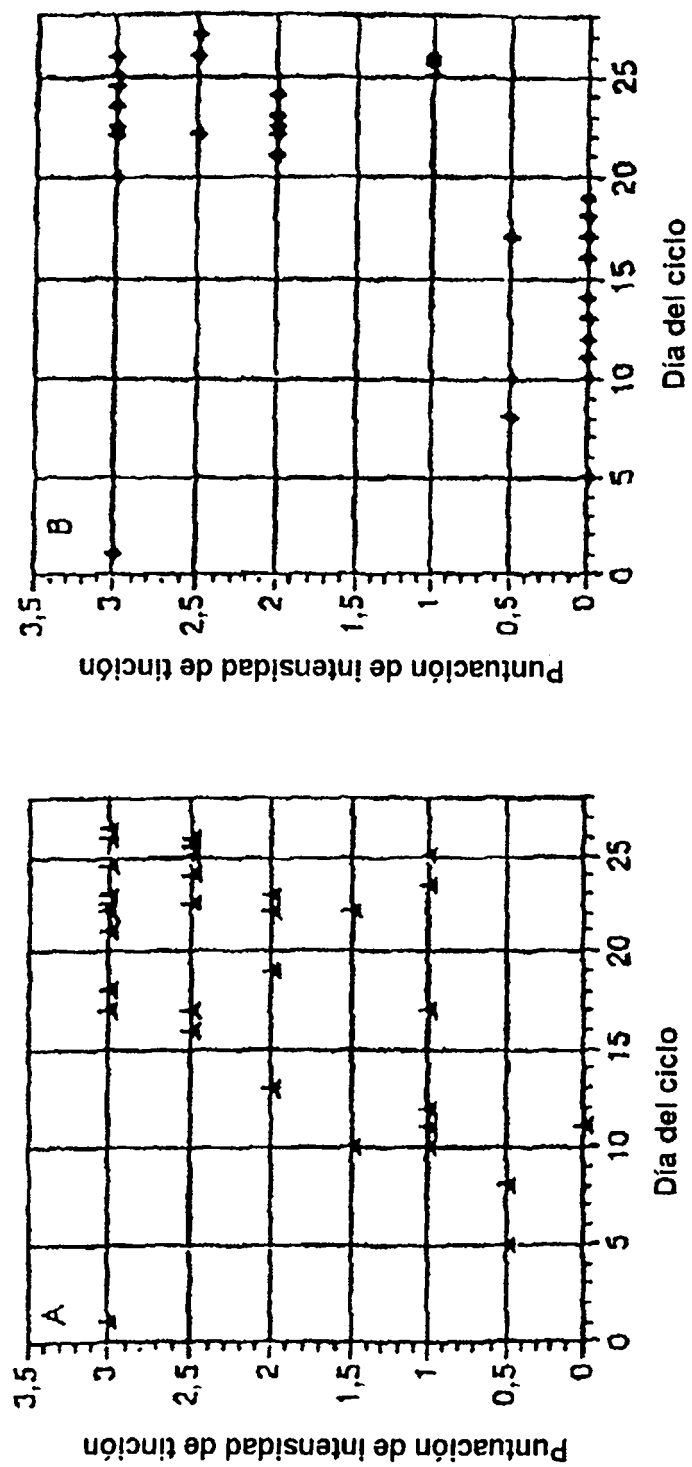


FIGURA 4

FIG. 5A

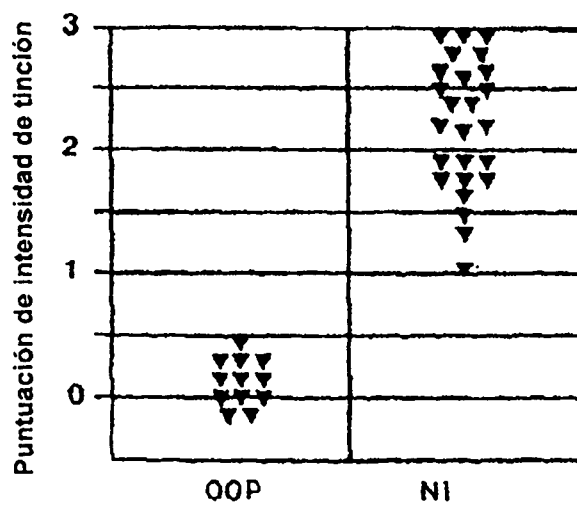


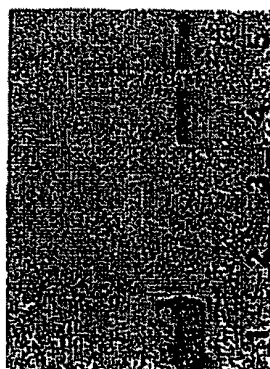
FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 6A



— 205

— 92

— 69

FIG. 6C



FIG. 6B



FIG. 6D



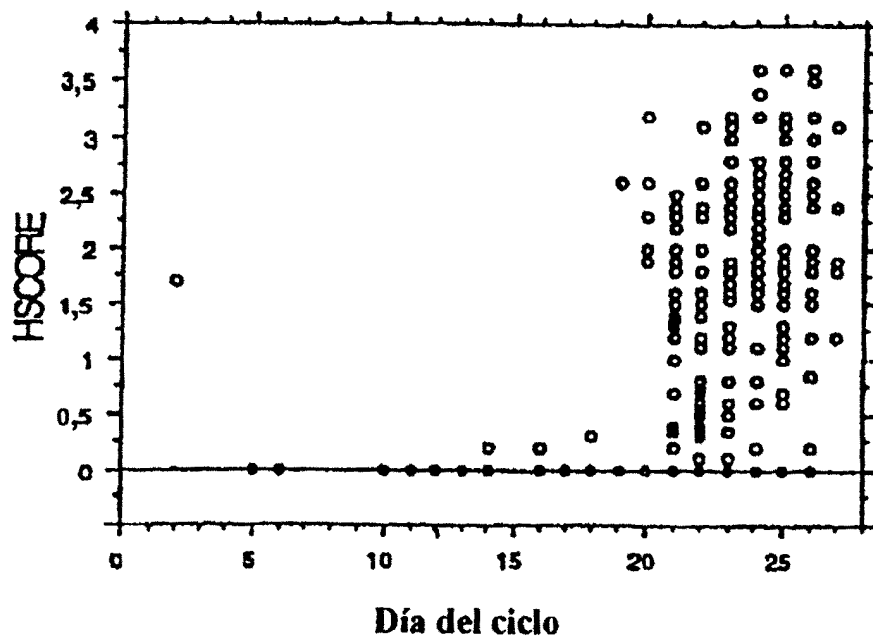


FIGURA 7

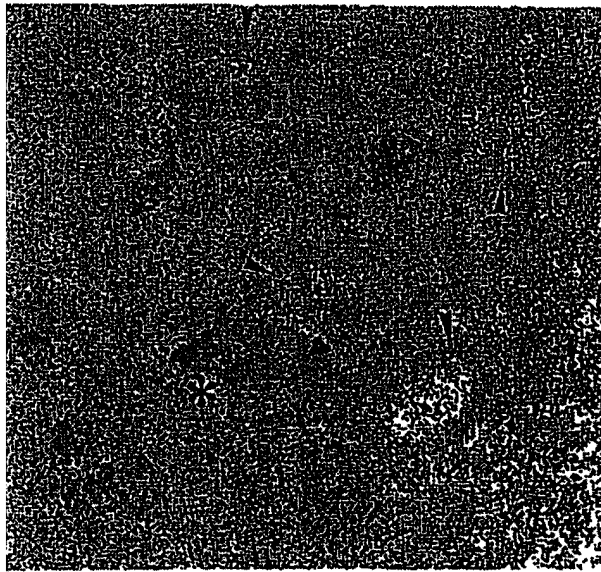


FIG. 8A

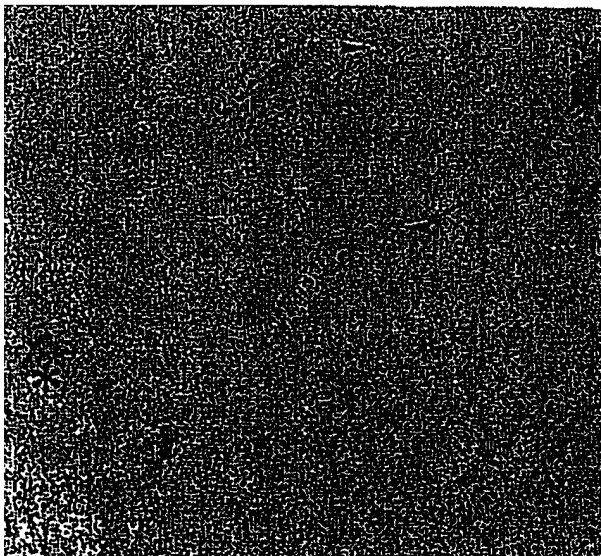


FIG. 8B

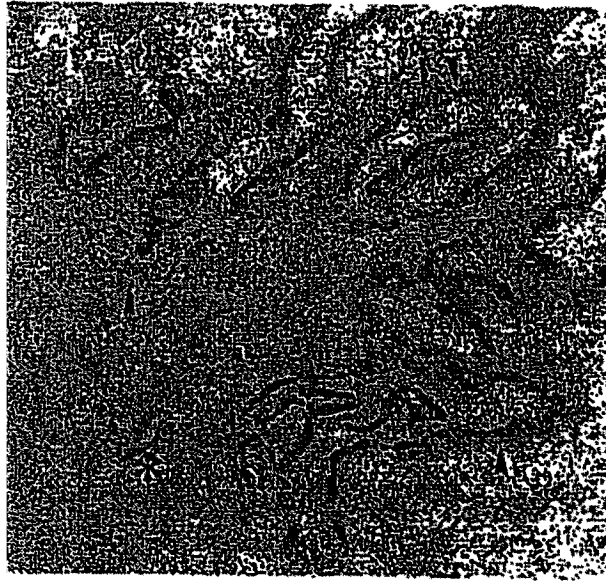


FIG. 8C

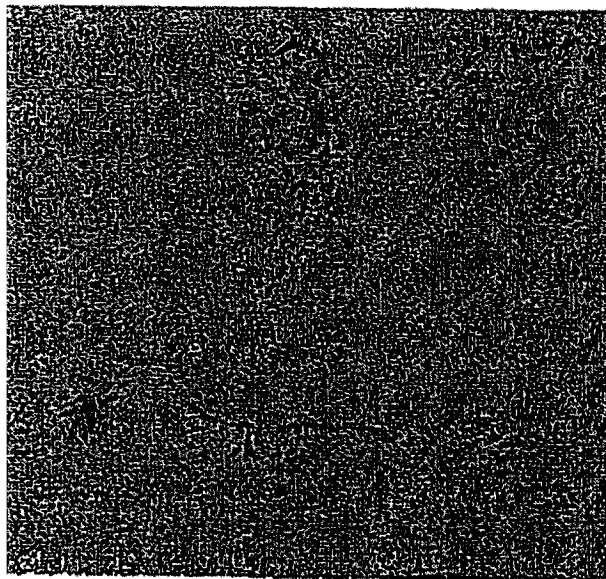


FIG. 8D

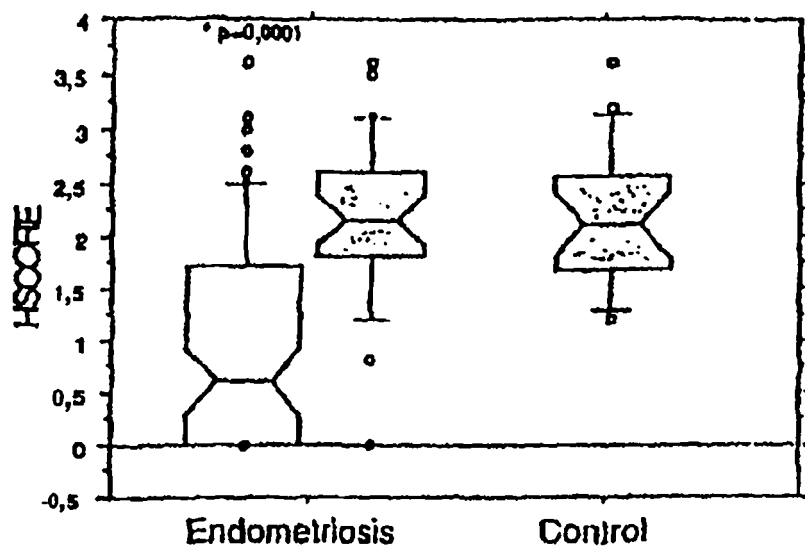


FIGURA 9

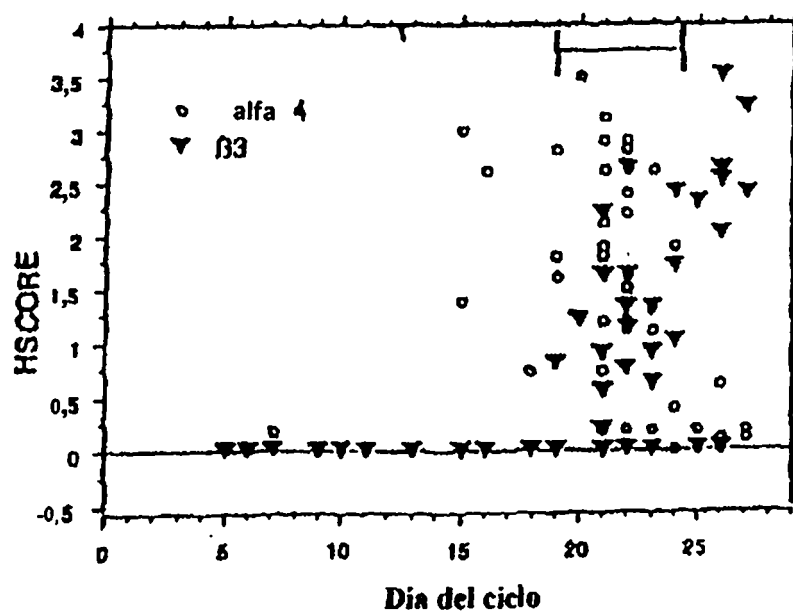


FIGURA 10