

DESCRIPCIÓN

Método mejorado para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis, kit y usos del mismo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de la endometriosis. Específicamente, se refiere a un método no invasivo mejorado para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis en un sujeto, preferentemente un sujeto de sexo femenino, que comprende la determinación de los niveles de proteína de un grupo de biomarcadores que comprenden o consisten en el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y/o el antígeno de cáncer 125 (CA125) en una muestra biológica, opcionalmente en combinación con variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto. Se refiere, además, a un kit para determinar los niveles de proteína de BDNF y/o CA125 y al uso del kit en los métodos de la invención.

15 Antecedentes de la invención

La endometriosis es una enfermedad dolorosa e inflamatoria caracterizada por la presencia de tejido similar al endometrio fuera del útero (Johnson, 2013; Zondervan, 2018 y 2020). Estas lesiones provocan una reacción inflamatoria crónica, que puede conducir a la generación de tejido cicatricial y adherencias. Se estima que la enfermedad afecta al 10 % de las mujeres en edad reproductiva, lo que se extrapola a aproximadamente 190 millones de mujeres en todo el mundo (Vigano, 2004). Los síntomas clínicos incluyen dolor pélvico crónico, dismenorrea e infertilidad (Vigano, 2004). La endometriosis también puede aumentar el riesgo de cáncer o trastornos autoinmunitarios en la mujer (Somigliana, 2006; Sinaii, 2002). Las lesiones endometrióticas pueden aparecer en distintas localizaciones, incluyendo el peritoneo pélvico y el ovario, o infiltrarse en estructuras pélvicas situadas por debajo de la superficie peritoneal (endometriosis profunda).

El diagnóstico de la endometriosis es difícil, por lo que a menudo transcurren muchos años entre la primera aparición de los síntomas y la confirmación final del diagnóstico. El tiempo de diagnóstico oscila entre 4 y 11 años (Agarwal, 2019). El examen clínico de las mujeres sintomáticas no predice de forma fiable la presencia de endometriosis y la norma de referencia actual para diagnosticar la enfermedad es la inspección visual con confirmación histológica de las lesiones mediante laparoscopia. Sin embargo, debido a su carácter invasivo, en la actualidad solo se recomienda en pacientes con resultados de imagen negativos y/o cuando el tratamiento empírico no ha tenido éxito o ha sido inadecuado (The ESHRE guideline: endometriosis, 2022).

De hecho, debido a la invasividad necesaria para el diagnóstico, muchas mujeres con endometriosis reciben una atención subóptima o inadecuada. Por lo general, las mujeres en las que existe una alta sospecha de endometriosis reciben analgésicos y medicación hormonal sin un diagnóstico definitivo previo (Dunselman, 2014). Es práctica habitual que estas pacientes reciban una laparoscopia solo si no se observan mejorías con los anticonceptivos hormonales para excluir o diagnosticar la endometriosis. Sin embargo, la respuesta al tratamiento hormonal no siempre indica la presencia o ausencia de endometriosis (Ling, 1999; Jenkins, 2008). Por lo tanto, las mujeres con otras afecciones dependientes de estrógenos potencialmente graves pueden ser clasificadas erróneamente como si tuvieran endometriosis, y no recibir los tratamientos necesarios y eficaces. Así pues, el tratamiento presuntivo de mujeres sintomáticas puede conducir a un diagnóstico erróneo en mujeres sin endometriosis y contribuir a un retraso en el diagnóstico en mujeres con la enfermedad.

El desarrollo de una nueva herramienta de diagnóstico no invasiva basada en un panel de biomarcadores asociados con la endometriosis es un enfoque prometedor para un diagnóstico más rápido, un tratamiento adecuado y la clasificación de posibles pacientes quirúrgicas (Ahn SH, *et al.*, 2017).

Se han estudiado múltiples biomarcadores (Nisenblat, 2016a, 2016b) como pruebas de detección y clasificación para la endometriosis. Sin embargo, ninguno de ellos se ha implementado de forma rutinaria en la práctica clínica (The ESHRE guideline: endometriosis, 2022).

El documento WO 2015051451 (MCMASTER UNIVERSITY, CA) divulga un método para diagnosticar o monitorizar la endometriosis que comprende la determinación de los niveles de expresión de BDNF y su receptor Ntrk2 en sangre periférica y el diagnóstico de endometriosis en el mamífero cuando el nivel de BDNF y el nivel de Ntrk2 están elevados ambos en al menos un 10 % en comparación con los niveles de control.

El documento US 20180067102 proporciona métodos para diagnosticar o monitorizar la endometriosis en un mamífero. Divulga un método para diagnosticar endometriosis que comprende determinar los niveles de expresión de BDNF y glicodelina y opcionalmente zinc-alfa-2-glicoproteína (ZAG), en una muestra biológica del mamífero, y determinar que el mamífero tiene endometriosis cuando los niveles de expresión del biomarcador en la muestra están elevados. Se divulga la prueba de un panel de biomarcadores: BDNF y glicodelina resultaron ser superiores tanto a los marcadores emergentes (SERPINE2 y ZAG) como a los clásicos (CA-125, ZAG, VEGF, IL-6, IL-1 β , RANTES, sICAM-1 y leptina) como marcadores únicos no invasivos para el diagnóstico de endometriosis en la población de estudio. Además, divulga que la combinación de BDNF, glicodelina y ZAG en un panel produjo una

sensibilidad y especificidad que fueron superiores a las de cualquiera de los marcadores por separado.

A pesar de los amplios esfuerzos de investigación, aún no se ha encontrado una prueba no invasiva fiable para el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis.

Sumario de la invención

Los presentes inventores llevaron a cabo una nueva evaluación de un panel de biomarcadores que incluía ZAG, glicodelina, BDNF y CA125 en suero y plasma para el diagnóstico de la endometriosis en una población femenina europea, más concretamente del Reino Unido e Italia.

Como se muestra en el Ejemplo 1, Tabla 3, se encontró una alta correlación (0,999) de los niveles de concentración de CA125 entre plasma y suero, lo que indica que la medición de los niveles de CA125 no se vio afectada por el tipo de muestra. Sin embargo, tal correlación entre los niveles de concentración en los dos tipos de muestras biológicas no se observó para el BDNF, que presentó un coeficiente de correlación muy bajo (0,105). En consecuencia, se observó que el rendimiento de diagnóstico del BDNF era significativamente mayor cuando se medía en suero que en plasma.

De hecho, se observó que el CA125 (en plasma o suero) y el BDNF en suero tenían una asociación estadísticamente significativa con la endometriosis (Ejemplo 1, Tabla 4) y eran biomarcadores predictivos útiles (Ejemplo 1, Tabla 5) en la población de estudio.

Además, a pesar de que en los documentos WO 2015051451 y US 20180067102 se había encontrado una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de concentración en plasma de glicodelina y ZAG y la presencia de endometriosis, tales resultados no pudieron reproducirse en el presente estudio, en donde se observó que la ZAG y la glicodelina tenían un peor poder predictivo. Así, inesperadamente, la combinación de CA125 y BDNF en suero, resultó ser los biomarcadores más relevantes para el diagnóstico de endometriosis.

Además, los inventores identificaron, además, una serie de parámetros relacionados con los antecedentes y/o las características clínicas de los sujetos que resultaron estar también asociados con la endometriosis (Ejemplo 3), lo que permitió aumentar el poder de diagnóstico predictivo de los biomarcadores en suero CA125 y BDNF (Ejemplo 4).

En consecuencia, el primer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o la presencia de lesiones de tipo endometriósico, o para predecir la presencia de lesiones de tipo endometriósico en un sujeto, preferentemente un sujeto de sexo femenino, en donde dicho método comprende:

a) determinar los niveles de proteína de un biomarcador o un grupo de biomarcadores en una muestra de sangre, plasma o suero aislada del sujeto, en donde dichos biomarcadores comprenden o consisten en:

- i. antígeno de cáncer 125 (CA125), y/o
- ii. factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); y

b) opcionalmente, calcular una puntuación a partir de los niveles de proteína determinados en la etapa a), opcionalmente en combinación con otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto;

c) comparar los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en la muestra del sujeto determinados en la etapa a) con un valor de referencia correspondiente; o comparar la puntuación obtenida en b) con un valor de referencia; en donde cuando los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en a), o la puntuación en b), están aumentados con respecto al valor de referencia respectivo es indicativo de endometriosis o presencia de lesiones de tipo endometriósico.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método implementado por ordenador, en donde el método es cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento o cualquier combinación de estos.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un programa informático capaz de implementar cualquiera de los métodos de la presente invención o usado para implementar cualquiera de estos métodos o cualquier combinación de estos.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a cualquier dispositivo o aparato que comprenda medios para llevar a cabo las etapas de cualquiera de los métodos de la presente invención o cualquier combinación de estos, o que lleve un programa informático capaz de, o para implementar cualquiera de los métodos de la presente invención o cualquier combinación de estos.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento adecuado o mediante la realización de una resección quirúrgica, en donde dicho sujeto es un sujeto que ha sido clasificado como que tiene o se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis mediante un método como el descrito con anterioridad en el presente documento.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método para llevar a cabo una prueba de confirmación, como una laparoscopia, en un sujeto que se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis, en donde dicho sujeto ha sido seleccionado por tener endometriosis o lesiones similares a la endometriosis mediante un método como el descrito con anterioridad.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un kit para determinar los niveles de uno o más de los biomarcadores descritos en el presente documento en una muestra biológica descrita en el presente documento (preferentemente una muestra de suero) aislada de un sujeto.

En un octavo aspecto, la invención se refiere al uso de un kit como el descrito con anterioridad en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, como un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o lesiones similares a la endometriosis en un sujeto; un método para predecir el grado de endometriosis o para clasificar a un sujeto de acuerdo con el grado o fenotipo de endometriosis como se describe en el presente documento; un método para la selección y tratamiento de sujetos o un método para la selección de sujetos y la realización de una prueba exploratoria (como una laparoscopia) como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: Niveles de proteína CA125 en plasma para casos y controles.

FIG. 2: Niveles de proteína CA125 en suero para casos y controles.

FIG. 3: Niveles de proteína glicodelina en plasma para casos y controles.

FIG. 4: Niveles de proteína glicodelina en suero para casos y controles.

FIG. 5: Niveles de BDNF total en plasma para casos y controles.

FIG. 6: Niveles de BDNF total en suero para casos y controles.

FIG. 7: Niveles de proteína ZAG en plasma para casos y controles.

FIG. 8: Niveles de proteína ZAG en suero para casos y controles.

FIG. 9: Grado de asociación de CA125 en suero (UI/mL) frente a CA125 en plasma (UI/mL).

FIG. 10: Grado de asociación de glicodelina en suero (ng/mL) frente a glicodelina en plasma (ng/mL).

FIG. 11: Grado de asociación de BDNF total en suero (pg/mL) frente a BDNF total en plasma (pg/mL).

FIG. 12: Grado de asociación de ZAG en suero (ng/mL) frente a ZAG en plasma (ng/mL).

FIG. 13: Curvas ROC de CA125 y BDNF.

FIG. 14: Números de acceso de las secuencias de ARNm y proteínas de los transcritos de BDNF en la base de datos del NCBI.

FIG. 15: Números de acceso de las secuencias de ARNm y proteínas de los transcritos del CA125 en la base de datos del NCBI.

FIG. 16: Secuencia de la proteína humana CA125 (SEQ ID NO: 5).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos “sujeto” o “individuo” se usan en el presente documento indistintamente para referirse a todos los animales clasificados como mamíferos e incluyen, pero sin limitación, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos

o roedores. Preferentemente, el sujeto es un ser humano hembra de cualquier edad o raza. En algunas realizaciones, se trata de una mujer en edad reproductiva, en donde la expresión mujer en edad reproductiva se refiere a una mujer premenopáusica, preferentemente entre 15 y 49 años.

Tal como se usa en el presente documento, el término “endometriosis” hace referencia a una enfermedad inflamatoria crónica dependiente de estrógenos que se caracteriza por la formación de lesiones endometriósicas fuera del útero, incluidos los ovarios y otras estructuras pélvicas. Los síntomas están influidos por las hormonas ováricas y las lesiones provocan una intensa inflamación en la cavidad pélvica. Se vascularizan y se infiltran fibras nerviosas sensoriales. Las células endometriales ectópicas y el entorno inflamatorio local activan las fibras nerviosas de las lesiones, estableciendo comunicación con el sistema nervioso central y provocando dolor. Las lesiones, al igual que el endometrio ectópico, presentan hemorragias cíclicas en la cavidad pélvica en respuesta a las hormonas ováricas, lo que favorece la inflamación. Los principales síntomas son el dolor y la infertilidad. Las recomendaciones más recientes sobre el diagnóstico, la gestión y el tratamiento de la endometriosis figuran en la directriz de la ESHRE: endometriosis, 2022.

Todos los fenotipos de endometriosis están incluidos en el presente documento. En algunas formas de realización, los fenotipos de endometriosis se definen según la localización de las lesiones de tipo endometriósico, incluyendo lesiones peritoneales superficiales (SUP), endometriomas ováricos (OMA) y endometriosis infiltrante profunda (EIP) (véase Chapron *et al.* Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis, Nat Rev Endocrinol. Nov. de 2019; 15(11):666–682). En algunas formas de realización, los fenotipos de endometriosis se definen según cualquiera de las clasificaciones conocidas, como las descritas en el presente documento a continuación.

Las clasificaciones actuales de la enfermedad (rAFS/rASRM) se basan en el tamaño de la lesión, su localización, el grado de infiltración de la lesión en el tejido y/o la presencia de adherencias. Los estadios van del I (“mínimo”) al IV (“grave”) (véase Lee SY, Koo YJ, Lee DH. Classification of endometriosis. Yeungnam Univ J Med. Ene. de 2021;38(1):10–18 i).

Las localizaciones pélvicas habituales de la endometriosis incluyen el ovario y la fosa ovárica, los ligamentos uterosacros, el fondo de saco de Douglas y la vejiga. La endometriosis se estadifica en el momento de la cirugía; se han propuesto muchas clasificaciones.

1/ Se suele usar el sistema de puntuación revisado de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM). Estadios – Componentes del sistema de puntuación de ASRM (Clasificación revisada de la endometriosis de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva: 1996. Fertil Steril. Mayo de 1997;67(5):817–21; Lee *et al.* 2021), incluyen:

- Estadio I – La enfermedad mínima se caracteriza por implantes aislados y sin adherencias significativas.
- Estadio II – La endometriosis leve consiste en implantes superficiales que miden menos de 5 cm en conjunto y están diseminados por el peritoneo y los ovarios. No hay adherencias significativas.
- Estadio III – La enfermedad moderada muestra múltiples implantes, tanto superficiales como profundamente invasivos. Pueden ser evidentes adherencias peritubáricas y periováricas.
- Estadio IV – La enfermedad grave se caracteriza por múltiples implantes superficiales y profundos, incluidos grandes endometriomas ováricos. Suelen presentarse adherencias filiformes y densas.

2/ La clasificación de ENZIAN (Keckstein J, *et al.* 2021)

La clasificación de ENZIAN se creó como complemento de la puntuación de rASRM para proporcionar una clasificación morfológicamente descriptiva de la endometriosis infiltrante profunda (EIP) que tiene en cuenta las estructuras retroperitoneales. En esta clasificación, las estructuras retroperitoneales se dividen en tres compartimentos:

- Compartimento A: vagina, tabique rectovaginal;
- Compartimento B: ligamentos uterosacros a la pared pélvica (BB: afectación bilateral);
- Compartimento C: recto y colon sigmoide.

La gravedad de la enfermedad se clasifica como:

- Grado 1: invasión de 3 cm La invasión profunda de la endometriosis más allá de la pelvis menor y la invasión de órganos se registran por separado:
- FA: adenomiosis;

- FB: invasión vesical;
- FU: endometriosis ureteral intrínseca;
- FI: enfermedad intestinal craneal al colon sigmoide;
- F0: otras localizaciones.

El prefijo “F” significa “lejano” o “extraño”, en referencia a estructuras retroperitoneales distantes. La nomenclatura de la clasificación de ENZIAN, que es similar al sistema de estadificación TNM (tumor, ganglios linfáticos, metástasis) usado en las enfermedades oncológicas, es la siguiente: A0–3 B0–3 C0–3 FA, FB, FU, FI, F0. Las localizaciones distantes solo se indican cuando están presentes. Cuando hay más de un foco presente en cada compartimento, solo se evalúa el mayor (Capezzuoli *et al.*, 2020).

El término “lesiones de tipo endometriósico” o “lesiones similares a la endometriosis” se usa en el presente documento indistintamente. Lesiones de tipo endometriósico se refiere al crecimiento de tejido similar al endometrio fuera del útero. Los fenotipos de endometriosis pueden definirse según la localización de las lesiones de tipo endometriósico, incluyendo lesiones peritoneales superficiales (SUP), endometriomas ováricos (OMA) y endometriosis infiltrante profunda (EIP). En casos poco habituales, también se han encontrado lesiones de tipo endometriósico fuera de la pelvis.

El término “detección” se entiende en el presente documento como el examen o la prueba de un grupo de individuos asintomáticos pertenecientes a la población general o que tienen uno o más factores de riesgo con el objetivo de discriminar a los individuos sanos de los que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad. Un método de detección se usa generalmente para la “detección precoz” de una enfermedad. La expresión “detección precoz” se refiere a la detección antes de la presencia de signos clínicos.

El término “diagnóstico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto al proceso de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir, el procedimiento de diagnóstico, como a la opinión a la que se llega mediante este proceso, es decir, la opinión de diagnóstico. En particular, el diagnóstico para determinar una enfermedad en un sujeto, se refiere a la capacidad de identificar y clasificar a los pacientes que padecen dicha enfermedad. Una “prueba de diagnóstico” puede usarse para sugerir o descartar la enfermedad.

El término “monitorización”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a determinar la evolución de la enfermedad y/o la eficacia de una terapia, por ejemplo, determinar si hay una remisión de la enfermedad; o por el contrario si hay una progresión de la enfermedad o una recaída.

El término “curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC)”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un gráfico que ilustra el rendimiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. La curva se crea trazando la tasa de verdaderos positivos frente a la tasa de falsos positivos con distintos ajustes de umbral. La tasa de verdaderos positivos también se conoce como sensibilidad. La tasa de falsos positivos se calcula como $1 - \text{especificidad}$. La curva ROC es, por lo tanto, una forma de representar gráficamente la tasa de verdaderos positivos frente a la tasa de falsos positivos (sensibilidad frente a $(1 - \text{especificidad})$) en un intervalo de valores de corte y de seleccionar el valor de corte óptimo para uso clínico. La precisión expresada como el área bajo la curva ROC (AUC) proporciona un parámetro útil para comparar el rendimiento de la prueba. Un AUC cercano a 1 indica que la prueba es muy sensible y muy específica, mientras que un AUC cercano a 0,5 indica que la prueba no es ni sensible ni específica. En general, se considera que una prueba es un discriminador adecuado si el AUC se sitúa entre 0,6 y 0,75, que tiene una alta capacidad de discriminación si el AUC se sitúa entre 0,75 y 0,9 y que es un discriminador excelente si el AUC se sitúa entre 0,9 y 1. Para más detalles, véase, por ejemplo, (Zweig y Campbell 1993; Greiner, Pfeiffer y Smith 2000).

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado, como uno o más de los siguientes resultados terapéuticos, como un retraso significativo de la aparición o progresión de la enfermedad; o una reducción significativa de la gravedad de uno o más síntomas. Una cantidad terapéuticamente eficaz también suele ser aquella en donde cualquier efecto tóxico o perjudicial del principio activo o de la composición farmacéutica se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

En el presente documento, “tratamiento”, “que trata” o “tratar” se refieren a: (i) prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a padecer la enfermedad, trastorno y/o afección pero al que aún no se le ha diagnosticado que lo tiene; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detener o ralentizar su desarrollo o progresión; y/o (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección. En determinadas formas de realización, tal término se refiere a la mejora o erradicación de una enfermedad o de síntomas asociados a una enfermedad.

El término “reactivo de afinidad” puede referirse a un ligando (por ejemplo, anticuerpo, péptido, proteína, ácido nucleico o molécula pequeña) que captura selectivamente (se une a) una molécula diana mediante reconocimiento molecular específico, normalmente con una afinidad de unión en el rango nanomolar a subnanomolar. Por ejemplo, el reactivo de afinidad puede ser un aptámero, un anticuerpo o un mimético de anticuerpo.

El término “afinidad”, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una molécula de unión a antígeno (KD), y se considera una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno: cuanto menor sea el valor de la KD, mayor será la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de asociación (KA), que es 1/KD). Será evidente para el experto que la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente.

El término “aptámero” o “aptámero de ácido nucleico” tal como se usa en el presente documento puede referirse a un ácido nucleico monocatenario (ARN o ADN) aislado o purificado que se une con gran especificidad y afinidad a una diana mediante interacciones distintas del emparejamiento de bases de Watson–Crick. Un aptámero tiene una estructura tridimensional que proporciona contactos químicos para unirse específicamente a una diana. A diferencia de la unión tradicional de ácidos nucleicos, la unión de aptámeros no depende de una secuencia lineal de bases conservada, sino de una estructura secundaria o terciaria particular. Es decir, las secuencias de ácido nucleico de los aptámeros son secuencias no codificantes. Cualquier potencial de codificación que pueda presentar un aptámero es totalmente fortuito y no desempeña papel alguno en la unión de un aptámero a una diana. Un aptámero minimizado típico tiene un tamaño de 5–15 kDa (15–45 nucleótidos), se une a una diana con afinidad nanomolar o subnanomolar y discrimina entre dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros no se unen a otras proteínas del mismo gen o familia funcional).

El término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a una inmunoglobulina o a un fragmento de unión a antígeno de la misma. A menos que se especifique lo contrario, el término incluye, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, multiespecíficos, humanizados, humanos, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y generados *in vitro*. El anticuerpo puede incluir una región constante, o una porción de esta, como los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Por ejemplo, pueden usarse regiones constantes de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD e IgE. A modo de ejemplo, la región constante de la cadena ligera puede ser kappa o lambda. En determinadas formas de realización, el término “anticuerpo” también puede referirse a derivados de anticuerpos, como proteínas de fusión basadas en anticuerpos o anticuerpos modificados adicionalmente para contener moléculas no proteicas adicionales, como polímeros solubles en agua, por ejemplo polietilenglicol (PEG).

Los términos “dominio de unión a antígeno” y “fragmento de unión a antígeno” se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. En el caso de determinados antígenos, el dominio de unión a antígeno o el fragmento de unión a antígeno pueden unirse solo a una parte del antígeno. La parte del antígeno que es específicamente reconocida y a la que se une el anticuerpo se denomina “epítipo” o “determinante antigénico”. Los dominios de unión a antígeno y los fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab; un fragmento F(ab')₂ (un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra); un fragmento Fv; un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv); un fragmento Fd (que tiene los dos dominios V_H y C_{H1}); anticuerpos de dominio único (sdAbs; consistentes en un único dominio V_H), y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión a antígeno. El fragmento Fab tiene los dominios V_H-C_{H1} y V_L-C_L unidos covalentemente por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. El fragmento Fv es más pequeño y tiene dominios V_H y V_L unidos de forma no covalente. El scFv contiene un polipéptido flexible que une (1) el extremo C-terminal de V_H al extremo N-terminal de V_L, o (2) el extremo C-terminal de V_L al extremo N-terminal de V_H. Los sdAbs incluyen anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras y anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos convencionales de cuatro cadenas. Estos dominios y fragmentos de unión a antígeno se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y su función se evalúa del mismo modo que la de las inmunoglobulinas intactas.

El término “anticuerpo recombinante”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo producido o expresado usando un vector de expresión recombinante, en donde el vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo recombinante, de manera que la introducción del vector de expresión en una célula huésped apropiada da lugar a la producción o expresión del anticuerpo recombinante. Los anticuerpos recombinantes pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados, anticuerpos mono o multiespecíficos.

El término “mimético de anticuerpo” (AbM), tal como se usa en el presente documento, se refiere a los andamiajes de dominio único, que han sido diseñados para unirse a dianas terapéuticas con afinidad y especificidad que coinciden con las de los anticuerpos naturales. Se han desarrollado miméticos de anticuerpos que usan un plegamiento similar al de la inmunoglobulina, por ejemplo, fibronectina tipo III, NCAM y CTLA-4. También se han obtenido otros andamiajes de miméticos que no guardan similitud con los plegamientos de inmunoglobulina.

Ejemplos no limitantes de dichos andamiajes son DARPinas, anticalinas, afibodies, adnectinas, finómeros, etc. (véase, por ejemplo, Weidle *et al.* Cancer Genomics & Proteomics. 2013, 10:1–18; Lofblom, J. *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 2011, 22: 843–848; Banta, S. *et al.*, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2010, 15: 93–113).

5 Descripción detallada

Método de detección, diagnóstico o monitorización de la endometriosis

10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o la presencia de lesiones tipo endometriósico, o para predecir la presencia de lesiones tipo endometriósico en un sujeto, preferentemente un sujeto de sexo femenino, en donde dicho método comprende:

15 a) determinar los niveles de proteína de un biomarcador o un grupo de biomarcadores en una muestra de sangre, plasma o suero aislada del sujeto, en donde dichos biomarcadores comprenden o consisten en:

iii. antígeno de cáncer 125 (CA125), y/o

20 iv. factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); y

b) opcionalmente, calcular una puntuación a partir de los niveles de proteína determinados en la etapa a), opcionalmente en combinación con otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto;

25 c) comparar los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en la muestra del sujeto determinados en la etapa a) con un valor de referencia correspondiente; o comparar la puntuación obtenida en b) con un valor de referencia; en donde, cuando los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en a), o la puntuación en b), están aumentados con respecto al valor de referencia respectivo es indicativo de endometriosis o presencia de lesiones de tipo endometriósico.

30 En algunas formas de realización, la presente invención se refiere a un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o la presencia de lesiones de tipo endometriósico, o para predecir la presencia de lesiones de tipo endometriósico en un sujeto, preferentemente un sujeto de sexo femenino, en donde dicho método comprende:

35 a) determinar los niveles de proteína de un biomarcador o de un grupo de biomarcadores que comprende o consiste en:

i. antígeno de cáncer 125 (CA125) en una muestra de sangre, plasma o suero aislada del sujeto, y/o

40 ii. factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en una muestra de suero aislada del sujeto; y

b) opcionalmente, calcular una puntuación a partir de los niveles de proteína determinados en la etapa a), opcionalmente en combinación con otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto;

45 c) comparar los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en la muestra del sujeto determinados en la etapa a) con un valor de referencia correspondiente; o comparar la puntuación obtenida en b) con un valor de referencia; en donde cuando los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en a), o la puntuación en b), están aumentados con respecto al valor de referencia respectivo es indicativo de endometriosis o presencia de lesiones de tipo endometriósico.

50 En algunas formas de realización, el método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o la presencia de lesiones de tipo endometriósico, o para predecir la presencia de lesiones de tipo endometriósico en un sujeto, del primer aspecto comprende:

55 a) determinar los niveles de proteína de un grupo de biomarcadores que comprende o consiste en:

i. antígeno de cáncer 125 (CA125) en una muestra de sangre, plasma o suero aislada del sujeto, y

60 ii. factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en una muestra de suero aislada del sujeto; y

b) comparar los niveles de proteína de CA125 y BDNF en la muestra del sujeto determinados en la etapa a) con un valor de referencia correspondiente; en donde cuando los niveles de proteína de CA125 y BDNF en a) están aumentados con respecto al valor de referencia respectivo es indicativo de endometriosis o la presencia de lesiones de tipo endometriósico.

65 En otras formas de realización, el método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o

la presencia de lesiones de tipo endometriósico, o para predecir la presencia de lesiones de tipo endometriósico en un sujeto, del primer aspecto comprende:

a) determinar los niveles de proteína de un grupo de biomarcadores que comprende o consiste en:

- iii. antígeno de cáncer 125 (CA125) en una muestra de sangre, plasma o suero aislada del sujeto, y
- iv. factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en una muestra de suero aislada del sujeto; y

b) calcular una puntuación a partir de los niveles de proteína determinados en la etapa a), opcionalmente en combinación con otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto;

c) comparar la puntuación obtenida en b) con un valor de referencia; en donde cuando la puntuación en b) está aumentada con respecto al respectivo valor de referencia es indicativo de endometriosis o la presencia de lesiones de tipo endometriósico.

Tal como se ha definido con anterioridad en el presente documento, la endometriosis es una enfermedad crónica y debilitante definida como glándulas o estromas similares al endometrio fuera de la cavidad uterina que conduce a un estado inflamatorio crónico dependiente de estrógenos, asociado a dismenorrea (dolor pélvico no menstrual) e infertilidad [Zondervan *et al.*, 2018].

Normalmente, el método o prueba de diagnóstico de la invención se lleva a cabo en un sujeto, preferentemente una mujer, con signos y/o síntomas de endometriosis. La directriz ESHRE: endometriosis (2022) recomienda que los médicos clínicos consideren el diagnóstico de endometriosis en individuos que presenten los siguientes signos y síntomas cíclicos y no cíclicos: dismenorrea, dispareunia profunda, disuria, disquecia, hematuria o hemorragia rectal dolorosa, dolor irradiado al hombro, neumotórax catamenial, tos/hemoptisis/dolor torácico cíclicos, dolor e hinchazón cicatricial cíclicos, fatiga e infertilidad. En algunas formas de realización, el método de diagnóstico se lleva a cabo en un sujeto de sexo femenino caracterizado o preseleccionado por presentar uno, dos, tres o más de estos signos y síntomas cíclicos y no cíclicos. Por ejemplo, el método de diagnóstico se lleva a cabo en un sujeto de sexo femenino caracterizado o preseleccionado por tener dolor pélvico crónico y/o infertilidad.

En algunas formas de realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las anteriores, dicho sujeto no está embarazado, y/o no ha tomado un tratamiento hormonal en los tres meses anteriores a la extracción de sangre y/o no padece ninguna otra enfermedad inflamatoria, como la enfermedad inflamatoria intestinal. Dicho tratamiento hormonal puede ser, por ejemplo, cualquier tratamiento hormonal usado normalmente para tratar la endometriosis tal como se describe a continuación en el presente documento. Estos incluyen, pero no están limitados a, anticonceptivos combinados (estrógenos y progestágeno), como anticonceptivos orales combinados (AOC), agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), progesterona a dosis bajas (por ejemplo, depósito/implante de progestágeno o dispositivo intrauterino (DIU)), progesterona a dosis altas, como en píldoras de progestágeno solo (PPS), o cualquier combinación de estos. En formas de realización preferidas, dicho sujeto no está embarazado y no padece ninguna otra enfermedad inflamatoria.

En algunas formas de realización, los fenotipos de endometriosis se definen según la localización de las lesiones de tipo endometriósico. Estas incluyen lesiones peritoneales superficiales (SUP), endometriomas ováricos (OMA) y endometriosis infiltrante profunda (EIP). En formas de realización preferidas, el método de la invención descrito en el presente documento es para la detección, el diagnóstico o la monitorización de uno o más de lesiones peritoneales superficiales (SUP), endometriomas ováricos (OMA) y endometriosis infiltrante profunda (EIP), preferentemente OMA y/o EIP.

En algunas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento pueden permitir discriminar y clasificar a los sujetos en función de la presencia prevista de endometriosis o de lesiones similares a la endometriosis. En otras formas de realización, los métodos descritos en el presente documento pueden permitir, adicional o alternativamente, discriminar y clasificar a los sujetos según su distinto grado de endometriosis o fenotipo de endometriosis.

En algunas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento pueden permitir adicional o alternativamente discriminar y clasificar a los sujetos según el estadio de la enfermedad en (i) enfermedad en estadio bajo, que corresponde a los estadios 1 y 2 según la clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (rASRM) (Lee SY *et al.* 2020) y (ii) enfermedad en estadio alto, que corresponde a los estadios 3 y 4 según la clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (rASRM) (Lee SY *et al.* 2020). Normalmente, el endometrioma, con o sin endometriosis infiltrante profunda (EIP), se asocia a un diagnóstico de estadio alto, mientras que la presencia sólo de lesiones superficiales se correlaciona con un estadio bajo de la enfermedad:

Los sujetos identificados como que tienen endometriosis, incluida la endometriosis en estadio bajo o estadio alto,

según los métodos descritos en el presente documento pueden ser candidatos a pruebas exploratorias adicionales, como una laparoscopia con confirmación histológica, que es la norma de referencia actual (The ESHRE guideline: endometriosis, 2022).

Por consiguiente, en algunas formas de realización, un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de endometriosis o lesiones de tipo endometriósico, para predecir la presencia de lesiones de tipo endometriósico, para predecir el grado de endometriosis o para clasificar a un sujeto según el grado o fenotipo de endometriosis tal como se describe en el presente documento, comprende además la realización de una prueba exploratoria, como una laparoscopia, preferentemente una laparoscopia con confirmación histológica, en aquellos sujetos identificados mediante el método de la invención como que tienen endometriosis o lesiones de tipo endometriósico.

La etapa (a) de los métodos de la invención comprende o consiste en determinar en dicha muestra biológica los niveles de proteína de BDNF y/o CA125. En formas de realización preferidas, los biomarcadores de la etapa a) consisten en CA125 y BDNF.

El factor neurotrófico derivado del cerebro, denominado en lo sucesivo BDNF, es un factor de crecimiento dimérico secretado presente en la mayoría de los tejidos humanos, que favorece el crecimiento y la supervivencia de las neuronas. Al igual que otras neurotrofinas, el BDNF se sintetiza primero como una proteína precursora, denominada pro-BDNF de 32 KDa, que es escindida por diferentes proteasas para producir la forma madura de 14 KDa, o la forma truncada de 28 KDa. Tal como se usa el presente documento, BDNF abarca el BDNF de mamíferos, incluido el humano y sus variantes funcionalmente equivalentes, como el BDNF no humano, y las isoformas u otras variantes del BDNF humano y no humano, incluido el pro-BDNF y el BDNF maduro (mBDNF), también denominado en el presente documento "BDNF total". Las variantes de BDNF funcionalmente equivalentes son variantes que incorporan alteraciones, tales como, pero sin limitación, delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos, que no afectan negativamente de forma significativa a la actividad del BDNF. Las secuencias de aminoácidos del BDNF son conocidas y fácilmente accesibles en las bases de datos de secuencias. El BDNF modificado de manera postraducciona se denomina BDNF maduro o mBDNF.

El gen BDNF humano (ID de gen: 627) está localizado en el cromosoma 11 (11p14.1; ensamblaje primario de GRCh38.p14 de referencia) y tiene 12 exones. El corte y empalme alternativo da lugar a múltiples variantes de transcripción; actualmente, se han descrito 17 variantes de transcripción, tal como se representa en la FIG. 14:

La secuencia canónica del producto de expresión de proteína del gen BDNF humano corresponde a NP_001137277.1 en la base de datos de NCBI (véase también la entrada de UniProt P23560-1), una preproteína de 247 aminoácidos y se denomina en el presente documento SEQ ID NO:1:

MTILFLTMVISYFGCMKA**APMKEANIRGQGGLAYPGVIRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVM**
LSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDAANMSMRVRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPV
SKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKRGR

Pro-BDNF: en negrita; propéptido: subrayado; mBDNF: *en cursiva*

Forma precursora (proBDNF), también denominada SEQ ID NO: 2:

APMKEANIRGQGGLAYPGVIRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVM
LSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDAANMSMRVRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPV
SKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKRGR

El BDNF maduro se produce por eliminación proteolítica del propéptido, catalizada por un miembro de la familia de FURINA.

Secuencia del propéptido (aminoácidos 19–128), también denominada SEQ ID NO: 3

APMKEANIRGQGGLAYPGVIRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVM
LSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDAANMSMRVRR

Secuencia de la forma madura (mBDNF), aminoácidos 129–247, también denominada SEQ ID NO: 4:

HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHW
NSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKRGR

En algunas formas de realización, la determinación de BDNF comprende la cuantificación de pro-BDNF y mBDNF, también denominado en el presente documento "BDNF total". En algunas formas de realización, los anticuerpos para la cuantificación del BDNF total se obtienen mediante inmunización animal usando mBDNF como antígeno de vacunación. En otras formas de realización, la determinación de BDNF comprende cuantificar selectivamente la

forma madura (mBDNF). En algunas formas de realización, la determinación de BDNF se lleva a cabo usando al menos un anticuerpo anti-BDNF (por ejemplo, el anticuerpo de detección en un ELISA en sándwich) que tiene una mayor especificidad por la forma de pro-BDNF que por la forma madura. En otras formas de realización, la determinación de BDNF se lleva a cabo usando al menos un anticuerpo anti-BDNF (por ejemplo, el anticuerpo de detección en un ELISA en sándwich) que tiene una mayor especificidad por la forma madura que por la forma de pro-BDNF.

Se conocen en la técnica muchos kits de ELISA para la determinación de BDNF, como los reflejados en la Tabla 1 a continuación (Polachini *et al.*, 2015):

Empresa	Avicera-Bioscience	Biosensis	Millipore	Millipore	Promega	R&D System
Nombre del KIT	ELISA para BDNF humano	ELISA para BDNF Rapid™	Chemikine™	Milliplex®	Sistema de inmunoensayo de BDNF Emax®	Quantikine®
Principio del ensayo	ELISA en sandwich	ELISA en sandwich	ELISA en sandwich	tecnología Luminex®/ xMAP®	ELISA en sandwich	ELISA en sandwich
Sensibilidad (pg/mL)	5-8	2	7,8	2,5	15,6	20
Intervalo de detección (pg/mL)	23-1500	7,8-500	7,8-500	12-50000	7,8-500	62,5-4000
Patrón de BDNF	Humano recombinante	Humano recombinante	Humano recombinante	Mezcla de 12500 pg de BDNF + prolactina	Patrón de BDNF (tipo no declarado)	Humano recombinante
Anticuerpo de recubrimiento/captura	anticuerpo α -BDNF prerrrecubierto (tipo no declarado)	anticuerpo α -BDNF prerrrecubierto (monoclonal murino)	anticuerpo α -BDNF prerrrecubierto (monoclonal murino)	Mezcla de perlas magnéticas recubiertas con Ac α -BDNF O α -prolactina (tipos no declarados)	Recubrimiento manual con anticuerpo α -BDNF (monoclonal murino)	anticuerpo α -BDNF prerrrecubierto (monoclonal murino)
Anticuerpo de detección primaria	anticuerpo α -BDNF biotinilado (tipo no declarado)	anticuerpo α -BDNF biotinilado (monoclonal murino)	anticuerpo α -BDNF biotinilado (monoclonal murino)	Mezcla de anticuerpo α -BDN biotinilado Y α -prolactina (tipos no declarados)	anticuerpo α -BDNF (policlonal de pollo)	anticuerpo α -BDNF (ratón monoclonal)-conjugado con HRP
Tipo de detección secundaria	conjugado de estreptavidina-HRP	conjugado de estreptavidina-HRP	conjugado de estreptavidina-HRP	conjugado de estreptavidina-ficoeritrina	conjugado de anticuerpo α -IgY-HRP	/
Dilución de muestra sugerida	1:40 - 1:80	1:50 – 1:1200	1:2 – hasta optimización por el usuario	1:10	1:4 – hasta optimización por el usuario	1:20 al menos
Reactividad cruzada entre especies declarada	solo humano	humano, ratón, rata y otros	humano y rata	solo humano	no especificado	solo humano
Tiempo de procesamiento	6-7 horas	3-4 horas	21-22 horas	19-20 horas	23-24 horas	4-5 horas

Tabla 1. Kits de ELISA para BDNF. Descripción y características principales de los kits de ELISA para BDNF probados, según lo declarado por los fabricantes (Polachini *et al.*, 2015).

Polachini *et al.*, 2015 realizaron un ensayo de inmunotransferencia por puntos (*dot-blot*) y descubrieron que los anticuerpos de Biosensis, Millipore (ambos kits) y Promega–Emax® también reaccionaban con el pro–BDNF purificado, mientras que los de Aviscera–Bioscience y R&D System–Quantikine® solo mostraban una reactividad marginal frente al pro–BDNF. Además, divulga que la reactividad de Promega–Emax® (pAB), Biosensis y Sigma frente a la misma cantidad de pro–BDNF y de BDNF maduro (100 pg) aplicada como punto sobre el sustrato, pone de manifiesto una reactividad más fuerte de estos anticuerpos frente al pro–BDNF con respecto al BDNF maduro.

El antígeno de cáncer 125 (CA125), también denominado MUC16, es un miembro de la familia de las mucinas y un marcador tumoral ampliamente usado en el cáncer de ovario. Las pruebas serológicas del CA–125 se han usado ampliamente para la detección de la endometriosis y la monitorización de la enfermedad progresiva (Barbieri *et al.*, 1986; Kitawaki *et al.* 2005). Se trata de una mucina anclada a la membrana que contiene un dominio extracelular en su extremo amino-terminal, un gran dominio de repetición en tándem y un dominio transmembrana con un corto dominio citoplasmático. El extremo amino-terminal está altamente glicosilado, mientras que la región de repetición contiene 156 unidades de repetición de aminoácidos que son ricas en serinas, treoninas y prolina. Tal como se usa en el presente documento, CA125 engloba CA125 de mamíferos, incluido el humano y sus variantes funcionalmente equivalentes, como el CA125 no humano, y las isoformas u otras variantes del CA125 humano y no humano. Las variantes funcionalmente equivalentes de CA125 son variantes que incorporan alteraciones, tales como, pero sin limitación, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos, que no afectan negativamente de forma significativa a la actividad de CA125. Las secuencias de aminoácidos del CA125 son conocidas y fácilmente accesibles en las bases de datos de secuencias.

El gen CA125 humano (ID del gen: 94025) está localizado en el cromosoma 19 (19p13.2; ensamblaje primario de GRCh38.p14 de referencia) y tiene 90 exones. Se ha descrito que el corte y empalme alternativo da lugar a 2 variantes de transcripción, a saber, el precursor de la mucina–16 y la mucina–16, tal como se representa en la FIG. 15:

La secuencia canónica del producto de expresión de proteína del gen CA125 humano corresponde a la mucina 16 humana (GenBank: NP_078966.2, 09–OCT–2022; UniProtKB/Swiss–Prot: número de acceso Q8WXI7), que se denomina en el presente documento SEQ ID NO: 5 y se representa en la FIG. 16.

Muchos kits de ELISA para la determinación de CA125 son conocidos en la técnica, tales como los reflejados en la Tabla 2 a continuación:

Empresa	RayBiotech	LifeSpan BioSciences	R&D Systems	R&D Systems	Thermo Fisher Scientific
Ítem	ELISA para CA-125 humano	Kit de ELISA para CA-125	ELISA para CA125/MUC16	ELISA para CA125/MUC16	Kit de ELISA para MUCINA 16/CA125 humano
Número de catálogo	ELH–CA125–1	LS–F24300	DCA125	DY5609–05	EHMUC16
Sensibilidad	0,6 U/mL	0,938 U/mL	0,099 U/mL	NA	Sensibilidad intraensayo: <12 %; sensibilidad extraensayo: <10 %
Intervalo de detección	0,6 U/mL – 400 U/mL	1,563 – 100 U/mL	0,50 – 32 U/mL	31,20 – 2000 pg/mL	0,55–400 U/mL
Cantidad	Kit de microplacas de tiras de 1 x 96 pocillos	1 placa	1 Kit	1 Kit (para 5 placas)	96 pruebas
Referencia (página web)	https://www.raybiotech.com/hu	https://www.lsbio.com/elisakits/	https://www.rndsystems.com	https://www.rndsystems.com/products/hu	https://www.thermofisher.com/elis

del proveedor)	man-ca-125-elisa/?variation_id=16548	human-ca125-sandwich-elisa-elisa-kit-ls-f24300/24300?trid=247	om/products/human-ca125-muc16-quantikine-elisa-kit_dca125?utm_source=biocompare&utm_medium=referral&utm_campaign=product_DCA125&utm_term=elisas&utm_content=editorial	man-ca125-muc16-duoset-elisa_dy5609-05?utm_source=biocompare&utm_medium=referral&utm_campaign=product_DY5609-05&utm_term=elisas&utm_content=editorial	a/product/MUCIN-16-CA125-Human-ELISA-Kit/EHMUC16
----------------	--------------------------------------	---	---	---	--

Preferentemente, los niveles de proteína de CA125 y BDNF se determinan en una muestra de suero, más preferentemente en la misma muestra de suero. En algunas formas de realización, dicha muestra de suero es una muestra de suero venoso. Normalmente, dicho suero se obtiene a partir de muestras de sangre recogidas después de un ayuno, por ejemplo después de un ayuno de al menos 10 horas.

Este tipo de muestras se usan habitualmente en la práctica clínica y un experto en la técnica sabrá identificar los medios más adecuados para su obtención y conservación. Una vez obtenida la muestra, puede usarse fresca, congelarse o conservarse usando medios adecuados.

La muestra biológica, preferentemente una muestra de suero, puede ser una muestra obtenida de un sujeto en cualquier momento del ciclo menstrual, incluyendo la fase menstrual, proliferativa o secretora (por ejemplo, fase secretora temprana, secretora media o secretora tardía), Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. Anim Reprod Sci. abr. de 2011;124(3-4):229-36. En algunas formas de realización, la muestra procede de la fase proliferativa o secretora, preferentemente de la fase proliferativa o secretora media.

Los métodos adecuados para determinar los niveles de una proteína dada incluyen, sin limitación, los descritos a continuación en el presente documento. Los métodos preferidos para determinar los niveles de expresión de proteínas en los métodos de la presente invención son los inmunoensayos. Los expertos en la técnica conocen varios tipos de inmunoensayos para la cuantificación de proteínas de interés. Estos métodos se basan en el uso de reactivos de afinidad, que pueden ser cualquier anticuerpo o ligando que se una específicamente a la proteína diana o a un fragmento de la misma, en donde dicho reactivo de afinidad está preferentemente marcado. Ejemplos ilustrativos, pero no exclusivos, de marcadores que pueden usarse incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores o sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc.

Los reactivos de afinidad pueden ser cualquier anticuerpo o ligando que se una específicamente a la proteína diana o a un fragmento de la misma. Los ligandos de afinidad pueden incluir proteínas, péptidos, aptámeros peptídicos, afímeros y otros andamiajes proteicos específicos de la diana, como los miméticos de anticuerpos.

Los anticuerpos específicos contra los marcadores proteicos usados en los métodos de la invención pueden producirse, por ejemplo, inmunizando a un huésped con una proteína de la presente invención o un fragmento de la misma. Asimismo, los péptidos específicos contra los marcadores proteicos usados en los métodos de la invención pueden producirse mediante el cribado de bibliotecas de péptidos sintéticos.

Las técnicas de inmunotransferencia de tipo Western (*Western blot*) o inmunotransferencia permiten comparar la abundancia relativa de proteínas separadas por un gel electroforético (por ejemplo, proteínas nativas por su estructura 3D o proteínas desnaturizadas por la longitud del polipéptido). Las técnicas de inmunotransferencia usan anticuerpos (u otros ligandos específicos en técnicas relacionadas) para identificar proteínas diana entre una serie de especies proteicas no relacionadas. Implican la identificación de la diana proteica mediante reacciones específicas antígeno-anticuerpo (o proteína-ligando). Las proteínas suelen separarse por electroforesis y transferirse a una lámina de material polimérico (generalmente nitrocelulosa, nailon o poli(difluoruro de vinilideno)). Las inmunotransferencias por puntos y por ranuras (*dot* y *slot blots*) son procedimientos simplificados en los que las muestras de proteínas no se separan por electroforesis, sino que se inmovilizan directamente sobre una membrana.

Tradicionalmente, la cuantificación de proteínas en solución se ha llevado a cabo mediante inmunoensayos sobre un soporte sólido. Dicho inmunoensayo puede ser, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

(ELISA), un ensayo de inmunoadsorción fluorescente (FIA), un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA), o un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo enzimático multiplicado, un radioinmunoensayo en fase sólida (SPROA), un ensayo de polarización de fluorescencia (FP), un ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), un ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET), un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Se incluyen específicamente las versiones múltiplex y de nueva generación de cualquiera de las anteriores, como los inmunoensayos de citometría de flujo basados en perlas (por ejemplo, basados en la tecnología Luminex xMAP). En una forma de realización particular, dicho inmunoensayo es un ensayo ELISA o cualquier versión múltiplex del mismo.

Otros métodos que pueden usarse para la cuantificación de proteínas en solución son las técnicas basadas en la espectrometría de masas (EM), como la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL / EM), descrita, por ejemplo, en el documento US2010/0173786, o CL-EM / EM en tándem (documentos WO2012/155019, US2011/0039287, M. Rauh, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1 de febrero de 2012, 883-884. 59-67) y las versiones múltiplex de las técnicas anteriores, así como la nueva generación de tales técnicas y sus combinaciones.

En otras formas de realización, la determinación de si los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF están aumentados con respecto a un valor de referencia se lleva a cabo mediante pruebas de flujo lateral, también conocidas como pruebas de inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL) o simplemente inmunoensayos de flujo lateral (IFL). Se trata de pequeños y sencillos dispositivos destinados a detectar un analito diana en una muestra determinada. Estas pruebas son sencillas, rápidas y baratas y no requieren equipos especializados y costosos ni personal cualificado. Al principio, las pruebas de ICFL se usaban exclusivamente en diagnósticos médicos (ya fuese para pruebas en el domicilio, pruebas en puntos de atención o uso en laboratorios), pero su presencia en otros ámbitos es ya muy habitual. La primera aplicación fue la conocida prueba de embarazo en el domicilio. Aunque existen varias pruebas semicuantitativas disponibles en el mercado, las pruebas de ICFL son principalmente cualitativas y se limitan a dar un resultado positivo o negativo basado en la presencia o ausencia del analito diana en una concentración específica.

La tecnología se basa en una serie de lechos capilares con materiales porosos que tienen la capacidad de transportar líquidos de forma espontánea. Cuando el analito diana es grande (por ejemplo, una proteína) se suele usar un formato de sándwich. Normalmente, el primer elemento (la almohadilla de conjugado) tiene almacenados los denominados coloides, un formato seco de partículas bioactivas (principalmente nanopartículas de oro o micropartículas de látex unidas a un anticuerpo específico contra el analito diana) en una matriz de sal-azúcar. Esta almohadilla de conjugado suele actuar también como almohadilla de muestra y contiene todo lo necesario para facilitar el reconocimiento del antígeno diana por el coloide. Una vez que la muestra empapa la almohadilla de conjugado, el fluido disuelve la matriz de sal-azúcar y los coloides. Por lo tanto, la muestra y el coloide se mezclan mientras fluyen a través de la estructura porosa. De este modo, el analito se une al coloide y el complejo se transporta a la membrana de nitrocelulosa. Este material tiene una zona específica llamada línea de prueba donde se ha inmovilizado una tercera molécula (normalmente otro anticuerpo diferente contra el analito diana). Cuando el complejo (coloide-antígeno) llega a la línea de prueba se une a este anticuerpo y al cabo de un tiempo, cuando ha discurrido cada vez más fluido, se acumulan los coloides, y la línea de prueba adquiere color. Normalmente, también hay una línea de control (después de la línea de prueba) que captura los coloides que no se han unido a la línea de prueba. En la línea de control, se adsorbe una cuarta molécula (podría ser un anticuerpo contra la fracción Fc del primer anticuerpo) y su adquisición de color asegura la funcionalidad de la prueba. Tras pasar por estas zonas de reacción, el fluido entra en el material poroso final, la mecha o sumidero que actúa simplemente como contenedor de residuos.

La expresión "determinar los niveles de proteína" o "determinar los niveles de expresión de proteína", tal como se usa en el presente documento, se refiere a determinar la cantidad o concentración absoluta o relativa del biomarcador proteico en la muestra. En algunas formas de realización, los niveles de proteína se expresan en forma logarítmica. Las técnicas para someter a ensayo los niveles de biomarcadores individuales a partir de muestras de ensayo las conoce bien el técnico experto, y la invención no está limitada por los medios mediante los que se evalúan los componentes.

Los niveles de expresión pueden ser absolutos o relativos. Cuando se normalizan los niveles de expresión, la normalización puede realizarse con respecto a diferentes medidas en la muestra. Estos procedimientos los conocen bien los expertos en la técnica. Normalmente, los niveles de expresión se normalizan con respecto a un "control endógeno". Un "control endógeno", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un producto de expresión génica cuyos niveles de expresión no cambian o cambian solo en cantidades limitadas en sujetos con endometriosis con respecto a sujetos sanos.

El "control endógeno", también denominado en el presente documento "gen de control" o "gen normalizador", suele ser el producto de expresión de un gen de mantenimiento y codifica una proteína que se expresa de forma constitutiva y desempeña funciones celulares esenciales. Los genes de mantenimiento que pueden usarse como control endógeno incluyen, por ejemplo, β -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica 18-S, ciclofilina, GAPDH, actina y HPRT. En una forma de realización particular, los "controles endógenos" usados en la presente

invención se seleccionan del grupo que consiste en 18S, ACTB, B2M, GAPDH, GUSB2, HPRT, PPIA, RPLP, TBP, TUBB, UBC e YWHAZ. En otros casos, la normalización puede realizarse mediante la normalización de proteínas totales.

En una forma de realización particular, la determinación de BDNF y/o CA125 se lleva a cabo en suero humano mediante un inmunoensayo ELISA en sándwich. En algunas formas de realización, cada biomarcador se determina en un conjunto diferente de pocillos. Es decir, la placa ELISA está recubierta con un anticuerpo dirigido contra BDNF o CA125. En otras formas de realización, los pocillos tienen un doble recubrimiento, es decir, cada pocillo está recubierto con un anticuerpo dirigido contra BDNF y otro anticuerpo contra CA125.

En algunas formas de realización, el BDNF o el CA125 de las muestras, y los patrones cuando se usan, se unen a los anticuerpos y se inmovilizan sobre la placa. Tras eliminar las proteínas no unidas de la muestra biológica (por ejemplo, suero) mediante un procedimiento de lavado, las placas se incuban con anticuerpos anti-CA125 humano conjugados con biotina y anticuerpos anti-BDNF humano conjugados con biotina. El conjugado de biotina no unido se elimina mediante lavado con solución de lavado. En una etapa posterior, se añade el conjugado estreptavidina–HRP, que se une a biotina. La estreptavidina–HRP no unido se elimina mediante lavado con la solución de lavado. Por último, se añade una solución de sustrato, y el complejo formado cataliza la reacción química del sustrato para dar una entidad química coloreada. La reacción enzimática de color se detiene tras un período de tiempo definido. Se mide por fotometría la concentración de la sustancia química coloreada en correlación proporcional con la concentración del anticuerpo.

Los métodos de la invención pueden comprender opcionalmente la etapa (b) que comprende calcular una puntuación. La puntuación es un valor obtenido según un algoritmo matemático dado en donde los valores proteicos de cada uno de los biomarcadores usados en los métodos de la invención son variables de dicho algoritmo matemático. Preferentemente, la fórmula para calcular dicha puntuación comprende calcular la suma del producto entre los niveles de proteína de los biomarcadores y sus coeficientes de regresión estimados obtenidos en un análisis de regresión.

Además, la etapa (c) de los métodos de la invención comprende clasificar/seleccionar al sujeto como que tiene, o se sospecha que tiene, endometriosis o lesiones similares a la endometriosis basándose en los niveles de proteína de CA125 y BDNF en la muestra del sujeto determinados en la etapa a), o en la puntuación obtenida en b).

Normalmente, en la etapa c), dicho método comprende comparar los niveles de proteína de CA125 y BDNF en a), o la puntuación en b), de la muestra del sujeto con un valor de referencia; y un aumento de los niveles de proteína de CA125 y BDNF, o de la puntuación, en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de endometriosis o de lesiones similares a la endometriosis; mientras que un descenso de los niveles de proteína de CA125 y BDNF, o de la puntuación, en la muestra del sujeto con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de ausencia de endometriosis o de lesiones similares a la endometriosis.

En consecuencia, los métodos descritos en el presente documento comprenden la comparación de los niveles de proteína o puntuación en la muestra del sujeto con un valor de referencia. El término “valor de referencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un criterio predeterminado usado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. Este “valor de referencia” también puede denominarse “valor de corte” o “valor umbral”.

El término “valor de referencia” puede referirse a un valor determinado en una o más muestras, generalmente valores medios de preferentemente un número estadísticamente significativo de muestras, obtenidas de una población de referencia o control. En algunas formas de realización, la “población de referencia o control” es un grupo de individuos que presentan síntomas de endometriosis, pero son negativos en una laparoscopia con confirmación histológica.

La determinación del “valor de referencia” se lleva a cabo en condiciones similares o idénticas a las de la muestra biológica del sujeto de ensayo. Normalmente, dichas muestras de referencia proceden del mismo tipo de muestra biológica, por ejemplo, del mismo tejido o tipo celular y han sido sometidas a los mismos procedimientos para su obtención y conservación. Alternativamente, dichos “valores de referencia” son valores preestablecidos, generalmente valores medios, en la población de control o referencia.

El valor de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tenga un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, un valor de media, un valor medio, una puntuación z (por ejemplo, valor medio + o – 1, 2 ó 3 desviaciones estándar (DE)), un valor de tercil o un valor en comparación con un valor de control o de referencia particular.

Además, cabe señalar que en la técnica anterior se conocen diversos métodos estadísticos y matemáticos para establecer el nivel umbral o de corte de la expresión. En algunas formas de realización, un nivel umbral o de corte de la expresión para un biomarcador particular puede seleccionarse basándose en datos de gráficos de Característica Operativa del Receptor (ROC), por ejemplo determinando el valor de corte óptimo, como se determina en un índice

de Youden máximo. Un experto en la técnica apreciará que estos niveles de expresión umbral o de corte pueden variarse, por ejemplo, desplazándose a lo largo del gráfico ROC para un biomarcador particular o combinaciones de estos, para obtener diferentes valores de sensibilidad o especificidad, afectando así al rendimiento global del ensayo.

La sensibilidad, la especificidad y/o la precisión son parámetros que suelen usarse para describir la validez o el rendimiento de una prueba. En concreto, se usan para cuantificar lo bueno y fiable que es el método de discriminación. Una prueba suele calibrarse en cuanto a la especificidad y sensibilidad deseadas en función del uso previsto de la prueba en la práctica clínica. Una alta sensibilidad corresponde a un alto valor predictivo negativo y se considera generalmente una propiedad deseada para una prueba de “descarte”, como una prueba de detección que normalmente irá seguida de una prueba de confirmación. Una alta especificidad corresponde a un alto valor predictivo positivo y se considera generalmente una propiedad deseada para una prueba de “inclusión”, como una prueba de diagnóstico complementaria.

En formas de realización preferidas, los métodos de la invención tienen valores de sensibilidad, especificidad y/o precisión de al menos aproximadamente el 60 %, preferentemente de al menos aproximadamente el 70 %, y pueden ser, por ejemplo, de al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % en al menos el 60 % del grupo o la población analizados, o preferentemente en al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % del grupo o la población analizados.

En los métodos de la invención, los niveles de proteína o la puntuación se consideran “disminuidos” cuando dicho valor es inferior a un valor de referencia. Preferentemente, se considera que el valor es inferior a un valor de referencia cuando es al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 % o más bajo que el valor de referencia.

Asimismo, en el contexto de los métodos de la invención, los niveles de proteína o la puntuación se consideran “aumentados” cuando dicho valor es superior a un valor de referencia. Preferentemente, se considera que el valor es superior a un valor de referencia cuando es al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o más alto que un valor de referencia.

Alternativamente, o además, los sujetos que tienen más de aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 veces la desviación de los niveles (es decir, aumento o disminución) que el valor de referencia como se describe en el presente documento.

El método de la invención, tal como lo entiende un experto en la técnica, no pretende ser correcto en el 100 % de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas se clasifique correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la técnica mediante el uso de diferentes medidas de significación estadística obtenidas por pruebas estadísticas; ejemplos ilustrativos y no limitativos de dichas medidas de significación estadística incluyen la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, etc. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %. Los valores de p son, preferentemente, inferiores a 0,1, inferiores a 0,05, inferiores a 0,01, inferiores a 0,005 o inferiores a 0,0001. Las enseñanzas de la presente invención permiten, preferentemente, clasificar correctamente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una población o un grupo determinante analizado.

Se observa además que la precisión del método de la invención puede incrementarse aún más considerando adicionalmente otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto (por ejemplo, edad, sexo, consumo de tabaco y/u otros factores de riesgo), preferentemente en los que dichos biomarcadores génicos o proteicos sean distintos de ZAG y/o glicodelina. La determinación de estos otros marcadores, parámetros y/o características puede ser secuencial o simultánea a cualquiera o a todas las etapas descritas con anterioridad en el presente documento.

En formas de realización preferidas, el método de la invención comprende además determinar una o más variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto, preferentemente, estas variables son una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho seleccionadas del grupo que consiste en:

- Registro de intervenciones quirúrgicas previas por endometriosis;

- Períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis;
- Uso de implantes hormonales;
- 5 • Frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses;
- Edad en la primera experiencia de dolor durante el coito;
- 10 • Edad en la primera experiencia de síntomas de quiste ovárico;
- Intensidad del dolor menstrual la última vez (1–10); y
- Edad de inicio del uso de ibuprofeno.
- 15 Como se muestra en el Ejemplo 3, se ha demostrado que la respuesta a estas variables está asociada a la presencia de endometriosis. En particular,
- a) antecedentes de cirugía previa por endometriosis; respuesta posible: Sí/No. Sí: asociada a endometriosis. No: no asociada a endometriosis.
- 20 b) reglas dolorosas como síntoma para el examen de endometriosis; respuesta posible: Sí/No. Sí: asociado a endometriosis. No: no asociado a endometriosis.
- c) Uso de implantes hormonales (se refiere al uso de implantes hormonales de estrógenos y/o progestágeno);
- 25 posible respuesta: Sí/No. Sí: no asociado a endometriosis. No: asociado a endometriosis.
- d) Frecuencia de deposiciones más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses; respuesta posible: frecuente (a veces, a menudo y la mayoría de las veces las respuestas se agruparon en esta clase)/no frecuente (nunca/raramente las respuestas se agruparon en esta clase). Frecuente: asociado a endometriosis. No frecuente: no asociado a endometriosis.
- 30 e) Edad a la primera experiencia de dolor durante el coito; a mayor edad, mayor asociación con endometriosis.
- f) Edad de la primera experiencia de síntomas de quiste ovárico; a mayor edad, mayor asociación con endometriosis.
- 35 g) intensidad del dolor menstrual la última vez (1–10); respuesta posible: ninguno, leve, moderado o intenso. Ninguno y leve (dolor 0–5): no relacionado con endometriosis. Moderado e intenso (dolor 6 a 10): relacionado con endometriosis.
- 40 h) Edad de inicio del uso de ibuprofeno; a mayor edad, mayor asociación con endometriosis.
- En algunas formas de realización, dichas variables son una, dos, tres o cuatro seleccionadas del grupo que consiste en:
- 45 a) registro de intervenciones quirúrgicas previas por endometriosis;
- b) menstruaciones dolorosas como síntoma de examen de endometriosis;
- 50 c) intensidad del dolor menstrual la última vez (1–10); y
- d) edad de inicio del uso de ibuprofeno.
- En otras formas de realización, dichas variables son una, dos, tres o cuatro seleccionadas del grupo que consiste en:
- 55 a) registro de intervenciones quirúrgicas previas por endometriosis;
- b) menstruaciones dolorosas como síntoma para el examen de endometriosis;
- 60 c) uso de implantes hormonales; y
- d) frecuencia de deposiciones más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses.
- 65 Por ejemplo, dichas variables pueden consistir en:

- registro de cirugía previa por endometriosis; y
 - menstruaciones dolorosas como síntoma para el examen de endometriosis; o
 - registro de cirugía previa por endometriosis; y
 - uso de implantes hormonales; o
 - registro de cirugía previa por endometriosis; y
 - frecuencia de deposiciones más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses; o
 - períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis; y
 - uso de implantes hormonales; o
 - períodos dolorosos como síntoma para el examen de la endometriosis; y
 - frecuencia de deposiciones más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses; o
 - uso de implantes hormonales; y
 - frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses; o
 - registro de intervenciones quirúrgicas previas por endometriosis;
 - períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis; y
 - uso de implantes hormonales; o
 - registro de cirugía previa por endometriosis;
 - períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis; y
 - frecuencia de deposiciones más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses; o
 - registro de cirugía previa por endometriosis;
 - uso de implantes hormonales; y
 - frecuencia de deposiciones más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses; o
 - períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis;
 - uso de implantes hormonales; y
 - frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses.
- El sujeto en los métodos de la invención es preferentemente un sujeto de sexo femenino, más preferentemente un sujeto de sexo femenino humano que presenta signos y/o síntomas de endometriosis como se ha descrito con anterioridad en el presente documento.
- Los métodos de la presente invención o cualquiera de las etapas de estos pueden implementarse por ordenador. En una forma de realización particular, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o formas de realización descritas en el presente documento, la puntuación obtenida por combinación matemática de los niveles de proteína determinados, y opcionalmente en combinación con otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos, y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto, preferentemente en donde dichos biomarcadores génicos o proteicos son distintos de ZAG y/o glicodelina, se calcula usando un ordenador; y/o la comparación entre los valores en la muestra del sujeto y el valor de referencia se lleva a cabo usando un ordenador.
- Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método implementado por ordenador, en donde el método es cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento o cualquier combinación de estos.
- Se señala que cualquier programa informático capaz de implementar cualquiera de los métodos de la presente

invención o usado para implementar cualquiera de estos métodos o cualquier combinación de estos, también forma parte de la presente invención.

Este programa informático puede estar basado en la web o cargarse directamente en la memoria interna de un ordenador digital, comprendiendo porciones de código de software para realizar las etapas de comparar los valores de la una o más muestras biológicas de un sujeto con un valor de referencia y determinar la endometriosis o la presencia de lesiones similares a la endometriosis, o el grado o estadio de la enfermedad endometriósica, como se describe con anterioridad en el presente documento, cuando dicho producto se ejecuta en un ordenador.

También se señala que cualquier dispositivo o aparato que comprenda medios para llevar a cabo las etapas de cualquiera de los métodos de la presente invención o cualquier combinación de estos, o que lleve un programa informático capaz de o para implementar cualquiera de los métodos de la presente invención o cualquier combinación de estos, se incluye como que forma parte de la presente memoria descriptiva.

Los métodos de la invención también pueden comprender el almacenamiento de los resultados del método en un soporte de datos, preferentemente en donde dicho soporte de datos es un medio legible por ordenador. La presente invención se refiere además a un medio de almacenamiento legible por ordenador que tiene almacenado en el mismo un programa informático de la invención o los resultados de cualquiera de los métodos de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, "un medio legible por ordenador" puede ser cualquier aparato que pueda incluir, almacenar, comunicar, propagar o transportar los resultados de la determinación del método de la invención. El medio puede ser un sistema (o aparato o dispositivo) electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo o semiconductor, o un medio de propagación.

En algunas formas de realización, la presente invención se refiere a un método implementado por ordenador (CI) de la invención como se describe en el presente documento, en donde dicho método comprende:

- i. recibir mediante un programa informático la información sobre los niveles de proteína de un grupo de biomarcadores en una muestra biológica (preferentemente una muestra de suero) aislada del sujeto, donde dichos biomarcadores consisten en BDNF y CA125, y opcionalmente información sobre otros marcadores génicos o proteicos, parámetros bioquímicos y/o variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto;
- ii. procesar la información recibida de acuerdo con la etapa i) llevando a cabo la etapa c), y opcionalmente la etapa b), como se ha descrito con anterioridad en el presente documento;
- iii. generar una información de salida, por ejemplo a través de la pantalla de un terminal.

En formas de realización preferidas, dicho método es un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de endometriosis o lesiones de tipo endometriósico como se describe en el presente documento y el resultado generado es la identificación o clasificación de un sujeto que tiene o con una alta probabilidad de tener endometriosis o como un individuo que podría beneficiarse de una prueba exploratoria, como una laparoscopia.

En formas de realización preferidas también se refiere a un programa informático que comprende instrucciones que, cuando el programa es ejecutado por un ordenador, hacen que el ordenador lleve a cabo las etapas ii) y/o iii), del método _CII descrito con anterioridad en el presente documento.

En algunas formas de realización también se refiere a un aparato de procesamiento de datos que comprende medios para llevar a cabo las etapas ii) y/o iii) de la invención CI descritos con anterioridad en el presente documento.

Métodos de selección y tratamiento de sujetos de la invención

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para seleccionar un sujeto que probablemente se beneficiaría de un tratamiento adecuado para tratar la endometriosis o lesiones similares a la endometriosis, en donde dicho sujeto se selecciona por tener o sospecharse que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis según un método como el descrito con anterioridad en el presente documento.

En un aspecto relacionado, la invención también se refiere a un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento adecuado o mediante la realización de una resección quirúrgica, en donde dicho sujeto es un sujeto que ha sido clasificado como que tiene o se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis mediante un método como el descrito en el presente documento con anterioridad.

Entre las diversas intervenciones, los tratamientos adecuados para tratar la endometriosis o lesiones similares a la endometriosis incluyen anticonceptivos combinados (estrógeno y progestágeno) (primera línea), terapia de solo progestágeno, agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, danazol, inhibidores de la aromatasa y tratamientos del dolor neuropático. El estrógeno puede comprender etinil-estradiol, mestranol, quinestranol, estradiol, estrona, estrano, estriol, estetrol, estrógenos equinos conjugados y precursores de los mismos que son capaces de liberar *in vivo* un estrógeno de este tipo. El progestágeno puede comprender levonorgestrel, norgestimato, noretisterona, didrogestrona, drospirenona, 3-beta-hidroxidesogestrel, 3-ceto-desogestrel (=etonogestrel), 17-desacetil-norgestimato, 19-norprogesterona, acetoxipregnenolona, alilestrenol, anagestona, clormadinona, ciproterona, demegestona, desogestrel, dienogest, dihidrogestrona, dimetisterona, etisterona, diacetato de etinodiol, acetato de flurogestona, gastrinona, gestodeno, gestrinona, hidroximetilprogesterona, hidroxiprogesterona, linestrenol (=linoestrenol), medrogestona, medroxiprogesterona, megestrol, melengestrol, nomegestrol, noretindrona (=noretisterona), noretinodrel, norgestrel (incluye d-norgestrel y dl-norgestrel), norgestrienona, normetisterona, progesterona, quingestanol, (17alfa)-17-hidroxi-11-metilen-19-norpregna-4,15-dien-20-in-3-ona, tibolona, trimegestona, acetofénido de algestona, nestorona, promegestona, ésteres de 17-hidroxiprogesterona, 19-nor-17-hidroxiprogesterona, 17alfa-etinil-testosterona, 17alfa-etinil-19-nor-testosterona, oxima de d-17beta-acetoxi-13beta-etil-17alfa-etinil-gon-4-en-3-ona y precursores de estos compuestos. Los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) pueden comprender buserelina, leuprorelina, nafarelina, y triptorelina. Los antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina pueden comprender cetorelix, elagolix, ganirelix, linzagolix y relugolix. Los inhibidores de aromatasa pueden comprender aminoglutetimida, anastrozol, exemestano, vorozol, letrozol, fadrozol, rogletimida, atamestano, formestano y liarozol.

Además de proporcionar un diagnóstico histológico, la resección quirúrgica reduce el dolor al destruir los implantes endometriósicos. La resección quirúrgica puede ser conservadora (tratamiento de las lesiones de endometriosis mediante ablación o resección), definitiva (histerectomía, con o sin ooforectomía, además de la resección de la endometriosis) o radical (extirpación de todos los implantes visibles en el momento de la cirugía).

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para seleccionar un sujeto que probablemente se beneficiaría de una prueba de confirmación, en donde dicho sujeto es un sujeto que ha sido clasificado como que tiene o se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis de acuerdo con un método como el descrito en el presente documento con anterioridad. Dicha prueba de confirmación puede ser cualquier prueba de confirmación conocida en la técnica, preferentemente una laparoscopia con confirmación histológica.

En un aspecto relacionado, la invención también se refiere a un método para realizar una prueba de confirmación, como una laparoscopia, en un sujeto que se sospecha que tiene endometriosis o lesiones similares a la endometriosis, en donde dicho sujeto ha sido seleccionado por tener endometriosis o lesiones similares a la endometriosis mediante un método como el descrito en el presente documento con anterioridad.

Kits y usos de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar los niveles de uno o más de los biomarcadores descritos en el presente documento en una muestra biológica descrita en el presente documento (preferentemente una muestra de suero) aislada de un sujeto. Las combinaciones de marcadores pueden ser las descritas con anterioridad en los métodos de la invención. El kit también puede contener instrucciones que indiquen cómo pueden usarse los materiales contenidos en el kit.

El término "kit" o "kit de ensayo" designa las combinaciones de reactivos y adyuvantes necesarias para un análisis. Aunque en la mayoría de los casos un kit de ensayo consta de varias unidades, también existen elementos de análisis de una sola pieza, que deben considerarse igualmente kits de ensayo.

En una forma de realización particular, dicho kit es adecuado para determinar los niveles de proteína de CA125 y/o BDNF en una muestra biológica, preferentemente una muestra de suero, tal como se ha descrito con anterioridad, y dicho kit comprende:

- i. un reactivo para la cuantificación de los niveles de proteína de BDNF; y/o
- ii. un reactivo para la cuantificación de los niveles de proteína de CA125;
- iii. opcionalmente, un reactivo para la cuantificación de una proteína con fines de normalización;
- iv. opcionalmente, un BDNF humano y un CA125 humano (preferentemente una versión recombinante de estos, como el reactivo de referencia de la OMS (*WHO Reference Reagent, WHO RR*) para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o la proteína BDNF humana recombinante (n.º de cat. B-250, Alomone); y/o la proteína CA125/MUC16 humana recombinante (n.º de cat. 5609, R&D systems), por ejemplo con fines de calibración y/o como controles positivos;

v. opcionalmente, comprende además instrucciones para el uso de dichos reactivos en la determinación de los niveles de dichas proteínas en una muestra biológica aislada de un sujeto.

Las formas de realización particulares y preferidas del kit y sus usos son los descritos en el presente documento para los métodos de la invención.

En algunos casos, el BDNF humano y el CA125 humano se proporcionan para fines de calibración como una serie de soluciones de calibración con valores de concentración crecientes de la proteína correspondiente. En algunas formas de realización, el kit de la invención comprende una solución calibradora común en donde están presentes tanto BDNF como CA125.

En formas de realización preferidas, dicho kit comprende:

- a) un reactivo de afinidad para BDNF humano, preferentemente para SEQ ID NO: 2;
- b) un reactivo de afinidad para CA125 humano, preferentemente para SEQ ID NO: 4;
- c) opcionalmente, un reactivo de afinidad para una proteína con fines de normalización;
- d) opcionalmente, un BDNF humano y un CA125 humano (preferentemente una versión recombinante de estos), por ejemplo con fines de calibración y/o como controles positivos;
- e) opcionalmente, comprende además instrucciones para el uso de dichos reactivos en la determinación de los niveles de dichas proteínas en una muestra biológica aislada de un sujeto.

Dichos reactivos, así como las características y formas de realización preferidas del kit y los usos del mismo, pueden ser los descritos con anterioridad para los métodos de la invención.

El término “un reactivo de afinidad para”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un reactivo de afinidad capaz de unirse específicamente a la proteína diana mencionada. Los diversos reactivos de afinidad pueden marcarse con las mismas etiquetas o con etiquetas diferentes. Preferentemente, se marcarán con etiquetas diferentes para el análisis múltiple.

En formas de realización preferidas, dicho reactivo de afinidad es un polipéptido, preferentemente un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal), capaz de unirse específicamente a las proteínas diana mencionadas.

Existen numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos. Los anticuerpos pueden producirse usando métodos de ADN recombinante, véase, por ejemplo, *Current Trends in Monoclonal Antibody Development* (Shire *et al.* 2010), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse preparando líneas celulares inmortalizadas capaces de producir anticuerpos con la especificidad deseada. Tales líneas celulares inmortalizadas pueden producirse de diversas maneras. Convenientemente, un pequeño animal no humano, como un ratón, se hiperinmuniza con el inmunógeno deseado. A continuación, se sacrifica el vertebrado, normalmente varios días después de la inmunización final, se extraen las células del bazo y se immortalizan las células del bazo. La técnica más común es la fusión con un compañero de fusión de células de mieloma, descrita por primera vez por (Köhler y Milstein 1975)). También son bien conocidas otras técnicas, como la transformación con VEB, la transformación con ADN desnudo, por ejemplo, oncogenes, retrovirus, etc., o cualquier otro método que permita el mantenimiento estable de la línea celular y la producción de anticuerpos monoclonales. Las técnicas específicas para preparar anticuerpos monoclonales se describen en (Harlow y Lane 1988), cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia.

Los anticuerpos que se unen específicamente a cada uno de BDNF y CA125 son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes incluyen los anticuerpos disponibles comercialmente descritos en el presente documento con anterioridad.

Preferentemente, dicho kit comprende una superficie o soporte sólido que está recubierto con un reactivo de afinidad como el descrito en el presente documento con anterioridad (es decir, el reactivo de afinidad primario o de captura). El soporte sólido puede incluir cualquier soporte conocido en la técnica en donde pueda inmovilizarse dicho reactivo de afinidad. En algunas formas de realización, dichos soportes sólidos son placas de pocillos de microtitulación, portaobjetos (por ejemplo, portaobjetos de vidrio), chips (por ejemplo, chips de proteínas, chips biosensores, como los chips Biacore), cartuchos microfluídicos, cubetas, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas xMAP®) o resinas.

Dicho reactivo para determinar los niveles de la proteína marcadora definida en el presente documento con anterioridad puede ser también un reactivo o anticuerpo secundario (de detección) de afinidad. Estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Además, pueden derivar de cualquier organismo mamífero, incluidos

ratones, ratas, hámsteres, cabras, camellos, pollos, conejos y otros. Normalmente, el anticuerpo primario y el secundario serán de especies animales diferentes. También pueden ser anticuerpos monoclonales, con la condición de que se unan a epítopos diferentes y no haya interferencias estéricas. Los anticuerpos secundarios o de detección pueden conjugarse con cualquier medio de detección adecuado, como enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), luciferasa y similares) o colorantes (por ejemplo, colorantes colorimétricos, colorantes fluorescentes, colorantes de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), colorantes de FRET resueltos en el tiempo (TR) y similares). En el presente documento se han descrito con anterioridad otros marcadores adecuados.

En algunas formas de realización, dicho kit es un kit de ELISA que comprende:

- i. un anticuerpo de captura anti-BDNF y un anticuerpo de captura anti-CA125;
- ii. un anticuerpo de detección anti-BDNF y un anticuerpo de detección anti-CA125, en los que el anticuerpo de detección se conjuga con una etiqueta de detección, como una enzima (por ejemplo, peroxidasa o fosfatasa alcalina) o biotina;
- iii. un sustrato enzimático, como la tetrametilbencidina (TMBD);
- iv. cuando el anticuerpo de detección esté conjugado con biotina, una estreptavidina conjugada con enzima;
- v. opcionalmente, un BDNF humano recombinante y un CA125 humano recombinante para el calibrador y los controles positivos;
- vi. opcionalmente, comprender además instrucciones para el uso de dichos reactivos en la determinación de los niveles de proteína de BDNF y CA125 en una muestra biológica aislada de un sujeto según se describe en el presente documento.

En algunas formas de realización, dicho kit para determinar los niveles de una proteína diana de la invención en una muestra biológica, es un inmunoensayo de flujo lateral (IFL) que opcionalmente puede acoplarse a un lector de intensidad de línea, y permite determinar los niveles de la proteína diana o cuando los niveles de la proteína diana están por encima de un nivel de referencia. La tecnología, así como los reactivos típicos, se describen en el presente documento con anterioridad. Para poner en práctica la presente invención, podría usarse una gran variedad de diferentes dispositivos de sistemas de flujo lateral conocidos en la técnica.

Los reactivos auxiliares normalmente usados en un inmunoensayo, como un inmunoensayo de soporte sólido, también pueden estar comprendidos e incluyen, por ejemplo, un tampón de inmovilización, un reactivo de inmovilización, un tampón de dilución, un anticuerpo secundario o de detección, un reactivo de detección, un tampón de bloqueo, un tampón de lavado, un tampón de detección, una solución de parada, un tampón de enjuague del sistema y una solución de limpieza del sistema que son bien conocidos por un experto en la técnica.

En otro aspecto más, la invención se refiere al uso de un kit como el descrito con anterioridad en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, como un método para la detección, el diagnóstico o la monitorización de la endometriosis o de lesiones similares a la endometriosis en un sujeto; un método para predecir la presencia de lesiones similares a la endometriosis, un método para predecir el grado de endometriosis o para clasificar a un sujeto según el grado o fenotipo de endometriosis, tal como se describe en el presente documento; un método para la selección y tratamiento de un sujeto o un método para la selección de un sujeto y la realización de una prueba exploratoria (como una laparoscopia), tal como se describe en el presente documento con anterioridad.

Se contempla que cualquier característica descrita en el presente documento puede combinarse opcionalmente con cualquiera de las formas de realización de cualquier método, kit, uso de un kit o programa informático de la invención; y cualquier forma de realización discutida en esta memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquiera de ellas. Se entenderá que las formas de realización particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente se incorpora por referencia.

El uso de la palabra “un” o “una” puede significar “uno”, pero también es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “otro” también puede referirse a uno o más. El uso del término “o” en las reivindicaciones significa “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes.

Tal como se usan en la presente memoria descriptiva y en la(s) reivindicación/reivindicaciones, los términos “que

comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluir" e "incluye") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contener" y "contiene") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o etapas del método adicionales no mencionados. El término "comprende" también engloba y divulga expresamente los términos "consiste en" y "consiste esencialmente en". Tal como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación, excepto, por ejemplo, las impurezas normalmente asociadas con el elemento o la limitación.

El término "o sus combinaciones", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de estos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto entenderá que normalmente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que se deduzca lo contrario del contexto.

Tal como se usan en el presente documento, las palabras de aproximación como, sin limitación, "aproximadamente", "alrededor de", "aprox." se refieren a una condición que, cuando se modifica, se entiende que no es necesariamente absoluta o perfecta, pero que se consideraría lo suficientemente cercana para los expertos en la técnica como para justificar la designación de la condición como presente. La medida en que la descripción puede variar dependerá de la magnitud del cambio que pueda introducirse y de que un experto en la técnica reconozca que la característica modificada sigue teniendo las características y capacidades requeridas de la característica no modificada. En general, pero sujeto a la discusión precedente, un valor numérico modificado en el presente documento por una palabra de aproximación como "aproximadamente" puede variar del valor indicado en $\pm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ o 10% . Por consiguiente, el término "aproximadamente" puede significar el valor indicado $\pm 5 \%$ de su valor, preferentemente el valor indicado $\pm 2 \%$ de su valor, más preferentemente el término "aproximadamente" significa exactamente el valor indicado ($\pm 0 \%$).

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de ella.

Ejemplos

Ejemplo 1.— Evaluación de CA125, BDNF, péptido ZAG, glicodelina/PP14 en suero y plasma como biomarcadores de endometriosis.

En este estudio, se evaluó la capacidad de un panel de cuatro biomarcadores (CA125 (antígeno de cáncer 125), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), péptido ZAG (zinc- α -2-glicoproteína) y PP14 (glicodelina/proteína placentaria 14) en suero y en plasma para distinguir a las pacientes con endometriosis ($n = 137$) de los controles sanos ($n = 68$), con muestras tomadas de individuos residentes en el Reino Unido (resultado primario). Además, se examinó la asociación entre las concentraciones de biomarcadores y las características de las pacientes, y se realizó una comparación por pares de los niveles de biomarcadores en suero y plasma.

Materiales y métodos

Definición de casos y grupos de control.

Este estudio prospectivo se realizó con muestras de suero adquiridas en el Oxford Endometriosis CaRe Centre biobank (Reino Unido). El protocolo experimental fue aprobado por el comité ético CEIm HM Hospitales.

204 muestras de suero obtenidas de pacientes en edad reproductiva (18 – 50 años) con sospecha de endometriosis en las que la enfermedad ha sido confirmada o excluida mediante evaluación histológica de lesiones extirpadas durante la laparoscopia. Las pacientes fueron preclasificadas como controles y casos y anonimizadas en el biobanco: la clasificación de casos/controles se realizó basándose en la laparoscopia y la verificación histológica de glándulas endometriales y/o estromas en las lesiones extirpadas. Las pacientes se clasificaron como casos si la endometriosis se confirmaba mediante laparoscopia e histología, y como controles si la endometriosis no podía confirmarse mediante laparoscopia e histología. Se excluyó a las pacientes que habían tomado un tratamiento hormonal en los tres meses anteriores a la extracción de sangre. El análisis se realizó a ciegas respecto a los hallazgos quirúrgicos y de imagen. Las pacientes con endometriosis se estratificaron según la clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (rASRM). Las principales características de las pacientes incluidas en este estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas de las pacientes en la cohorte 1 del Oxford Endometriosis CaRe Centre

biobank.

	Controles N=68	Endometriosis N=136
Edad en años (media $\pm$ DE)	33,5 (5,96)	35,6 (6,42)
IMC (media $\pm$ DE)	25,38 (4,63)	26,46 (5,32)
Clasificación rASRM		
I-II	–	68 (50 %)
III-IV	–	68 (50 %)
Diagnóstico de control		

Nota. IMC= índice de masa corporal; rASRM = clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva.

Recogida, conservación y almacenamiento de las muestras

5 Las muestras se recogieron y manipularon siguiendo los procedimientos operativos estándar de la World Endometriosis Research Foundation (Rahmioglu *et al.* 2014) tras recibir el consentimiento de las pacientes. Se pidió a las pacientes que ayunaran durante al menos 10 horas antes de la extracción de sangre. Las muestras de suero se almacenaron en un biobanco a -80°C durante un máximo de 5 años y se trasladaron al lugar de análisis del laboratorio.

Determinación de la concentración de biomarcadores.

Los valores medios de concentración de los biomarcadores en las muestras biológicas aisladas de los casos y los controles se determinaron usando kits de ELISA comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Analito	Kit	Número de catálogo	Proveedor
BDNF total	ELISA en sándwich para BDNF ChemiKine™	CYT306	EMD (Merck) Millipore, Darmstadt, Alemania
CA125	ELISA para CA125 humano Quantikine®	DCA125	R&D Systems, Abingdon, R.U.
Glicodelina	ELISA para glicodelina	HUFI02772	ELISAGenie (Londres, Reino Unido)
ZAG	Kit de ELISA para ZAG humana	BMS2201	Thermo Fisher, Bleiswijk, Países Bajos

Tabla 1. Kits de ELISA usados para la determinación de BDNF total, CA125, glicodelina y ZAG

Métodos de análisis estadístico

20 La prueba U de Mann-Whitney no paramétrica bilateral, también conocida como prueba de suma de rangos de Wilcoxon, se implementó con la función wilcox.test del paquete stats. La hipótesis nula es que las distribuciones de los valores predictores de caso y los valores predictores de control difieren en un desplazamiento de localización de 0 (sin desplazamiento), con la alternativa de que difieren en un desplazamiento de localización distinto de 0. A partir de la estadística W (o U) resultante, se calcula un valor de p. La diferencia de localización representa la mediana estimada de las diferencias entre una muestra de caso y una muestra de control.

30 Para cada variable numérica (cuantitativa), se realizó una regresión logística univariante usando la función glm del paquete stats con la configuración predeterminada (familia = "binomial"). Con el modelo resultante, se calcularon las probabilidades de diagnóstico para cada punto de datos con la función predict, y el marco de datos resultante se aplicó a la función roc del paquete pROC para obtener los valores de sensibilidad ($TP/(TP + FN)$) y especificidad ($TN/(TN + FP)$) en un rango de valores umbral. Se obtuvieron los resultados verdaderos positivos (TP), verdaderos negativos (TN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), junto con el índice de Youden (sensibilidad + especificidad – 1), la precisión ($(TP + TN)/(TP + TN + FP + FN)$), la razón de verosimilitud positiva (sensibilidad/(1 – especificidad)) y negativa (especificidad/(1–sensibilidad)), la razón de probabilidades de diagnóstico ($(TP \times TN) / (FP \times FN)$), los valores predictivos positivos ($TP/(TP + FP)$) y negativos ($TN/(TN + FN)$), según las definiciones estándar. También se calcularon los valores predictivos basándose en una prevalencia real estimada del 24 % o del 50 % para

el diagnóstico positivo de endometriosis:

$$tPPV = \frac{tPrev \times Sensibilidad}{tPrev \times Sensibilidad + (1 - tPrev) \times (1 - Especificidad)}$$

$$tNPV = \frac{(1 - tPrev) \times Especificidad}{(1 - tPrev) \times Especificidad + tPrev \times (1 - Sensibilidad)}$$

5 Se trazó la curva de característica de receptor–operador (ROC) basada en la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1 – especificidad) a lo largo del espectro de valores umbral. El área bajo la curva ROC (AUC) se calculó usando la función auc del paquete pROC.

10 Los intervalos de confianza para las proporciones se obtuvieron con la función binom.confint del paquete binom, o aplicando la función diagnóstica del paquete ThresholdROC. Para las estimaciones de los intervalos de confianza tPPV y tNPV, el tamaño de la muestra se fijó en TP + FP y TN + FN, respectivamente.

15 Se realizó un análisis chi–cuadrado usando la función chisq.test (paquete stats) en variables categóricas para identificar una diferencia estadísticamente significativa por pares en el resultado de diagnóstico entre las categorías. En caso de datos categóricos ordenados, se utilizó la prueba de Cochran–Armitage, basada en la función CochranArmitageTest del paquete DescTools.

20 Para evaluar las asociaciones entre predictores, se utilizó el análisis chi–cuadrado (o la prueba de Cochran–Armitage) cuando se compararon dos variables categóricas, la prueba U de Mann–Whitney cuando se comparó una variable numérica con una categórica, y el coeficiente de correlación de Pearson (función cor del paquete stats) cuando se compararon dos variables numéricas.

25 Debido al gran número de comparaciones por pares (no independientes), los valores de p se ajustaron mediante la corrección de Benjamini–Hochberg para los análisis que incluían variables categóricas (frente a resultado, frente a variable numérica, frente a otra variable categórica), con correcciones para los valores de p agrupados por parámetro categórico.

30 Para evaluar si tanto el CA125 como el BDNF contribuyen de forma importante (con significación estadística) en un modelo de regresión logística para el diagnóstico de endometriosis, se aplicó la función glm del paquete stats con el CA125 y el BDNF transformados logarítmicamente como variables de entrada y el diagnóstico de endometriosis como resultado. A continuación, se utilizó la función step del paquete stats con la configuración predeterminada para evaluar si ambos parámetros contribuían de forma significativa al modelo.

35 Se utilizó la función glm del paquete stats para generar un modelo de regresión logística sin términos de interacción con las variables de entrada seleccionadas. Tras el entrenamiento, los modelos se probaron con los datos de prueba aislados usando la función predict y, posteriormente, se aplicó la función roc para analizar diferentes resultados de rendimiento (AUC, índice de Youden óptimo, precisión máxima, sensibilidad al 95 % de especificidad, especificidad al 95 % de sensibilidad).

40 El modelo final se creó incluyendo a todos los individuos para el desarrollo de un modelo de regresión logística. También se comunicaron los valores de las métricas de rendimiento asociadas.

Resultados

45 1.1. Resumen de datos y disponibilidad de datos (n)

General			
Parámetro	n	Parámetro	n
Estadio	204	Edad en la cirugía	204
Fecha de muestreo	204	Índice de masa corporal (IMC)	44

Biomarcadores			
Parámetro	n	Parámetro	n
CA125 en suero	203	CA125 en plasma	204
Glicodelina en suero	197	Glicodelina en plasma	202

BDNF en suero total	204	BDNF total en plasma	204
ZAG en suero	204	ZAG en plasma	204

Tratamiento hormonal			
Parámetro	<i>n</i>	Parámetro	<i>n</i>
Tratamiento hormonal (alguna vez)	176	Tipo: progestágeno inyectable	205
Edad de inicio del tratamiento	147	Tipo: danazol	205
Años acumulados de tratamiento	118	Tipo: píldora anticonceptiva (tipo desconocido)	205
Motivo: anticoncepción	187	Tipo: píldora sólo de progestágeno	205
Motivo: dolor pélvico crónico	187	Tipo: agonista de la GnRH	205
Motivo: ciclos irregulares	187	Tipo: DIU de progesterona	205
Motivo: ciclos abundantes	187	Tipo: anillo vaginal	205
Motivo: acné	138	Tipo: progestágeno oral	205
Motivo: síndrome de ovario poliquístico	187	Tipo: terapia hormonal sustitutiva	205
Motivo: quiste ovárico	138	Tipo: implante hormonal	205
Motivo: otros	187	Tipo: estrógeno incluido	205
Anticoncepción de emergencia (alguna vez)	136	Tipo: sólo progestágeno incluido	205
Número de tipos de tratamiento usados	205	Tipo: otros	205
Tipo: píldora anticonceptiva combinada	205	Tipo: desconocido	205

Tabla 2. –Resumen de datos y disponibilidad de datos (n)

1.2. Niveles de proteínas biomarcadoras en suero y plasma para casos y controles

En las FIG. 1 a 8 se resumen todos los datos de biomarcadores, agrupados según el resultado de una evaluación de diagnóstico de endometriosis (presencia [caso] o ausencia [control]).

1.3 Estudios de asociación

Se evaluó la asociación entre la concentración de estos 4 biomarcadores en suero y plasma. Los resultados se presentan en las FIG. 9 a 12.

Analito	Pendiente	IC de 95 %	Ordenada en el origen	IC de 95 %	R ² ajustado	Coefficiente de correlación de Pearson
CA125	1,02	1,01 – 1,02	0,787	0,446 – 1,13	0,999	0,999
Glicodelina	0,52	0,461 – 0,58	2,28	0,158 – 4,4	0,603	0,778
BDNF total	0,192	–0,06 – 0,444	20700	19800 – 21600	0,00603	0,105
ZAG	0,529	0,453 – 0,606	12600	9690 – 15600	0,476	0,692

Tabla 3. Niveles de biomarcadores en plasma frente a en suero

Se observó que la correlación entre el CA125 en plasma y el en suero era muy alta (0,999), lo que indica que la medición del CA125 no se ve afectada por el tipo de muestra. Para la glicodelina y la ZAG, la correlación fue alta (0,778 y 0,692, respectivamente), con valores que tienden a ser más bajos en suero, especialmente hacia las concentraciones más altas. En contraste con estos marcadores, no hubo correlación entre los niveles de BDNF total en suero y en plasma, con un coeficiente de correlación muy bajo (0,105). A partir de estas observaciones, está claro que el BDNF se ve afectado en mayor medida por el tipo de muestra, ya sea por diferencias de concentración dependientes del tipo de muestra o por la presencia de factores específicos del tipo de muestra que interfieren con la precisión.

1.4 Análisis estadístico de biomarcadores en casos frente a controles

Prueba U de Mann–Whitney

Analito	Clase 1	Clase 2	<i>W</i>	Valor de <i>p</i>	Diferencia de localización
CA125 en suero	Caso	Control	6342	5,72E–06	0,477
CA125 en plasma	Caso	Control	6339	1,62E–05	0,434
BDNF total en suero	Caso	Control	5450	0,0379	0,0794
Glicodelina en plasma	Caso	Control	5039	0,214	0,0532
ZAG en suero	Caso	Control	4196	0,282	–0,0231
BDNF total en plasma	Caso	Control	4469	0,696	–5,43E–05

ZAG en plasma	Caso	Control	4764	0,726	0,00804
Glicodelina en suero	Caso	Control	4407	0,89	7,06E-06

Tabla 4. Resultados de las pruebas U de Mann–Whitney de comparación de marcadores cuantitativos entre los grupos de casos y de controles. La diferencia de localización representa la mediana estimada de las diferencias entre una muestra de caso y una muestra de control. Los parámetros que fueron estadísticamente significativos (valor de $p \leq 0,05$) se destacan en negrita.

El grupo de casos de endometriosis presentaba un nivel medio significativamente superior de CA125 en suero, CA125 en plasma y BDNF total en suero, así como una mayor edad de inicio del dolor durante el coito y edad en la cirugía. No hubo diferencias estadísticas entre el nivel medio de ZAG y glicodelina (en plasma o suero) entre los grupos de casos y controles.

1.5 Modelos univariantes para el diagnóstico de la endometriosis

Se aplicó el análisis ROC para analizar diferentes resultados de rendimiento (AUC, índice de Youden óptimo, precisión máxima, sensibilidad al 95 % de especificidad, especificidad al 95 % de sensibilidad) e identificar los marcadores que presentaban un valor predictivo más elevado.

Parámetro	Índice de Youden	Sensibilidad	Especificidad	Precisión	AUC
CA125 en suero	0,356 (0,221 – 0,491)	0,64 (0,552 – 0,719)	0,716 (0,591 – 0,817)	0,665 (0,595 – 0,729)	0,696 (0,623 – 0,769)
CA125 en plasma	0,338 (0,201 – 0,475)	0,676 (0,59 – 0,753)	0,662 (0,536 – 0,769)	0,672 (0,602 – 0,735)	0,685 (0,611 – 0,759)
BDNF total en suero	0,199 (0,06 – 0,337)	0,757 (0,675 – 0,825)	0,441 (0,323 – 0,566)	0,652 (0,582 – 0,716)	0,589 (0,508 – 0,67)
BDNF total en plasma	0,169 (0,061 – 0,277)	0,287 (0,214 – 0,372)	0,882 (0,776 – 0,944)	0,485 (0,415 – 0,556)	0,517 (0,433 – 0,60)
ZAG en suero	0,147 (0,037 – 0,257)	0,279 (0,208 – 0,364)	0,868 (0,759 – 0,934)	0,475 (0,406 – 0,546)	0,546 (0,463 – 0,629)
Glicodelina en plasma	0,136 (–0,001 – 0,273)	0,754 (0,67 – 0,822)	0,382 (0,27 – 0,509)	0,629 (0,558 – 0,695)	0,553 (0,47 – 0,636)
ZAG en plasma	0,125 (–0,015 – 0,265)	0,463 (0,378 – 0,551)	0,662 (0,536 – 0,769)	0,529 (0,459 – 0,599)	0,515 (0,431 – 0,599)
Glicodelina en suero	0,062 (–0,085 – 0,209)	0,569 (0,48 – 0,655)	0,493 (0,37 – 0,616)	0,543 (0,471 – 0,614)	0,506 (0,421 – 0,591)

Tabla 5. – Resultados de rendimiento de cada biomarcador. Los resultados de AUC de los 4 biomarcadores proteicos en suero y plasma se destacan en negrita.

El CA125 en suero/plasma y el BDNF en suero tuvieron el mayor rendimiento de diagnóstico en la segregación entre casos y controles, basándose en el valor de AUC. La ZAG y la glicodelina mostraron un rendimiento bastante inferior. De acuerdo con los resultados del análisis estadístico mostrado con anterioridad, el rendimiento de diagnóstico del BDNF es significativamente mayor cuando el BDNF se mide en suero que en plasma.

Ejemplo 2.– Comparación entre los estudios del Reino Unido (R.U.), Canadá e Italia

Los resultados de los cuatro (4) biomarcadores del estudio en la población del Reino Unido descritos en el Ejemplo 1

se compararon con muestras de Italia (Ospedale San Raffaele).

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS (OSR)

5 Recogida de muestras:

El protocolo de recogida de datos y muestras biológicas se realizó en el marco del proyecto GWA sobre endometriosis. Se recogieron muestras de sangre de pacientes ingresadas para cirugía de endometriosis y se congelaron inmediatamente. Todos los exámenes hematoclinicos junto con los cuestionarios cumplimentados se anonimizaron usando el código de la paciente. Se recogieron datos de pacientes con endometriosis (n = 119) y controles sanos (n = 60).

Resultado	Estadio	Frecuencia	Proporción
Control	0	60	33,5 %
Caso	1-2	20	11,2 %
Caso	3-4	90	50,3 %
Caso	NA	9	5,0 %

Análisis de muestras:

Los datos se analizaron en el Laboratorio di Scienze Riproduttive Divisione di genetica e biologia cellulare. Los valores medios de concentración de los biomarcadores en las muestras biológicas aisladas de los casos y los controles se determinaron mediante kits de ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

Analito	Kit	Número de catálogo	Proveedor
BDNF total	Sistema de inmunoensayo para BDNF Emax®	G7610	Promega Milano
CA125	ELISA para CA125 humano Quantikine®	DCA125	R&D Systems, Abingdon, R.U.
Glicodelina	ELISA para glicodelina	BD-30-20	BIOSERV DIAGNOSTICS, Rostock, Alemania
ZAG	Kit de ELISA para ZAG humana	KA1689	Abnova, Taiwán.

Kits de ELISA usados para la determinación de BDNF total, CA125, glicodelina y ZAG

2.2. RESULTADOS

Comparación del rendimiento de los biomarcadores individuales en las distintas poblaciones

CA125

Fuente	Youden	AUC
Italia (suero)	0,472 (0,346 – 0,597)	0,785 (0,719 – 0,851)
Reino Unido (plasma)	0,338 (0,201 – 0,475)	0,685 (0,611 – 0,759)
Reino Unido (suero)	0,356 (0,221 – 0,491)	0,696 (0,623 – 0,769)

BDNF

Fuente	Youden	AUC
Italia (suero)	0,137 (-0,009 – 0,283)	0,547 (0,459 – 0,635)
Reino Unido (Plasma, Total)	0,169 (0,061 – 0,277)	0,517 (0,433 – 0,601)
Reino Unido (Serum, Total)	0,199 (0,06 – 0,337)	0,589 (0,508 – 0,67)

Glicodelina (PP14)

Fuente	Youden	AUC
Italia (suero)	0,162 (0,014 – 0,31)	0,558 (0,47 – 0,646)

Reino Unido (plasma)	0,136 (–0,001 – 0,273)	0,553 (0,47 – 0,636)
Reino Unido (suero)	0,062 (–0,085 – 0,209)	0,506 (0,421 – 0,591)

ZAG

Fuente	Youden	AUC
Italia (suero)	0,123 (0,027 – 0,218)	0,524 (0,433 – 0,615)
Reino Unido (plasma)	0,125 (–0,015 – 0,265)	0,515 (0,431 – 0,599)
Reino Unido (suero)	0,147 (0,037 – 0,257)	0,546 (0,463 – 0,629)

- 5 En el análisis univariante, el biomarcador con mejores resultados fue, con diferencia, el CA125 en el estudio realizado en Italia (Ospedale San Raffaele), con un AUC de 0,785. El AUC más alto para el BDNF se obtuvo en el estudio del Reino Unido (Oxford). Los datos ROC de la glicodelina y la ZAG en las poblaciones de estudio del Reino Unido e Italia no justifican su inclusión en el algoritmo para el diagnóstico de la endometriosis.

10 Ejemplo 3.– Identificación de predictores informativos para el diagnóstico de endometriosis

Los datos recogidos en el estudio de Oxford descrito en el Ejemplo 1 se analizaron más a fondo con el objetivo de identificar predictores cuantitativos y categóricos que pudieran usarse en un algoritmo para el diagnóstico de la endometriosis.

15 Materiales y métodos

Los materiales y los métodos descritos a continuación son similares a los descritos en el ejemplo 1 (misma muestra, mismos materiales y mismos métodos). Aquí solo se cuantifican BDNF y CA125, usando el conjunto de biomarcadores que se incluye en EndomKIT. Para completar, describimos el método de nuevo a continuación.

Definición de casos y grupos de control

25 Este estudio prospectivo se realizó con muestras de suero adquiridas en el Oxford Endometriosis CaRe Centre biobank (R.U.). El protocolo experimental fue aprobado por el comité ético CEIm HM Hospitales.

204 muestras de suero obtenidas de pacientes en edad reproductiva (18 – 50 años) con sospecha de endometriosis en las que la enfermedad ha sido confirmada o excluida mediante evaluación histológica de lesiones extirpadas durante la laparoscopia. Las pacientes fueron preclasificadas como controles y casos y anonimizadas en el biobanco: La clasificación de casos/controles se realizó basándose en la laparoscopia y la verificación histológica de glándulas endometriales y/o estroma en las lesiones extirpadas. Las pacientes se clasificaron como casos si la endometriosis se confirmaba mediante laparoscopia e histología, y como controles si la endometriosis no podía confirmarse mediante laparoscopia e histología. Se excluyó a las pacientes que habían tomado un tratamiento hormonal en los tres meses anteriores a la extracción de sangre. El análisis se realizó a ciegas respecto a los hallazgos quirúrgicos y de imagen. Las pacientes con endometriosis se estratificaron según la clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (rASRM). Las principales características de las pacientes incluidas en este estudio se muestran en la Tabla 1.

40 Tabla 1. Características demográficas de las pacientes en la Cohorte 1 del Oxford Endometriosis CaRe Centre biobank

	Controles N=68	Endometriosis N=136
Años de edad (media ± DE)	33,5 (5,96)	35,6 (6,42)
IMC (media ± DE)	25,38 (4,63)	26,46 (5,32)
Clasificación rASRM		
I–II	–	68 (50 %)
III–IV	–	68 (50 %)
Diagnóstico de control		

Nota. IMC= índice de masa corporal; rASRM= clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva.

Recogida, conservación y almacenamiento de muestras

Las muestras se recogieron y manipularon siguiendo los procedimientos operativos estándar de la World Endometriosis Research Foundation (Rahmioglu *et al.* 2014) tras recibir el consentimiento de las pacientes. Se pidió a las pacientes que ayunaran durante al menos 10 horas antes de la extracción de sangre. Las muestras de suero se almacenaron en un biobanco a –80 °C durante un máximo de 5 años y se trasladaron al lugar de análisis del laboratorio.

Determinación de la concentración de biomarcadores

Los valores medios de concentración de los biomarcadores en las muestras biológicas aisladas de sueros y controles se determinaron mediante kits de ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

Métodos de análisis estadístico

La prueba U de Mann–Whitney no paramétrica bilateral, también conocida como prueba de suma de rangos de Wilcoxon, se implementó con la función `wilcox.test` del paquete `stats`. La hipótesis nula es que las distribuciones de los valores predictores de caso y los valores predictores de control difieren en un desplazamiento de localización de 0 (sin desplazamiento), con la alternativa de que difieren en un desplazamiento de localización distinto de 0. A partir de la estadística W (o U) resultante, se calcula un valor de p. La diferencia de localización representa la mediana estimada de las diferencias entre una muestra de caso y una muestra de control.

Para cada variable numérica (cuantitativa), se realizó una regresión logística univariante usando la función `glm` del paquete `stats` con la configuración predeterminada (familia = “binomial”). Con el modelo resultante, se calcularon las probabilidades de diagnóstico para cada punto de datos con la función `predict`, y el marco de datos resultante se aplicó a la función `roc` del paquete `pROC` para obtener los valores de sensibilidad (TP/(TP + FN)) y especificidad (TN/(TN + FP)) en un rango de valores umbral. Se obtuvieron los resultados verdaderos positivos (TP), verdaderos negativos (TN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), junto con el índice de Youden (sensibilidad + especificidad – 1), la precisión ((TP + TN)/(TP + TN + FP + FN)), la razón de verosimilitud positiva (sensibilidad/(1 – especificidad)) y negativa (especificidad/(1–sensibilidad)), la razón de probabilidades de diagnóstico ((TP x TN) / (FP x FN)), los valores predictivos positivos (TP/(TP + FP)) y negativos (TN/(TN + FN)), según las definiciones estándar. También se calcularon los valores predictivos basándose en una prevalencia real estimada del 24 % o del 50 % para el diagnóstico positivo de endometriosis:

$$tPPV = \frac{tPrev \times Sensibilidad}{tPrev \times Sensibilidad + (1 - tPrev) \times (1 - Especificidad)}$$

$$tNPV = \frac{(1 - tPrev) \times Especificidad}{(1 - tPrev) \times Especificidad + tPrev \times (1 - Sensibilidad)}$$

Se trazó la curva de característica de receptor–operador (ROC) basada en la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1 – especificidad) a lo largo del espectro de valores umbral. El área bajo la curva ROC (AUC) se calculó usando la función `auc` del paquete `pROC`.

Los intervalos de confianza para las proporciones se obtuvieron con la función `binom.confint` del paquete `binom`, o aplicando la función de diagnóstico del paquete `ThresholdROC`. Para las estimaciones de los intervalos de confianza $tPPV$ y $tNPV$, el tamaño de la muestra se fijó en $TP + FP$ y $TN + FN$, respectivamente.

- 5 Se realizó un análisis chi-cuadrado usando la función `chisq.test` (paquete `stats`) en variables categóricas para identificar una diferencia estadísticamente significativa por pares en el resultado de diagnóstico entre las categorías. En caso de datos categóricos ordenados, se utilizó la prueba de Cochran–Armitage, basada en la función `CochranArmitageTest` del paquete `DescTools`.
- 10 Para evaluar las asociaciones entre predictores, se utilizó el análisis chi-cuadrado (o la prueba de Cochran–Armitage) cuando se compararon dos variables categóricas, la prueba U de Mann–Whitney cuando se comparó una variable numérica con una categórica, y el coeficiente de correlación de Pearson (función `cor` del paquete `stats`) cuando se compararon dos variables numéricas.
- 15 Debido al gran número de comparaciones por pares (no independientes), los valores de p se ajustaron mediante la corrección de Benjamini–Hochberg para los análisis que incluían variables categóricas (frente a resultado, frente a variable numérica, frente a otra variable categórica), con correcciones para los valores de p agrupados por parámetro categórico.
- 20 Para evaluar si tanto el CA125 como el BDNF contribuyen de forma importante (con significación estadística) en un modelo de regresión logística para el diagnóstico de endometriosis, se aplicó la función `glm` del paquete `stats` con el CA125 y el BDNF transformados logarítmicamente como variables de entrada y el diagnóstico de endometriosis como resultado. A continuación, se utilizó la función `step` del paquete `stats` con la configuración predeterminada para evaluar si ambos parámetros contribuían de forma significativa al modelo.
- 25 Se utilizó la función `glm` del paquete `stats` para generar un modelo de regresión logística sin términos de interacción con las variables de entrada seleccionadas. Tras el entrenamiento, los modelos se probaron con los datos de prueba aislados usando la función `predict` y, posteriormente, se aplicó la función `roc` para analizar diferentes resultados de rendimiento (AUC, índice de Youden óptimo, precisión máxima, sensibilidad al 95 % de especificidad, especificidad al 95 % de sensibilidad).
- 30 El modelo final se creó incluyendo a todos los individuos para el desarrollo de un modelo de regresión logística. También se comunicaron los valores de las métricas de rendimiento asociadas.

35 Datos del tratamiento hormonal

- Se consideró que los siguientes tipos de tratamiento contenían solo progestágeno/progesterona: píldora anticonceptiva con solo progestágeno, inyección de progestágeno, anillo vaginal (NuvaRing), espiral/DIU con progesterona, implante hormonal (Implanon/Nexplanon) y progestágeno oral. Se consideró que los siguientes tipos de tratamiento incluían estrógenos y progestágenos: píldora anticonceptiva combinada y terapia hormonal sustitutiva.
- 40

Intensidad del último dolor menstrual

- 45 Se agruparon los valores de 0 a 5 (“Dolor 0–5”; “Ninguno/Suave”), así como los valores de 6 a 10 (“Dolor 6–10”; “Moderado/Intenso”).

Frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses

- 50 Para la frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses, las respuestas “A veces”, “A menudo”, “La mayoría de las veces” y “Siempre” se agruparon en “Frecuente”, mientras que la respuesta “Nunca/raramente” pasó a denominarse “No frecuente”. Se supone que todos los pacientes que recibieron un cuestionario y que no indicaron la frecuencia no han experimentado ningún caso de heces más duras.

55 Resultados

3.1. Predictores numéricos con diferencias estadísticamente significativas entre los casos de endometriosis y los controles

- 60 Tabla: Prueba U de Mann–Whitney

Analito	Tamaño	Clase 1	Clase 2	U	Valor de p	Diferencia de localización
CA125	202	Caso	Control	6582	2,41E–07	8,500

Tiempo transcurrido entre los primeros síntomas de endometriosis y la cirugía	102	Caso	Control	1473,5	0,0010	6,000
BDNF	204	Caso	Control	5783,5	0,0035	2550
Edad de la primera experiencia de dolor durante el coito	89	Caso	Control	1201	0,0093	5,000
Edad de la primera experiencia de síntomas de quiste ovárico	49	Caso	Control	334,5	0,0233	7,000
Edad (en el momento de la cirugía)	204	Caso	Control	5514,5	0,0249	2,000
Edad de inicio del uso regular de ibuprofeno	53	Caso	Control	343,5	0,0384	7,000
Tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas de dolor menstrual y la cirugía	68	Caso	Control	490,5	0,0386	6,000
¿Qué edad tenía cuando le diagnosticaron endometriosis?	75	Caso	Control	516	0,0467	4,852

En el caso de los biomarcadores CA125 y BDNF, se halló una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de casos de endometriosis y de control. Los niveles más altos de CA125 y BDNF se asociaron significativamente con la endometriosis ($p < 10^{-4}$ y $p = 0,0035$, respectivamente). Las medianas de algunos otros predictores numéricos también fueron significativamente mayores en el grupo de casos (todos $p < 0,05$), todos ellos relacionados con la edad.

3.2. Análisis de sensibilidad/especificidad para biomarcadores

Las curvas de características del receptor–operador (ROC) para los biomarcadores CA125 y BDNF se muestran en las Figuras 13 A y B, respectivamente.

Parámetro	Índice de Youden	Sensibilidad	Especificidad	Precisión	AUC
CA125	0,361 (0,237 – 0,485)	0,537 (0,449 – 0,623)	0,824 (0,708 – 0,902)	0,634 (0,563 – 0,699)	0,722 (0,652 – 0,792)
BDNF	0,272 (0,167 – 0,377)	0,360 (0,281 – 0,448)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,544 (0,473 – 0,613)	0,625 (0,547 – 0,704)

Los valores del área bajo la curva (AUC) para el CA125 y el BDNF son 0,722 y 0,625, respectivamente, lo que indica una correlación moderada con la endometriosis. En el valor de corte óptimo, determinado por el índice de Youden, se encontró una sensibilidad del 53,7 % para el CA125, con una especificidad del 82,4 %. Para el BDNF, la sensibilidad es del 36,0 %, con una especificidad del 91,2 % en el índice de Youden óptimo.

3.3. Predictores categóricos con diferencias estadísticamente significativas entre los casos de endometriosis y los controles

Pruebas de Chi–cuadrado y Cochran–Armitage

Predictor	Prueba	Valor de p (ajustado)	Tamaño	Clase	Caso	Control	Caso (%)	Control (%)
Cirugía previa por endometriosis	Chi–cuadrado	3,70E–07	196	Sí	71	7	54,6	10,6
				No	59	59	45,4	89,4
Diagnóstico previo de endometriosis	Chi–cuadrado	1,92E–06	139	Sí	67	12	74,4	24,5
				No	23	37	25,6	75,5
Períodos dolorosos como síntoma de endometriosis	Chi–cuadrado	7,00E–06	191	Sí	94	25	76,4	36,8
				No	29	43	23,6	63,2
Intensidad de dolor de último ciclo menstrual	Chi–cuadrado	<0,01*	191	No/ moderado	27	36	22,0	52,9

				Moderado / intenso	96	32	78,0	47,1
Intensidad de dolor de ciclo menstrual en general (escala)	Cochran–Armitage	0,031	138	Escala 1	0	2	0	4,1
				Escala 2	5	10	5,6	20,4
				Escala 3	31	18	34,8	36,7
				Escala 4	53	19	59,6	38,8
Diagnóstico previo de endometriosis por un ginecólogo después de cirugía	Chi–cuadrado	0,033	49	Sí	11	16	35,5	88,9
				No	20	2	64,5	11,1
Implante hormonal	Chi–cuadrado	0,048	191	Sí	3	11	2,4	16,2
				No	120	57	97,6	83,8
Frecuencia de heces más duras durante el dolor del período en los últimos 3 meses	Chi–cuadrado	<0,05**	191	Común	46	9	37,4	13,2
				No frecuente	77	59	62,6	86,8

*Esta prueba se realizó por separado de las demás pruebas. El valor de p no ajustado fue de 2,66E–05, lo que situaría el valor de p ajustado de Benjamini–Hochberg por debajo de 0,01.

**Esta prueba se realizó por separado de las demás pruebas. El valor de p no ajustado fue de 0,00077, lo que situaría el valor de p ajustado de Benjamini–Hochberg por debajo de 0,05.

La tabla anterior muestra que varios parámetros de las pacientes están asociados con el estado de la endometriosis. Lo más significativo es que una historia previa de endometriosis o una cirugía para examinar la endometriosis es más frecuente entre las pacientes con un diagnóstico positivo de endometriosis actual. Las reglas dolorosas como síntoma de endometriosis también se asocian a un diagnóstico positivo con una fuerte significación estadística. Otros parámetros con un valor de p inferior a 0,05 son la intensidad del dolor del ciclo menstrual en general, la intensidad del dolor del último ciclo menstrual, el uso de implante hormonal y la frecuencia de heces más duras durante el dolor menstrual en los últimos 3 meses.

3.4. Selección de predictores para el diagnóstico de endometriosis en el análisis multivariante

Aunque los datos perdidos pueden estimarse mediante imputación, se usó un umbral del 10 % para cada predictor como proporción máxima de datos perdidos para la imputación. Además, dado que muchos predictores tienen una componente temporal, varios de ellos mostraron una correlación con la edad en el momento de la cirugía, ya fuera basada en el coeficiente de correlación de Pearson (para predictores numéricos) o mediante el análisis *U* de Mann–Whitney (para predictores categóricos binarios) o Kruskal–Wallis (para predictores categóricos multiclase). Como resultado, los predictores con un número significativo de puntos de datos perdidos, con una correlación significativa con la edad en el momento de la cirugía o una asociación significativa con otro predictor candidato (con una asociación más significativa con la endometriosis) fueron excluidos para el análisis multivariante:

Analito	Tamaño	Correlación con la edad en el momento de la cirugía
Edad de la primera experiencia de dolor durante el coito	89	0,634
Edad de la primera experiencia de síntomas de quiste ovárico	49	0,857
Edad de inicio del uso regular de ibuprofeno	53	0,547
Tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas de dolor menstrual y la cirugía	68	0,508
¿Qué edad tenía cuando le diagnosticaron endometriosis?	75	0,762
Tiempo transcurrido entre el primer síntoma de endometriosis y la cirugía	102	0,429
Diagnóstico previo de endometriosis	139	6,29E-13 ¹
Intensidad del dolor del ciclo menstrual en general	138	0,00666 ²
Diagnóstico previo de endometriosis por un ginecólogo después de la cirugía	49	0,000195 ¹

1: Registro de cirugía previa por endometriosis; 2: Tiempo transcurrido entre los primeros síntomas y la cirugía; 3: Edad en el momento de la cirugía.

Todos los participantes en el estudio se sometieron a cirugía, un componente necesario del desarrollo del algoritmo para proporcionar el verdadero estado clínico de cada participante. Dado que todas las variables de entrada del algoritmo se han recogido inmediatamente antes de la cirugía planificada, todas ellas están correlacionadas con este acontecimiento. En este sentido, como variable, la edad se define como "edad en el momento de la cirugía". Para el algoritmo de diagnóstico que se está desarrollando, por edad debe entenderse la edad durante la cual se evalúa al individuo para un posible diagnóstico de endometriosis, no necesariamente seguida de cirugía.

La variable "períodos dolorosos como síntoma de cirugía planificada", está explícitamente correlacionada con la cirugía planificada. Dado que se supone que la componente temporal afecta a todas las variables de la misma manera, para el algoritmo en desarrollo, esta variable debe entenderse como el dolor menstrual que sufre la persona durante su evaluación para un posible diagnóstico de endometriosis, no necesariamente seguido de cirugía. Por lo tanto, esta variable se redefine como "períodos dolorosos como uno de los síntomas que han dado lugar al examen actual en busca de endometriosis".

Del resto de variables candidatas, la edad, el dolor pélvico crónico como propósito del tratamiento hormonal y la intensidad del peor dolor durante el último período menstrual no se tuvieron en cuenta basándose en evaluaciones previas con estos parámetros, que mostraron que no formaban parte de las combinaciones de variables de entrada más óptimas (datos no mostrados). Basándose en todas las consideraciones anteriores, se seleccionaron los siguientes predictores como variables de entrada candidatas para el análisis multivariante para el diagnóstico de endometriosis:

- CA125 en suero
- BDNF en suero
- Registro de cirugía previa por endometriosis
- Períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis (cirugía planificada)
- Uso de implantes hormonales
- Frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses.

Además, los siguientes parámetros siguen siendo de interés, pero carecen del tamaño de muestra necesario para considerarlos en el modelo multivariante (para los parámetros de dolor durante el coito, quiste ovárico e ibuprofeno) o porque no fueron un factor independiente relevante en los análisis multivariantes preliminares (para el parámetro de intensidad del dolor menstrual):

- Edad de la primera experiencia de dolor durante el coito
- Edad a la primera experiencia de síntomas de quiste ovárico
- Intensidad del dolor menstrual la última vez (1-10)

- Edad de inicio del consumo de ibuprofeno

Estos parámetros podrán evaluarse en futuras encuestas, y las respuestas de las mismas podrán usarse para actualizar el modelo de diagnóstico multivariante.

Ejemplo 4.–La combinación de los biomarcadores CA-125 y BDNF en suero con una o más de las variables clínicas seleccionadas da lugar a una mejora de la sensibilidad y del valor de diagnóstico

Los inventores realizaron además un análisis ROC para investigar el rendimiento del CA125 y el BDNF, solos (Tabla 6) y cuando se combinan con algunas de las variables clínicas identificadas en el Ejemplo 3 como asociadas a la presencia de endometriosis.

A modo de ejemplo, los resultados de la combinación de los biomarcadores CA125 y BDNF determinados en suero como se ha descrito en el presente documento con anterioridad junto con dos o más de las siguientes variables relacionadas con los antecedentes y/o las características clínicas del sujeto se proporcionan en la Tabla 7):

- registro de cirugía previa por endometriosis
- períodos dolorosos como síntoma para el examen de endometriosis;
- uso de implantes hormonales; y
- frecuencia de heces más duras en caso de dolor menstrual en los últimos 3 meses.

La combinación de los biomarcadores CA125 y BDNF con al menos dos de las variables clínicas identificadas por los inventores como significativamente asociadas con la endometriosis en el Ejemplo 3 aumentó significativamente la sensibilidad y el rendimiento de diagnóstico de la prueba de diagnóstico en cuanto a AUC.

Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF)					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,471 (0,385 – 0,558)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,382 (0,275 – 0,49)	0,618 (0,547 – 0,684)	0,745 (0,678 – 0,812)
Especificidad > 0,95	0,397 (0,315 – 0,485)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,353 (0,257 – 0,449)	0,583 (0,512 – 0,651)	0,745 (0,678 – 0,812)
Índice máximo de Youden	0,551 (0,464 – 0,636)	0,868 (0,759 – 0,934)	0,419 (0,303 – 0,535)	0,657 (0,587 – 0,721)	0,745 (0,678 – 0,812)

Tabla 6: rendimiento del modelo que combina CA125 y BDNF

Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Cirugía, Implante hormonal					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,669 (0,583 – 0,746)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,581 (0,477 – 0,685)	0,75 (0,684 – 0,807)	0,842 (0,789 – 0,895)
Especificidad > 0,95	0,566 (0,479 – 0,65)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,522 (0,426 – 0,619)	0,696 (0,627 – 0,757)	0,842 (0,789 – 0,895)
Índice máximo de Youden	0,713 (0,628 – 0,786)	0,897 (0,793 – 0,954)	0,61 (0,505 – 0,715)	0,775 (0,71 – 0,829)	0,842 (0,789 – 0,895)
Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Cirugía, Frecuencia de deposiciones más duras					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC

Especificidad > 0,9	0,654 (0,567 – 0,732)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,566 (0,462 – 0,671)	0,74 (0,673 – 0,798)	0,832 (0,778 – 0,886)
Especificidad > 0,95	0,566 (0,479 – 0,65)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,522 (0,426 – 0,619)	0,696 (0,627 – 0,757)	0,832 (0,778 – 0,886)
Índice máximo de Youden	0,743 (0,659 – 0,812)	0,882 (0,776 – 0,944)	0,625 (0,519 – 0,731)	0,789 (0,726 – 0,842)	0,832 (0,778 – 0,886)
Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Períodos dolorosos, Implante hormonal					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,559 (0,471 – 0,643)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,471 (0,363 – 0,578)	0,676 (0,607 – 0,739)	0,849 (0,798 – 0,900)
Especificidad > 0,95	0,529 (0,442 – 0,615)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,485 (0,388 – 0,582)	0,672 (0,602 – 0,735)	0,849 (0,798 – 0,900)
Índice máximo de Youden	0,816 (0,739 – 0,875)	0,794 (0,675 – 0,879)	0,61 (0,494 – 0,726)	0,809 (0,747 – 0,859)	0,849 (0,798 – 0,900)
Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Períodos dolorosos, Frecuencia de deposiciones más duras					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,559 (0,471 – 0,643)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,471 (0,363 – 0,578)	0,676 (0,607 – 0,739)	0,840 (0,787 – 0,893)
Especificidad > 0,95	0,375 (0,295 – 0,462)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,331 (0,236 – 0,426)	0,569 (0,498 – 0,637)	0,840 (0,787 – 0,893)
Índice máximo de Youden	0,86 (0,788 – 0,912)	0,706 (0,581 – 0,807)	0,566 (0,443 – 0,689)	0,809 (0,747 – 0,859)	0,840 (0,787 – 0,893)
Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Implante hormonal, Frecuencia de deposiciones más duras					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,515 (0,428 – 0,601)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,426 (0,319 – 0,534)	0,647 (0,577 – 0,712)	0,803 (0,744 – 0,862)
Especificidad > 0,95	0,441 (0,357 – 0,529)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,397 (0,3 – 0,494)	0,613 (0,542 – 0,679)	0,803 (0,744 – 0,862)
Índice máximo de Youden	0,706 (0,621 – 0,779)	0,794 (0,675 – 0,879)	0,5 (0,377 – 0,623)	0,735 (0,668 – 0,793)	0,803 (0,744 – 0,862)

Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Cirugía, Períodos dolorosos					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,603 (0,515 – 0,685)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,515 (0,408 – 0,621)	0,706 (0,637 – 0,766)	0,867 (0,819 – 0,915)
Especificidad > 0,95	0,515 (0,428 – 0,601)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,471 (0,373 – 0,568)	0,662 (0,592 – 0,725)	0,867 (0,819 – 0,915)
Índice máximo de Youden	0,882 (0,813 – 0,929)	0,706 (0,581 – 0,807)	0,588 (0,467 – 0,709)	0,824 (0,763 – 0,872)	0,867 (0,819 – 0,915)
Modelo basado en biomarcadores (CA125, BDNF), Cirugía, Implante hormonal, Períodos dolorosos, Frecuencia de deposiciones más duras					
	Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	Precisión	AUC
Especificidad > 0,9	0,669 (0,583 – 0,746)	0,912 (0,811 – 0,964)	0,581 (0,477 – 0,685)	0,75 (0,684 – 0,807)	0,883 (0,838 – 0,928)
Especificidad > 0,95	0,632 (0,545 – 0,712)	0,956 (0,868 – 0,989)	0,588 (0,494 – 0,683)	0,74 (0,673 – 0,798)	0,883 (0,838 – 0,928)
Índice máximo de Youden	0,897 (0,83 – 0,94)	0,721 (0,597 – 0,819)	0,618 (0,499 – 0,736)	0,838 (0,779 – 0,885)	0,883 (0,838 – 0,928)

Tabla 7: rendimiento de un modelo que combina CA125 y BDNF con un conjunto de 2 o más de las variables clínicas seleccionadas con anterioridad

5 Bibliografía

- Johnson N.P. (2013). Consensus on current Management of endometriosis. *Hum. Reprod.* **2013**, 28(6), 1552–1568.
- Zondervan, K.T. (2018). *Endometriosis. Nat. Rev. Dis. Primer* **2018**, 4, 9.
- Zondervan, K.T. (2020). Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* **2020**, 382, 1244–1256.
- Vigano P. (2004). Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2004**, 18:177–200.
- Somigliana E. (2006). Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol. Oncol* **2006**, 101(2): 331–341
- Sinaii N. (2002). High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum. Reprod.* **2002**, 17(10), 2715–2724.
- Agarwal, S. K., Chapron, C., Giudice, L. C., Laufer, M. R., Leyland, N., Missmer, S. A., ... & Taylor, H. S. (2019). Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action. *American journal of obstetrics and gynecology*, 220(4), 354–e1.
- Becker, C. (2022) ESHRE guideline: endometriosis. *Human Reproduction Open*, **2022**, 2, 1–26.
- Dunselman, G.J. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum. Reprod. Oxf.*

Engl. **2014**, 29, 400–412 (2014).

- 5 - Ling, F.W. (1999) Randomized controlled trial of depot leuprolide in patients with chronic pelvic pain and clinically suspected endometriosis. Pelvic Pain Study Group. *Obstet. Gynecol.* **1999**, 93, 51–58.
- Jenkins, T.R (2008). Does response to hormonal therapy predict presence or absence of endometriosis? *J. Minim. Invasive Gynecol.* **2008**, 15, 82–86.
- 10 - Ahn SH, Singh V, Tayade C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertil Steril.* **2017**;107(3):523–532.
- Nisenblat, V. (2016a) Combination of the non–invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, 7, CD012281.
- 15 - Nisenblat, V. (2016b) Blood biomarkers for the non–invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, 5, Art. No.: CD012179.
- Polacchini A, *et al.* (2015) A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays. *Sci Rep.* 10 Dic. **2015**; 5:17989.
- 20 - Lee SY, Koo YJ, Lee DH. Classification of endometriosis. *Yeungnam Univ J Med. Ene.* 2021;38(1):10–18
- Keckstein J, Saridogan E, Ulrich UA, Sillem M, Oppelt P, Schweppe KW, Krentel H, Janschek E, Exacoustos C, Malzoni M, Mueller M, Roman H, Condous G, Forman A, Jansen FW, Bokor A, Simedrea V, Hudelist G. The #Enzian classification: A comprehensive non–invasive and surgical description system for endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* Jul. 2021;100(7):1165–1175.
- 25 - Capezzuoli *et al.*: Classification/staging systems for endometriosis: the state of the art; *Gynecological and Reproductive Endocrinology and Metabolism* 2020; 1(1):14–22.
- 30 - Kitawaki J, Ishihara H, Koshiba H, Kiyomizu M, Teramoto M, Kitaoka Y, Honjo H. Usefulness and limits of CA–125 in diagnosis of endometriosis without associated ovarian endometriomas. *Hum Reprod.* Jul. 2005;20(7):1999–2003
- 35 - Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC Jr, Scaetzi E, Kistner RW and Knapp RC (1986) Elevated serum concentrations of CA–125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 45,630–634.