

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 007**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02721122 .6**

96 Fecha de presentación: **20.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1362124**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **MÉTODOS Y SONDAS PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:
20.02.2001 US 270271 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.01.2012

73 Titular/es:
**VYSIS, INC.
3100 WOODCREEK DRIVE
DOWNERS GROVE, ILLINOIS 60515, US y
MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH**

72 Inventor/es:
**MORRISON, Larry, E.;
SOKOLOVA, Irina, A.;
SEELIG, Steven, A. y
HALLING, Kevin, C.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

ES 2 372 007 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos y sondas para la detección del cáncer

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos y sondas para la detección del cáncer.

Antecedentes de la invención

10

El cáncer de pulmón es la causa de muerte principal debida al cáncer en los Estados Unidos, acabando cada año con la vida de aproximadamente 156.000 hombres y mujeres. Existen cuatro tipos principales de células de carcinoma broncogénico que representan más del 95% de cánceres de pulmón primarios: adenocarcinoma; carcinoma de células escamosas; carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas. Estos tipos de células se producen individualmente o en combinación. El 5% restante de tumores se compone de diversos tipos de tumores inusuales.

15

Cuando se desarrolla cáncer de pulmón, este tiende a extenderse desde el sitio original del cáncer hacia los nódulos linfáticos, y después, al mismo tiempo o secuencialmente, hacia otras zonas del cuerpo. Los sitios más comunes de extensión del cáncer de pulmón (metástasis) son el cerebro, los huesos, el hígado, las glándulas adrenales y cualquier otro órgano con una elevada tasa de flujo sanguíneo. Este es el proceso de metástasis que, en la mayoría de los pacientes, conduce a la muerte.

20

Cuando en un primer reconocimiento médico o mediante ensayos diagnóstico (por ejemplo, rayos X o formación de imágenes de alta resolución tal como TC espiral), se descubre un cáncer, este tiene normalmente un tamaño de al menos 1 cm. Un cáncer que tiene un tamaño de 1 cm contiene al menos aproximadamente 1 billón de células.

25

En el ADN cromosómico se han observado cambios que acompañan la conversión de células normales en células malignas. Debido a esto, la detección de modificaciones cromosómicas específicas proporciona una vía para detectar y diagnosticar cáncer de pulmón.

30

Sumario de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que, para detectar el cáncer de pulmón con altos niveles de sensibilidad, pueden usarse sondas y conjuntos de sondas específicas. Usando las sondas descritas en este documento, el cáncer de pulmón puede detectarse con una sensibilidad potenciada en comparación con los métodos convencionales. Por consiguiente, las sondas y los métodos de la invención facilitan la detección del cáncer de pulmón y/o permiten la detección del cáncer de pulmón en etapas precoces. La invención incluye conjuntos de sondas, métodos para el uso de sondas y conjuntos de sondas y métodos para seleccionar conjuntos de sondas para la detección del cáncer.

35

En un aspecto, la descripción presenta conjuntos de sondas cromosómicas que incluyen cualquiera de las siguientes combinaciones de dos sondas: (a) una sonda del brazo del cromosoma 5p y una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda específica del locus 8q24, una sonda del brazo del cromosoma 3q, una sonda del brazo del cromosoma 20q, una sonda específica del locus 7p12, una sonda de enumeración del cromosoma 16, una sonda de enumeración del cromosoma 4, una sonda de enumeración del cromosoma 12, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda específica del locus 17q21; (b) una sonda específica del locus 8q24 y una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda de enumeración del cromosoma 17, una sonda de enumeración del cromosoma 1 y una sonda de enumeración del cromosoma 6; (c) una sonda específica del locus 7p12 y una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda del brazo del cromosoma 3q y una sonda de enumeración del cromosoma 6; (d) una sonda del brazo del cromosoma 3q y una sonda de enumeración del cromosoma 7; o (e) una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda de enumeración del cromosoma 7.

45

50

A las dos sondas puede incorporarse un resto de detección. El resto de detección puede contener una marca fluorescente. Las dos sondas pueden acoplarse opcionalmente a diferentes restos de detección. Por ejemplo, los restos de detección pueden contener marcas fluorescentes.

55

En otro aspecto, la descripción presenta un conjunto de sondas cromosómicas que incluye cualquiera de las siguientes combinaciones de tres sondas: (a) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24 y una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda específica del locus 9p21, una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 6, una sonda específica del locus 7p12 y una sonda específica del locus 17q21; (b) una sonda específica del locus 5p15, una sonda de enumeración del cromosoma 12 y una sonda específica del locus 9p21; (c) una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 17 y una sonda específica del locus 9p21; (d) una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 1 y una sonda específica del locus 9p21; o (e) una sonda específica del locus 5p15, una sonda del brazo del cromosoma 3q y una sonda de enumeración del cromosoma 12.

60

65

En otro aspecto, la descripción presenta un conjunto de sondas cromosómicas que incluyen cualquiera de las siguientes

- combinaciones de cuatro sondas: (a) una sonda específica del locus 5p15, una sonda de enumeración del cromosoma 6, una sonda específica del locus 17p13 y una sonda de enumeración del cromosoma 17; (b) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 1 y una sonda específica del locus 7p12; (c) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda del brazo del cromosoma 3q y una sonda específica del locus 7p12; (d) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda del brazo del cromosoma 20q y una sonda específica del locus 7p12; (e) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda específica del locus 7p12, y una sonda específica del locus 17q21; (f) una sonda específica del locus 5p115, una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda específica del locus 7p12; (g) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda de enumeración del cromosoma 1; (h) una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda de enumeración del cromosoma 12; (i) una sonda específica del locus 5p15, una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda de enumeración del cromosoma 12; (j) una sonda de enumeración del cromosoma 7, una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda de enumeración del cromosoma 12; o (k) una sonda del brazo del cromosoma 5p, una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda de enumeración del cromosoma 7. El conjunto de sondas que define la invención se detalla en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.
- En algunas realizaciones de los conjuntos de sondas descritos en este documento, un conjunto que contiene, por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro sondas, puede usar una sonda del brazo de cromosoma 5p en lugar de una sonda específica del locus 5p15. En otras realizaciones el conjunto de sondas descrito en este documento, puede usarse una sonda del brazo del cromosoma 7p en lugar de una sonda específica del locus 7p12.
- En otro aspecto, la descripción presenta un método para explorar cáncer de pulmón en un sujeto, incluyendo el método las etapas de: (a) obtener una muestra biológica del sujeto; (b) obtener un conjunto de al menos dos sondas cromosómicas diferentes, por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro sondas, de un conjunto descrito en el presente documento; (c) poner en contacto el conjunto de sondas con la muestra biológica en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas en el conjunto con los cromosomas en la muestra, si hubiera; y (d) detectar el patrón de hibridación del conjunto de sondas cromosómicas para la muestra biológica para determinar si el sujeto presenta cáncer de pulmón.
- Las sondas usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden seleccionarse del grupo que consiste en una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 3, una sonda de enumeración del cromosoma 4, una sonda de enumeración del cromosoma 6, una sonda de enumeración del cromosoma 7, una sonda de enumeración del cromosoma 8, una sonda de enumeración del cromosoma 9, una sonda de enumeración del cromosoma 10, una sonda de enumeración del cromosoma 11, una sonda de enumeración del cromosoma 12, una sonda de enumeración del cromosoma 16, una sonda de enumeración del cromosoma 17, una sonda de enumeración del cromosoma 18, una sonda específica del locus 3p14, una sonda específica del locus 3q26, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 5q31, una sonda específica del locus 5p12, una sonda específica del locus 8q24, una sonda específica del locus 9p21, una sonda específica del locus 10q23, una sonda específica del locus 13q14, una sonda específica del locus 17p13, una sonda específica del locus 17q21, una sonda específica del locus 20q13, una sonda específica del locus 21q22, una sonda del brazo del cromosoma 3q, una zona del brazo del cromosoma 5p, una sonda del brazo del cromosoma 7p, una sonda del brazo del cromosoma 3p y una sonda del brazo del cromosoma 20q.
- La muestra biológica usada en los métodos descritos en el presente documento puede contener un espécimen bronquial, una biopsia de pulmón o una muestra de esputo. Opcionalmente, las sondas cromosómicas usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden marcarse con fluorescencia. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir adicionalmente realizar análisis citológico en la muestra.
- En otro aspecto, la descripción presenta un método para explorar cáncer de pulmón en un sujeto, incluyendo el método las etapas de (a) obtener una muestra biológica del sujeto; (b) obtener una sonda cromosómica seleccionada del grupo que consiste en una sonda específica del locus 5p15, una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 8q24, y una sonda de enumeración del cromosoma 9; (c) poner en contacto la sonda cromosómica con la muestra biológica en condiciones suficientes para permitir la hibridación de la sonda con los cromosomas en la muestra, si hubiera y (d) detectar el patrón de hibridación de la sonda para la muestra biológica para determinar si el sujeto presenta cáncer de pulmón.
- En otro aspecto, la invención presenta un método para seleccionar una combinación de sondas para la detección de cáncer, incluyendo el método las etapas de (a) proporcionar una primera pluralidad de sondas cromosómicas; (b) determinar la capacidad de cada una de la primera pluralidad de sondas para diferenciar especímenes de cáncer de especímenes normales; (c) seleccionar aquellas sondas en la primera pluralidad de sondas que identifiquen especímenes de cáncer en comparación con los especímenes normales para producir una segunda pluralidad de sondas, en la que cada sonda de la segunda pluralidad identifica los especímenes de cáncer en comparación con los especímenes normales a un valor de p menor de 0,01 o a un valor de vector menor de 0,500; (d) determinar la

capacidad de una combinación de sondas seleccionada de la segunda pluralidad de sondas para diferenciar los especímenes de cáncer de los especímenes normales y (e) seleccionar una combinación de sondas que identifique el espécimen de cáncer en comparación con el espécimen normal con un valor de vector menor de 0,400.

5 En una realización, los especímenes de cáncer son especímenes de cáncer de pulmón. Por ejemplo, los especímenes pueden derivar de pacientes a los que se les ha diagnosticado cáncer de pulmón. Los especímenes normales pueden ser especímenes de tejido de pulmón derivados de pacientes a los que no se les ha diagnosticado cáncer de pulmón.

10 En una realización, la etapa (c) del método incluye seleccionar aquellas sondas dentro de la primera pluralidad de sondas que identifiquen los especímenes de cáncer en comparación con los especímenes normales para obtener una segunda pluralidad de sondas, en la que cada segunda pluralidad de sondas identifica los especímenes de cáncer en comparación con los especímenes normales a un valor de p menor de 0,005 ó 0,001 y/o a un valor de vector menor de 0,400, 0,300, 0,200 ó 0,100.

15 En otra realización, la etapa (e) del método incluye seleccionar una combinación de sondas que identifique el espécimen de cáncer en comparación con el espécimen normal con un valor de vector menor de 0,300, 0,200 ó 0,100.

20 En otro aspecto, la descripción presenta un conjunto de sondas cromosómicas que incluye al menos dos sondas diferentes, en el que el conjunto de sondas puede detectar cáncer de pulmón con una sensibilidad de al menos aproximadamente un 60%, cuando se ensaya, por ejemplo, en una población que contiene al menos 35 pacientes con cáncer de pulmón.

25 En un ejemplo, el conjunto contiene al menos tres sondas diferentes. En otro ejemplo, el conjunto contiene al menos cuatro sondas diferentes.

30 En un ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con una sensibilidad de al menos aproximadamente un 60% a un valor de límite de aproximadamente un 10%. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con una sensibilidad de al menos aproximadamente un 70% cuando la detección se realiza en una muestra biológica que contiene un espécimen bronquial. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con una sensibilidad de al menos aproximadamente un 80% a un valor de límite de aproximadamente un 20%.

35 Las sondas cromosómicas incluidas en los conjuntos descritos en este documento, por ejemplo, conjuntos de al menos dos, tres o cuatro sondas diferentes, pueden seleccionarse del grupo que consiste en una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 3, una sonda de enumeración del cromosoma 4, una sonda de enumeración del cromosoma 6, una sonda de enumeración del cromosoma 7, una sonda de enumeración del cromosoma 8, una sonda de enumeración del cromosoma 9, una sonda de enumeración del cromosoma 10, una sonda de enumeración del cromosoma 11, una sonda de enumeración del cromosoma 12, una sonda de enumeración del cromosoma 16, una sonda de enumeración del cromosoma 17, una sonda de enumeración del cromosoma 18, una sonda específica del locus 3p14, una sonda específica del locus 3q26, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 5q31, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 8q24, una sonda específica del locus 9p21, una sonda específica del locus 10q23, una sonda específica del locus 13q14, una sonda específica del locus 17p13, una sonda específica del locus 17q21, una sonda específica del locus 20q13, una sonda específica del locus 21q22, una sonda del brazo del cromosoma 3q, una sonda del brazo del cromosoma 5p, una sonda del brazo del cromosoma 7p, una sonda del brazo del cromosoma 3p y una sonda del brazo del cromosoma 20q.

45 En otro aspecto, la descripción presenta un conjunto de sondas cromosómicas que incluye al menos dos sondas diferentes, en el que el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor vector de menor de 0,500, cuando se ensaya, por ejemplo, en una población que contiene al menos 35 pacientes con cáncer de pulmón y 20 individuos normales.

50 En un ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,500 a un valor de límite de aproximadamente un 10%. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,400. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,400 a un valor de límite de aproximadamente un 15%. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,300. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,300 a un valor de límite de aproximadamente un 15%. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,200. En otro ejemplo, el conjunto puede detectar cáncer de pulmón con un valor de vector menor de 0,200 a un valor de límite de aproximadamente un 20%.

60 Las al menos dos sondas diferentes del conjunto pueden seleccionarse del grupo que consiste en una sonda de enumeración del cromosoma 1, una sonda de enumeración del cromosoma 3, una sonda de enumeración del cromosoma 4, una sonda de enumeración del cromosoma 6, una sonda de enumeración del cromosoma 7, una sonda de enumeración del cromosoma 8, una sonda de enumeración del cromosoma 9, una sonda del cromosoma número 10, una sonda del cromosoma número 11, una sonda del cromosoma número 12, una sonda de enumeración del cromosoma 16, una sonda de enumeración del cromosoma 17, una sonda de enumeración del cromosoma 18, una sonda específica del locus 3p14, una sonda específica del locus 3q26, una sonda específica del locus 5p15, una sonda

específica del locus 3q31, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 8q24, una sonda específica del locus 9p21, una sonda específica del locus 10q23, una sonda específica del locus 13q14, una sonda específica del locus 17p13, una sonda específica del locus 17q21, una sonda específica del locus 20q13, una sonda específica del locus 21q22, una sonda del brazo del cromosoma 3q, una zona del brazo del cromosoma 5p, una sonda del brazo del cromosoma 7p, una sonda del brazo del cromosoma 3p y una sonda del brazo del cromosoma 20q.

Una ventaja de la invención es que permite la detección de cáncer de pulmón con sensibilidad mejorada, en comparación con métodos convencionales tales como citología. Estas sondas y métodos pueden por tanto permitir la detección precoz del cáncer de pulmón, por ejemplo, a una etapa pre-invasiva.

Otra ventaja de la invención es que permite la detección de células cancerosas basándose en modificaciones genéticas, en lugar de evidentes cambios morfológicos en la estructura celular. Las modificaciones genéticas pueden detectarse en una fase temprana, por ejemplo antes de que aparezcan cambios visualmente detectables en la estructura celular.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comúnmente entendido por los expertos habituales en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la realización práctica o en el ensayo de la invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de producirse un conflicto en cuanto a la terminología, la presente memoria descriptiva lo controlará. Además, los materiales y métodos descritos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa una curva característica operativa del receptor (ROC, acrónimo de las siglas en inglés) derivada de análisis FISH de especímenes de pacientes positivos y negativos a cáncer. La sensibilidad (eje y) y especificidad (eje x; 1 - especificidad) se representan para valores de límite que varían de 1 a 10 células por espécimen.

Descripción detallada de la invención

La invención incluye conjuntos de sondas y métodos para usar sondas y conjuntos de sondas para la detección de cáncer de pulmón. Las sondas y los métodos descritos en el presente documento permiten la detección rápida y sensible del cáncer de pulmón en una muestra biológica, tal como un espécimen bronquial, una biopsia de pulmón o una muestra de esputo. Además, la invención incluye procedimientos de selección de conjuntos de sondas para la detección del cáncer.

Sondas cromosómicas

Las sondas adecuadas para hibridación *in situ* se incluyen en tres amplios grupos: sondas de enumeración de cromosomas, que se hibridan con una región cromosómica e indican la presencia o ausencia de un cromosoma; sondas de brazos de cromosomas, que se hibridan con una región cromosómica e indican la presencia o ausencia de un brazo de un cromosoma; y sondas específicas de locus, que se hibridan con un locus específico sobre un cromosoma y detectan la presencia o ausencia de un locus específico. Las sondas cromosómicas y sus combinaciones se seleccionan para determinar sensibilidad y/o especificidad cuando se usan en métodos para detección del cáncer de pulmón. Los conjuntos de sondas pueden incluir cualquier número de sondas, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 sondas.

Una sonda de enumeración de cromosoma puede hibridarse con una secuencia repetitiva, localizada cerca o eliminada de un centrómero o puede hibridarse con una secuencia única localizada en cualquier posición sobre un cromosoma. Por ejemplo, una sonda de enumeración de cromosoma puede hibridarse con ADN repetitivo asociado con el centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de los cromosomas de primates contiene una familia compleja de largas repeticiones de ADN en tándem, formadas por una longitud de repeticiones monoméricas de aproximadamente 171 pares de bases, que se denominan ADN satélite-alfa. Los ejemplos no limitantes de sondas de enumeración de cromosoma incluyen sondas para los cromosomas 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17 y 18. En la Tabla 1 del Ejemplo 1 se describen ejemplos de diversas sondas de enumeración de cromosomas específicas y sus respectivas regiones diana.

Una sonda de un brazo de un cromosoma puede hibridarse con una secuencia repetitiva o única localizada sobre un brazo, el brazo corto o largo de un cromosoma determinado. La ganancia o pérdida de la secuencia con la que se hibrida la sonda del brazo del cromosoma puede usarse para indicar la ganancia o pérdida del brazo. Los ejemplos no limitantes de sondas de brazos de cromosomas incluyen sondas para los brazos de los cromosomas 3q, 5p, 7p, 3p y 20q. En la Tabla I se describen ejemplos de sondas de brazos de cromosomas específicas y sus respectivas regiones diana.

Una sonda específica de locus se hibrida con un locus específico, no repetitivo sobre un cromosoma. Los ejemplos no limitantes de sondas específicas de locus incluyen sondas para los siguientes locus: 3p14; 3q26; 5p15; 5q31; 7p12; 8q24; 9p21; 10q23; 13q14; 17p13; 17q21; 20q13 y 21q22. Algunos de estos locus comprenden genes, por ejemplo, oncogenes y genes supresores tumorales, que se modifican en algunas formas de cáncer. Por lo tanto, en los métodos de detección descritos en el presente documento, pueden usarse sondas que dirigen estos genes, exones, intrones o secuencias reguladoras de los genes. Los ejemplos de genes diana incluyen: FHIT (3p14); EGR1 (3q31); EGFR1 (7p12); c-MYC (8q24); PTEN (10q23); RB (13q14); P53 (17p13) y HER-2/neu (17q21).

Las sondas cromosómicas pueden tener cualquier tamaño, pero típicamente tienen aproximadamente una longitud de 50 a aproximadamente 5×10^5 nucleótidos. Las sondas microsomaes pueden comprender secuencias repetidas, por ejemplo, fragmentos de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Las sondas que se hibridan con ADN centromérico y con locus cromosómicos específicos se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, procedentes de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, Or) o de Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Como alternativa, las sondas pueden prepararse de manera no comercial a partir de ADN cromosómico o genómico mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden usarse fuentes de ADN que incluyan ADN genómico, secuencias de ADN clonado, tales como, un cromosoma artificial bacteriano (BAC, acrónimo de las siglas en inglés), híbridos de células somáticas que contienen un, o una parte de un, cromosoma humano junto con el complemento cromosómico normal del hospedador y cromosomas purificados por citometría de flujo o microdissección. La región de interés, por ejemplo una región diana indicada en la Tabla 1, puede aislarse mediante clonación o por amplificación específica de sitio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Nath y Johnson, Biotechnic Histochem., 1998, 73(1): 6-22; Wheelless et al., Cytometry, 1994, 17:319-326; y la Patente de Estados Unidos N° 5.491.224.

Las sondas cromosómicas pueden contener un resto de detección que facilite la detección de la sonda cuando se hibrida con un cromosoma. Los ejemplos de restos de detección incluyen marcadores directos e indirectos, como se describe a continuación.

Las sondas cromosómicas pueden marcarse directamente con un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen fluoróforos, moléculas orgánicas que son fluorescentes después de absorber luz menor longitud de onda/mayor energía e isótopos radioactivos, por ejemplo, ^{32}P y ^3H . Un fluoróforo puede permitir que una sonda se visualice sin una molécula de detección secundaria. Por ejemplo, después de unir covalentemente un fluoróforo a un nucleótido, el nucleótido puede incorporarse directamente en la sonda con técnicas convencionales tales como marcado por relleno, unión al azar y marcaje por PCR. Como alternativa, dentro de la sonda, con un conector pueden transaminarse nucleótidos de desoxicitidina. Después el fluoróforo se une covalentemente a los nucleótidos de desoxicitidina transaminados. Véase, la Patente de Estados Unidos N° 5.491.224.

Son ejemplos de fluoróforos que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento los siguientes: ácido 7-amino-4-metilcoumarina-3-acético (AMCA), Texas Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(y-6)-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-(y-6)-carboxifluoresceína; fluoresceín-5-isotiocianato (FITC); ácido 7-dietilaminocoumarin-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-(y-6)-isotiocianato; 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina; ácido 7-hidroxycoumarin-3-carboxílico; ácido 6-[fluoresceín 5-(y-6)-carboxamido]hexanóico; ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a diaza-3-indacenopropiónico; enosin-5-isotiocianato; eritrosin-5-isotiocianato; y acetilazida azul Cascade™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

En métodos que usan sondas múltiples, pueden seleccionarse fluoróforos de diferentes colores de manera que cada sonda cromosómica en el conjunto pueda visualizarse claramente. Como alternativa, en un conjunto pueden marcarse dos o más sondas con el mismo fluoróforo o similar. Las sondas pueden observarse con un microscopio de fluorescencia y un filtro apropiado para cada fluoróforo o usando conjuntos dobles o triples de filtros de pase de banda para observar fluoróforos múltiples. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 5.776.688. Como alternativa, para examinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas pueden usarse técnicas, tales como, citometría de flujo.

Las sondas también pueden marcarse indirectamente, por ejemplo, con biotina o digoxigenina, aunque para visualizar las sondas marcadas se requieren moléculas de detección secundarias o procesamiento posterior. Por ejemplo, una sonda marcada con biotina puede detectarse mediante avidina conjugada con un marcador detectable, por ejemplo un fluoróforo. Adicionalmente, la avidina puede conjugarse con un marcador enzimático, tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Los marcadores enzimáticos pueden detectarse en reacciones colorimétricas convencionales usando un sustrato para la enzima. Los sustratos para la fosfatasa alcalina incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio. Para la peroxidasa de rábano picante puede usarse diaminobenzoato.

Hibridación *in situ*

La presencia o ausencia de células con aberraciones cromosómicas se determina por hibridación *in situ*. Las células con aberraciones cromosómicas tienen, por ejemplo, un número anómalo de cromosomas y/o tienen modificaciones estructurales cromosómicas tales como ganancia o pérdida (por ejemplo, pérdida hemicigota u homocigota) de una región cromosómica específica, tal como un locus o un brazo cromosómico como se indica en la Tabla 1. Por ejemplo,

una célula que tiene una o más ganancias cromosómicas, por ejemplo, tres o más copias de cualquier cromosoma determinado, puede considerarse positiva en el ensayo en los métodos descritos en este documento. Las células que muestran monosomía y nulisomía también pueden considerarse positivas en el ensayo en determinadas circunstancias. En general, la hibridación *in situ* incluye las etapas de fijar una muestra biológica, hibridar una sonda cromosómica con un ADN diana incluido dentro de la muestra biológica fijada, lavar para eliminar la unión no específica y detectar la sonda hibridada.

Una "sonda biológica" es una muestra que contiene células o material celular, por ejemplo células o material celular derivado de estructuras pulmonares, incluyendo, aunque sin limitación, parénquima pulmonar, bronquiolos, secreciones bronquiales, bronquios y tráquea. Los ejemplos no limitantes de muestras biológicas útiles para la detección de cáncer de pulmón incluyen especímenes bronquiales, biopsias de pulmón y muestras de esputo. Los ejemplos de especímenes bronquiales incluyen secreciones, abluciones, lavados, aspiraciones y cepillados bronquiales. Las biopsias de pulmón pueden obtenerse por métodos que incluyen cirugía, broncoscopia y biopsia transtorácica con aguja. En un ejemplo, pueden prepararse improntas de biopsias de pulmón.

Además, las muestras biológicas pueden incluir derrames, por ejemplo derrames pleurales, derrames pericárdicos o derrames peritoneales. Además, las muestras biológicas pueden incluir células o material celular derivado de tejidos en los que normalmente metastatizan cánceres de pulmón. Estos tejidos incluyen, por ejemplo, nódulos linfáticos, sangre, cerebro, huesos, hígado y glándulas adrenales. Por tanto, las sondas y conjuntos de sondas descritos en este documento pueden usarse para detectar cáncer de pulmón y metástasis de cáncer de pulmón.

Típicamente, las células se extraen de una muestra biológica y se preparan usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células pueden extraerse centrifugando una muestra biológica, tal como un lavado bronquial, y resuspendiendo las células sedimentadas. Típicamente, las células se resuspenden en solución salina tamponada con fosfato (PBS, siglas en inglés). Después de centrifugar la suspensión celular para obtener un sedimento celular, las células pueden fijarse, por ejemplo, en soluciones de alcohol ácido, soluciones de acetona ácida o aldehídos tales como formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído. Por ejemplo, como fijador puede usarse un fijador que contenga metanol y ácido acético congelado en una proporción 3:1, respectivamente, puede usarse como un fijante. También puede usarse una solución de formalina tamponada neutra e incluye aproximadamente del 1% al 10% de formaldehído al 37-40% en una solución acuosa de fosfato de sodio. Pueden prepararse portaobjetos que contengan células eliminando la mayor cantidad de fijador, dejando las células concentradas suspendidas solamente en una parte de la solución. La suspensión celular se aplica a los portaobjetos de manera que las células no se superpongan sobre el portaobjetos. La densidad puede medirse mediante un microscopio de contraste de fase u óptico.

Antes de la hibridación *in situ*, las sondas cromosómicas y el ADN cromosómico incluido en cada célula se desnaturalizan. La desnaturalización de la sonda no es precisa si las sondas cromosómicas se preparan como un ácido nucleico monocatenario. La desnaturalización se realiza típicamente incubando en presencia pH elevado, calor (por ejemplo temperaturas de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 95 °C), disolventes orgánicos tales como formamida y haluros de tetraalquilamonio o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el ADN cromosómico puede desnaturalizarse mediante una combinación de temperaturas por encima de 70 °C (por ejemplo, de aproximadamente 73 °C) y un tampón de desnaturalización que contenga formamida al 70% y 2X SSC (cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M). Las condiciones de desnaturalización se establecen típicamente de manera que se conserve la morfología celular. Por ejemplo, las sondas cromosómicas pueden desnaturalizarse por calor, por ejemplo calentando las sondas a aproximadamente 73 °C durante aproximadamente cinco minutos.

Después de eliminar los productos químicos o condiciones desnaturalizantes, las sondas se hibridan con el ADN cromosómico en condiciones de hibridación. Las "condiciones de hibridación" son condiciones que facilitan la hibridación entre una sonda y ADN cromosómico diana. Las condiciones de hibridación varían, dependiendo de las concentraciones, de las composiciones de base, complejidades y longitudes de las sondas, así como de las concentraciones salinas, temperaturas y duración de la incubación. Por ejemplo, las hibridaciones *in situ* se realizan típicamente en un tampón de hibridación que contiene 1-2X SSC, formamida al 50-55%, un acelerador de hibridación (por ejemplo, sulfato de dextrano al 10%) y ADN bloqueante para suprimir la hibridación no específica. En general, las condiciones de hibridación, como se ha descrito anteriormente, incluyen temperaturas de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 55 °C, y los tiempos de incubación de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 95 horas. Más particularmente, la hibridación puede realizarse aproximadamente de 32 °C a aproximadamente 45 °C durante aproximadamente de 2 horas a aproximadamente 16 horas.

La unión no específica de sondas cromosómicas al ADN fuera de la región diana puede eliminarse mediante diversos lavados. La temperatura y la concentración de sal de cada lavado dependen de la rigurosidad deseada. Por ejemplo, para condiciones altamente rigurosas, los lavados pueden realizarse de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 80 °C, usando de 0,2X a aproximadamente 2X de SSC y aproximadamente del 0,1% a aproximadamente el 1% de un detergente no iónico tal como Nonidet P-40 (NP40). La rigurosidad puede reducirse disminuyendo la temperatura de los lavados o aumentando la concentración de sal en los lavados.

Detección de anomalías cromosómicas

La ganancia o pérdida de cromosomas o regiones cromosómicas dentro de una célula se ensaya examinando en la célula el patrón de hibridación de la sonda cromosómica o conjunto de sondas cromosómicas (por ejemplo el número de señales de cada sonda) y registrando el número de señales. En un ensayo típico, el patrón de hibridación se evalúa en una pluralidad de células, por ejemplo, aproximadamente 25-5000 células.

Las muestras que contienen una pluralidad de células, por ejemplo al menos aproximadamente 100, de las cuales 1 o más, por ejemplo, al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ó 20 son células "positivas en el ensayo" típicamente se consideran positivas al cáncer. La expresión "positivas en el ensayo" significa poseer la ganancia o la pérdida de un cromosoma, brazo cromosómico o locus como se describe en el presente documento. Los criterios para "positivas en el ensayo" pueden incluir ensayo positivo con una, dos, tres, cuatro o más sondas. Además, la expresión "positivas en el ensayo" puede incluir realizar un análisis de hibridación con sondas múltiples, por ejemplo, cuatro sondas y detectar patrones de hibridación anómalos con un subconjunto de las sondas, por ejemplo, al menos dos o tres sondas.

Una muestra que contiene células, por ejemplo células dispuestas sobre una superficie plana tal como un portaobjetos, puede evaluarse mediante una diversidad de métodos y usando una diversidad de criterios. Las sondas y métodos descritos en el presente documento no se limitan al uso con una metodología de exploración particular. Por ejemplo, en lo que se conoce como el "método de escaneo", el observador escanea de cientos a miles de células para detectar anomalías citológicas (como se observa con un filtro DAPI). El número de células evaluadas depende de la celularidad del espécimen, que varía de un paciente a otro. Las anomalías citológicas normalmente pero no invariablemente asociadas con células neoplásicas incluyen aumento nuclear, irregularidad nuclear y tinción DAPI anómala (frecuentemente moteada y poco intensa). En el método de escaneo, el observador orienta principalmente la evaluación de las células para determinar anomalías cromosómicas (como se demuestra por FISH) en las células que también muestran anomalías citológicas. Además, puede evaluarse una parte de las células que no presente anomalías citológicas evidentes, ya que las anomalías cromosómicas se producen en ausencia de anomalías citológicas. El método de escaneo se describe más detalladamente en la Patente de Estados Unidos N° 6.174.681, cuyo contenido se incorpora por referencia.

Exploración, control y diagnóstico de pacientes para detectar cáncer de pulmón

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para explorar individuos para la detección de cáncer de pulmón o para controlar a pacientes a los que se les ha diagnosticado cáncer de pulmón. Por ejemplo, en un modo de exploración, se exploran individuos con riesgo de padecer cáncer de pulmón, tales como fumadores o individuos crónicamente expuestos al humo del tabaco, o individuos crónicamente expuestos al amianto, con objeto de detectar precozmente cáncer de pulmón. Además, las sondas y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para el diagnóstico de pacientes sintomáticos. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en solitario o junto con otros ensayos. Por ejemplo, un paciente que está en riesgo de padecer cáncer de pulmón puede explorarse para detectar cáncer de pulmón realizando hibridación *in situ*, como se describe en este documento, junto con otros ensayos convencionales tales como análisis de formación de imágenes por ejemplo, TC, TC espiral y análisis por rayos X y/o citología. Como alternativa, en primer lugar, en un paciente pueden realizarse métodos convencionales y si el ensayo convencional proporciona resultados erróneos o negativos, entonces puede realizarse un método descrito en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para seleccionar una terapia para un paciente al que se le ha diagnosticado cáncer de pulmón. Los métodos pueden por tanto diagnosticar, de manera simultánea, un cáncer de pulmón y proporcionar información útil en cuanto a posibles tratamientos para el cáncer. Diversas de las sondas descritas en el presente documento se dirigen a oncogenes y genes supresores tumorales. Si se detecta que uno o más de estos genes están modificados en el transcurso de una determinación en la que un paciente tiene cáncer, entonces esta información puede usarse para seleccionar una terapia, por ejemplo, una terapia que module (aumente o disminuya) la presencia o actividad de estos genes y/o sus productos proteicos. Por ejemplo, si se descubre una modificación del locus 17q21, entonces esta información se usaría para diseñar una terapia basada en Her-2 (véase, por ejemplo, Cragg y col., Curr. Opin. Immunol., 1999,11:541 -547). En la Tabla 1 se indican locus que contienen oncogenes y genes supresores tumorales específicos.

Métodos de selección de sondas

La selección de sondas individuales y conjuntos de sondas puede realizarse usando los principios descritos en los ejemplos. Estos métodos de selección usan análisis discriminativos y/o combinatoriales para seleccionar sondas y conjuntos de sondas que sean útiles para la detección de cáncer de pulmón con elevada sensibilidad.

Los métodos descritos en el presente documento tienen preferiblemente una sensibilidad y especificidad combinadas que es mejor que la de los métodos convencionales, particularmente para la detección precoz del cáncer de pulmón. Como se describe en los ejemplos, se hibridaron 26 sondas cromosómicas con 27 especímenes diferentes de tumor de pulmón y 12 especímenes de tejido adyacente normal y se midió el grado de ganancia y pérdida de cada diana. Para analizar estos datos y seleccionar los conjuntos de sondas más útiles, se desarrollaron diversas normas que, cuando se

consideraron en combinación, produjeron conjuntos de sondas que tenían una sensibilidad y especificidad elevadas. Cada norma no es definitiva pero indica preferencias generales que se contrastan contra las otras normas para obtener conjuntos de sondas de funcionamiento óptimo.

(1) Cada sonda seleccionada para un conjunto de sondas debe tener una capacidad por sí misma para discriminar entre tejido tumoral y normal. Se prefieren sondas con elevadas capacidades de discriminación. Los análisis de discriminación usan dos estrategias diferentes: (a) comparar las medias y desviaciones típicas entre el conjunto de especímenes tumorales y el conjunto de especímenes tumorales adyacentes del porcentaje de células con ganancia y pérdida diana para cada una de las dianas sonda y (b) calcular la sensibilidad y especificidad de cada sonda individualmente para identificar los especímenes tumorales y los especímenes tumorales adyacentes normales, para diversos valores límite de los porcentajes de células para ganancias y pérdidas diana. Para evaluar la estrategia (a) pueden generarse distintos tipos de mediciones, que incluyen el cálculo del V. D. (valor discriminativo), de la D. T. M. (desviación típica en el "punto medio"), y del valor de p. El V. D. y el valor de p son métodos generalmente aceptados para evaluación. La importancia de la D.T.M es que es el valor límite, como un múltiplo de las desviaciones típicas procedentes de las medias del tumor y normales, al cual la sensibilidad igualaría la especificidad si las medias y las desviaciones típicas igualasen realmente los valores verdaderos de las dos poblaciones. Por ejemplo, si el punto medio fuese una desviación típica de los especímenes tumorales de la media de los especímenes tumorales y una desviación típica de los especímenes adyacentes normales de la media de los especímenes adyacentes normales, entonces la sensibilidad y la especificidad serían cada una igual al 84% (esto también presupone distribuciones normales-erróneas para cada población, que es menos probable que sea cierto para las distribuciones de tejido adyacente normal debido a su proximidad a 0). Cuanto mayor es la D. T. M. mayor es la sensibilidad y especificidad de esa sonda.

(2) La medida principal para la sensibilidad y especificidad combinadas será la cantidad denominada "vector" que es la magnitud del vector trazada entre los puntos en un gráfico de sensibilidad frente a especificidad que representa el ideal (sensibilidad = especificidad = 1) y la sensibilidad y especificidad medidas. Por lo tanto, el valor de vector varía desde 0 para el caso ideal y 1,414 para el peor de los casos.

(3) Cada sonda seleccionada para un conjunto de sondas debe complementar las otras sondas seleccionadas, es decir, debe identificar especímenes tumorales adicionales que la otra sonda (o sondas) no pueden identificar. Un método para identificar el conjunto de sondas que mejor complementa es tomar la sonda con el valor de vector inferior, eliminar el grupo de especímenes tumorales que esta identificó del conjunto completo de especímenes tumorales y después determinar la sonda con el valor de vector más bajo en los restantes especímenes tumorales. Este proceso puede continuar, según sea necesario, para completar el conjunto de sondas. La estrategia seleccionada en este documento para generar todas las posibles combinaciones de sondas y calcular la sensibilidad y especificidad de cada una, predice la realización de todos los posibles conjuntos de sondas y permite la selección del conjunto de sondas mínimo con las mayores características de realización. Además, se obtiene una diversidad de combinaciones con características de realización similarmente altas. Considerando los posibles errores debido al número finito de especímenes ensayados, basándose en otras características prácticas, tales como relevancia de pronóstico de la enfermedad o dificultad para preparar la sonda, pueden compararse diversas de las combinaciones de sondas de alta categoría.

(4) La capacidad de las sondas para complementar otras sondas es más importante que la capacidad discriminativa de las sondas individuales, salvo como se indica en (5) a continuación.

(5) Independientemente de la capacidad medida para complementar otras sondas, cada sonda debe identificar un porcentaje estadísticamente diferente de células positivas al ensayo entre los conjuntos de especímenes de tejido tumoral y adyacente normal. Si no se cumple esta condición podría seleccionarse una sonda erróneamente basándose en la complementación evidente.

(6) Los datos para combinaciones de dos sondas son más fiables que los datos para combinaciones de tres sondas y los datos para combinaciones de tres sondas son más fiables que los datos para combinaciones de cuatro sondas. Esto es consecuencia de la capacidad reducida para hacer correlaciones entre un mayor número de sondas con el número finito de especímenes ensayados.

(7). La dependencia de realización de la sonda y de la combinación de sondas debe considerarse como una función de valor límite. El "valor límite" se refiere al porcentaje de células en una población que debe tener ganancias o pérdidas para que la muestra se considere positiva. Por lo tanto, una muestra se denomina positiva o negativa dependiendo de si el porcentaje de células en la muestra está por encima del valor límite o es igual o inferior al valor límite.

En general, la especificidad y sensibilidad combinadas de las sondas es mejor a valores límite inferiores. Sin embargo, cuando las células cancerosas se distribuyen dentro de una matriz que contiene muchas células normales, tales como secreciones bronquiales o esputo, las sondas que funcionan mejor a valores límite elevados son más susceptibles de detectar. Esto es porque el buen funcionamiento a valores límite elevados indica un mayor predominio de células que contienen la anomalía. Los ejemplos de valores límite que pueden usarse en los

cálculos incluyen aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% y 60%.

(8) La medición de ganancia diana se favorece sobre la medición de pérdida diana. El solapamiento de dianas o una mala hibridación con algunas células pueden sugerir monosomía en falso. Las sondas específicas de locus o de brazos cromosómicos diseñadas para detectar deleciones son generalmente mas pequeñas que las sondas específicas de locus o de brazos cromosómicos diseñadas para detectar ganancia ya que las sondas de deleción no deben extenderse más allá de la región mínimamente delecionada. Si demasiadas “sondas de deleción” se extienden más allá de la secuencia delecionada, puede quedar suficiente señal para un conteo falso. Dado que las “sondas de deleción” se mantienen normalmente pequeñas, las señales no son tan intensas como las señales para dianas típicamente ganadas. Esto a su vez hace que sea más probable que las señales reales de dianas a controlar para deleción puedan contarse erróneamente. Del mismo modo, se prefieren sondas de secuencia repetitiva, como algunas sondas de enumeración de cromosomas usadas en este documento, a sondas de locus sencillo porque normalmente proporcionan señales más brillantes y se hibridan más rápido que las sondas específicas de locus. Por otro lado, las sondas de secuencia repetitiva son más sensibles a polimorfismo que las sondas específicas de locus.

(9) Una sonda o combinación de sondas preferiblemente presenta una mejora sobre los métodos convencionales tales como citología.

Preferiblemente, una sonda o combinación de sondas detecta cáncer de pulmón con una sensibilidad de al menos aproximadamente el 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso el 100%. Preferiblemente, una sonda o combinación de sondas detecta cáncer de pulmón con un valor de vector de menos de aproximadamente 0,500, 0,450, 0,400, 0,350, 0,300, 0,250, 0,200, 0,150 o 0,100.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: selección de sondas

Como candidato para detectar anomalías cromosómicas en cáncer de pulmón por hibridación *in situ* se reunió un grupo de 26 sondas. Las sondas se hibridaron con un grupo de improntas de tumor de pulmón y se determinó la distribución del número de copias por célula de cada sonda diana. Para conservar especímenes tumorales, se usaron hibridaciones multicolor para limitar a 8 el número de regiones de hibridación por espécimen. Para conseguir esto, las 26 sondas se marcaron con varios fluoróforos diferentes. Se prepararon mezclas de cada 3 o 4 sondas a partir de las sondas marcadas formando los 8 conjuntos de sondas. Cuando fué posible, las sondas de enumeración de cromosomas y las sondas específicas de locus que dirigían el mismo cromosoma se combinaron en el mismo conjunto para diferenciar la aneuploidía del cromosoma completo a partir de ganancias y pérdidas de regiones dentro de un cromosoma.

Las 26 sondas seleccionadas para hibridación con improntas de pulmón se describen en la Tabla 1. Las sondas incluyen 13 sondas de enumeración de cromosoma (sondas CEP™ de Vysis, Inc.; que dirigen secuencias centroméricas repetitivas) y 13 sondas específicas de locus (LSI™ de Vysis, Inc. o preparaciones de BAC; que dirigen secuencias únicas asociadas con regiones cromosómicas amplificadas o delecionadas). La columna 3 de la Tabla 1 describe la localización de la diana de cada una de las 26 sondas. Para varias de las sondas, también se enumeran oncogenes o genes supresores tumorales que se localizan en el locus pertinente.

Para formar los 8 conjuntos de sondas, se prepararon mezclas de 3 sondas, marcadas con SpectrumAqua™, SpectrumGreen y SpectrumOrange™ o 4 sondas, marcadas con SpectrumAqua™, SpectrumGreen™, SpectrumGold™ y SpectrumRed™. En las columnas 4 y 5, respectivamente, de la Tabla 1, se describe el marcador fluorescente usado para cada sonda y el conjunto de sondas que contiene cada sonda.

Para ensayar las 26 sondas, se usaron improntas de tumor, preparadas de tumores de pulmón extraídas de 27 pacientes con una serie de cánceres de pulmón. Además, también se ensayaron especímenes preparados de tejido de pulmón normal generalmente a cierta distancia de los tumores (NAL = tejido de pulmón normal adyacente) de doce de los mismos pacientes para examinar los niveles de fondo de dianas ganadas y pérdidas por cada sonda. En la Tabla 2 se enumeran las características de los especímenes de tumor de pulmón y normales. Se prepararon improntas presionando un trozo de tumor de pulmón o tejido adyacente normal contra un portaobjetos de vidrio del microscopio y se fijaron brevemente en etanol. Después, los especímenes se conservaron a -20°C hasta el momento del uso.

Antes de la hibridación *in situ*, las improntas se trataron para mejorar la realización de la hibridación *in situ* mediante el siguiente protocolo:

(1) Fijar el portaobjetos con el espécimen en una solución de Carnoy reciente (3:1 metanol:ácido acético) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Dejar secar el portaobjetos al aire.

(2) Colocar el portaobjetos sobre una placa caliente a 45 °C durante 15 minutos.

(3) Incubar el portaobjetos en 2xSSC a 37 °C durante 10 minutos.

(4) Colocar el portaobjetos en una solución de pepsina (0,05 mg de pepsina por ml de HCl 10 mM) a 37 °C durante 13 minutos. La solución de pepsina se prepara reciente cada día diluyendo 25 µl de una solución madre de pepsina (100 mg de pepsina/ml de agua; se usa 2500-3000 U/mg de pepsina) en 50 ml de HCl 10 mM.

(5) Colocar el portaobjetos en 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

(6) Fijar el portaobjetos en formaldehído al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se prepara mezclando 1,35 ml de formaldehído al 37% con 48,15 ml de 1xPBS y 0,5 ml de MgCl₂ 2 M. Eliminar después de usar cada día.

(7) Colocar el portaobjetos en 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

(8) Deshidratar el espécimen colocando el portaobjetos en una serie de soluciones de etanol (70%, 85%, 100%), 1-5 minutos por solución. Dejar secar el espécimen al aire antes de desnaturalizar.

Después de realizar los tratamientos anteriores, se realizó la hibridación por fluorescencia *in situ* en todos los especímenes de la siguiente manera:

(1) Desnaturalizar los ADN de los especímenes colocando el portaobjetos en una solución de formamida al 70%/2xSSC a 73 °C durante 5 minutos.

(2) Deshidratar el espécimen colocando el portaobjetos en una serie de soluciones de etanol (70%, 85%, 100%), 1-5 minutos por solución. Dejar secar el espécimen al aire antes de aplicar la sonda desnaturalizada.

(3) Desnaturalizar una solución con la sonda colocando un tubo que contiene la sonda en un baño con agua a 73°C durante 5 minutos.

(4) Aplicar la solución con la sonda desnaturalizada al portaobjetos desnaturalizado, colocar un cubreobjetos sobre la solución y sellar el cubreobjetos colocando adhesivo de caucho a lo largo de los bordes. Dejar que la sonda se hibride durante una noche a 37 °C en una cámara humidificada.

(5) Lavar el portaobjetos en un tarro Coplin en 0,4xSSC/NP-40 al 0,3% durante 3 minutos a 70 °C (o 1 minuto a 73 °C). Lavar 4 portaobjetos simultáneamente por tarro Coplin.

(6) Sumergir el portaobjetos en 2xSSC/NP-40 al 0,1% durante varios segundos a varios minutos.

(7) Aplicar una solución de tinción de contraste/antifade y cubrir con un cubreobjetos. Conservar los portaobjetos a -20°C hasta su análisis.

Los portaobjetos de los especímenes hibridados se observaron en un microscopio de fluorescencia usando conjuntos de filtros de pase de banda sencillos específicos para cada uno de los cuatro marcadores fluorescentes y tinción de contraste DAPI. Cada impronta se analizó contando el número de manchas de cada color fluorescente en 100 células no inflamatorias consecutivas y se registró el número de copias de cada diana sonda. Algunos especímenes no se hibridaron bien con las 26 sondas, de manera que el número de especímenes ensayados difirió para cada sonda. Además, los 8 conjuntos de sondas no se ensayaron en todos los especímenes.

Ejemplo 2: análisis de datos de hibridación *in situ*

Se analizaron los datos del número de copias diana para cada uno de los especímenes normales y tumorales para determinar la capacidad de cada sonda para discriminar entre especímenes tumorales y normales (análisis discriminativo) y para determinar la cantidad de las combinaciones de sondas para discriminar entre especímenes tumorales y normales (análisis combinatorial). Estos análisis se usaron como parte de los datos considerados para decidir qué sondas deben usarse individual o conjuntamente para identificar mejor células de cáncer de pulmón.

Análisis discriminativo

La capacidad de sondas individuales para discriminar entre el grupo de espécimen normal y el grupo de espécimen tumoral se evaluó en primer lugar comparando los promedios y desviaciones típicas de los porcentajes de células anómalas encontradas en cada grupo. Estos datos se indican en las Tablas 3 (grupo de espécimen normal) y 4 (grupo de espécimen tumoral). Las primeras 26 filas de cada tabla indican datos derivados de recuentos diana absolutos por célula, para cada una de las 26 sondas ensayadas. Para estos cálculos, dianas individuales presentes en más de 2 copias se consideraron una ganancia anómala en el número de copias y dianas presentes en menos de 2 copias se consideraron una pérdida anómala en el número de copias. Las últimas 8 filas en las Tablas 3 y 4 indican datos derivados de proporciones de números diana LSI/CEP, o en el caso del cromosoma 5, la proporción de números diana LSI 5p15/LSI 3q31. Las proporciones solamente se calcularon cuando las dos sondas estaban incluidas en el mismo conjunto de sondas. Las proporciones se calcularon sobre una base de célula por célula. Para los fines de estos cálculos, se consideró que las células tenían ganancia diana cuando las proporciones eran superiores a 1 y pérdida diana cuando las proporciones eran menores de 1.

En las Tablas 3 y 4, las columnas con el encabezamiento "Prom. del % de células..." representan los promedios del porcentaje de células encontrados en cada espécimen con ganancia del número de copias diana o pérdida del número de copias diana, como se indica en el encabezamiento. Las columnas con el encabezamiento "D. T. del % de células..." representan las desviaciones típicas del promedio del porcentaje de células para el número de especímenes (columnas

“Número de especímenes...” en las que se obtuvieron hibridaciones interpretables para cada sonda específica.

En la Tabla 4 se incluyen tres columnas que contienen diferentes mediciones de la capacidad de cada sonda para discriminar entre los grupos de espécimen tumoral y normal. El valor discriminativo, V. D., se calcula de acuerdo con la Ecuación 1:

$$VD=(M_T - M_N)^2/(DT_T^2 + DT_N^2) \quad (1)$$

siendo los valores mayores para una mayor separación entre la media de los especímenes normales, M_N , y la media de los especímenes tumorales M_T y para desviaciones típicas más pequeñas de los especímenes normales, $D.T._N$, y tumorales $D.T._T$.

Las 'DT en el punto medio', D.T.M. se calculan mediante la Ecuación 2:

$$D.T.M. = (M_T - M_N)/(DT_T + DT_N) \quad (2)$$

y es el número de desviaciones típicas de las medias del grupo tumoral y normal lo que iguala la separación de las medias. Si las medias y las desviaciones típicas fueran los valores reales para las poblaciones con tumor y normales, entonces la D.T.M. sería el punto en el cual la sensibilidad y especificidad serían iguales entre sí. Cuanto mayor es el valor D.T.M., mayor es el valor de la sensibilidad y especificidad.

La tercera medida de discriminación indicada en la Tabla 4 es la probabilidad, p, en la que las medias medidas son de la misma población. El valor de p se determina a partir del ensayo t de Student. En efecto cuanto más pequeño es el valor de p, más diferente estadísticamente es la población con tumor de la población normal. Típicamente, se considera que una $p < 0,05$ representa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

Los valores de p en la Tabla 4 indican que las 26 sondas encontraron ganancias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el grupo de espécimen tumoral con respecto al grupo normal, cuando se usan los números diana absolutos. Cuando se consideran cómo proporciones entre LSI y los correspondientes números diana CEP ó LSI, 5 de las 8 proporciones mostraron diferencias significativas (8 últimas filas de la Tabla 4). Sin embargo, solamente 2 de las 26 sondas mostraron pérdida estadísticamente significativa de números diana absolutos (LSI 8p24 y CEP 17) mientras que 5 de las 8 proporciones mostraron diferencias significativas.

Las filas de la Tabla 4 se ordenan de mayor a menor V.D. para ganancia de diana. Los datos derivados de recuentos diana absolutos se ordenan por separado de los datos de proporción. El examen de los valores V.D., D.T.M. y p para ganancia diana mostraron una correspondencia relativamente buena entre los tres parámetros discriminativos. Las 5 sondas discriminativas superiores seleccionadas por los tres parámetros son las mismas, LSI 5p15, LSI 7p12, CEP 1, CEP 6 y LSI 8q24, en orden descendente (indicando todas ganancia de dianas en especímenes de tumor).

Otra estrategia dentro del método de selección global para determinar qué sondas proporcionan la mejor discriminación entre especímenes normales y tumorales es observar el número de especímenes correctamente identificados para cada sonda. Esto requiere seleccionar un número límite para el porcentaje de células con ganancias o pérdidas. Por tanto, una muestra se denomina positiva o negativa para cáncer dependiendo de si el porcentaje de células en la muestra está por encima del valor límite o es igual o inferior al valor límite, respectivamente. Por tanto, la veracidad de identificación de las muestras positivas (sensibilidad) y muestras negativas (especificidad) se usan para seleccionar las mejores sondas.

La Tabla 5 indica la especificidad y sensibilidad de ganancia y pérdida de las 26 diana sonda y las mismas proporciones CEP/LSI y 5p/q indicadas en las Tablas 3 y 4. La tabla incluye los valores de especificidad y sensibilidad a 6 valores límite diferentes (5%, 10%, 20%, 30%, 40% y 50%). La tabla también incluye dos medidas de la especificidad y sensibilidad combinadas, dado que la capacidad global para discriminar entre especímenes tumorales y normales depende tanto de la especificidad como de la sensibilidad. El primer atributo combinado es el producto de especificidad y sensibilidad. El producto es mayor si tanto la especificidad como la sensibilidad son elevadas y es menor si una o ambas disminuyen. El otro atributo combinado, denominado “vector”, se calcula de acuerdo con la Ecuación 3:

$$\text{Vector} = [(1-\text{especificidad})^2 + (1-\text{sensibilidad})^2]^{0,5} \quad (3)$$

Este atributo tiene un valor de 0 cuando especificidad y sensibilidad = 1 y aumenta a 1.414 a medida que se aproxima a 0.

Las filas de la Tabla 5 se ordenan por aumento del valor vector para cada valor límite. Los datos derivados de recuentos diana absolutos se ordenan por separado de los datos de proporción. Las ganancias diana destacan en la parte superior de la tabla y las mismas sondas tienden a mostrar los valores vector más bajos, sin embargo su orden relativo cambia con el valor límite. Las sondas que muestran regularmente alta capacidad de discriminación en base al valor vector y recuentos diana absolutos incluyen LSI 8q24, LSI 5p15, LSI 7p12, LSI 3q26, LSI 20q13, LSI 5q31, LSI 3p14, LSI 17q21, CEP 1, CEP 4, CEP 6, CEP 7, CEP 9 y CEP 16. Cada una de estas sondas se encuentra en las 10 filas superiores para

al menos dos de los valores límite. Las proporciones diana generalmente mostraron valores de vector más bajos excepto para la proporción cromosómica 5p15/5q31 que tuvo valores de vector comparables a algunas de las mejores sondas basándose en sus recuentos diana absolutos.

5 Análisis combinatorial

La capacidad de las sondas múltiples usadas conjuntamente para aumentar la sensibilidad del ensayo (complementación) se investigó usando análisis combinatorial. El análisis comenzó generando todas las combinaciones posibles de un grupo de sondas. Después, se examinaron los datos de recuento para cada espécimen para determinar si alguna de las sondas en cada combinación identificaba ganancia o pérdida de su diana por encima de un número de células umbral. Si en una combinación cualquiera de las sondas era positiva, entonces el espécimen se consideraba positivo para el cáncer para esa combinación.

Las combinaciones se mantuvieron a un máximo de cuatro sondas. Para generar todas las combinaciones no se usó todo el conjunto de 26 sondas debido a la gran cantidad de posibles combinaciones que se generarían para las 26 sondas y sus proporciones pertinentes, cada una de las cuales se examinaría para determinar la ganancia y pérdida (866.847 combinaciones posibles de 1, 2, 3 y 4 sondas). En cambio, se redujo el conjunto de sondas y proporciones para incluir solamente aquellas sondas que identificaban ganancias y aquellas sondas que identificaban pérdidas con una $p < 0,01$ (Tabla 4). Esto proporcionó cierta garantía de que las combinaciones de sondas no se sobrevalorarían como resultado de recuentos diana aleatoriamente elevado de sondas individuales. Para reducir adicionalmente la complejidad, se examinaron individualmente dos grupos de sondas diferentes. El Grupo 1 incluyó todas las sondas para las cuales los recuentos absolutos identificaron ganancia o pérdida diana con una $p < 0,01$. El Grupo 2 sustituyó a los miembros del Grupo 1 con su proporción LSI/CEP o LSI/LSI correspondiente, si la proporción identificó ganancia o pérdida diana con una $p < 0,01$. Por lo tanto, el Grupo 1 consistió en todas las sondas para ganancia indicadas en las 25 primeras filas de la Tabla 4 (debido a su elevada importancia, LSI 5p15/LSI 5q31 también se incluyó en este grupo) y ninguna de las sondas para pérdidas. Grupo 2: se sustituyó LSI 7p12 y LSI 8q24 por LSI 7p12/CEP 7 y LSI 8q24/CEP 8, respectivamente, para ganancias; se suprimió el resto de sondas LSI que tuvieron proporciones LSI/CEP correspondientes con una $p > 0,01$ y se añadieron LSI 9p21/CEP 9 y LSI 17p 13/CEP 17 para pérdidas.

En las Tablas 6 a 9 se indican las combinaciones de 2, 3 y 4 sondas con las mayores sensibilidades y especificidades combinadas, para valores límites del 10% (Tabla 6), 20% (Tabla 7), 30% (Tabla 8) y 40% (Tabla 9), respectivamente. La medida de sensibilidad y especificidad combinadas usada para las combinaciones fue el valor de vector. Se excluyó una combinación particular de las tablas si un subconjunto de sondas en la combinación proporcionaba un valor de vector igual o inferior. Las sondas que contribuían a las mejores combinaciones cambiaban a medida que aumentaba el valor límite. Los mejores valores de vector también aumentaban a medida que aumentaba el valor límite, como se ha observado anteriormente en la Tabla 5 para sondas sencillas. En la determinación del número de sondas en una combinación, las proporciones se contaron como dos sondas, a menos que una de las sondas en la proporción también estuviese en la combinación. En general, no se observaron proporciones en las combinaciones de mejor puntuación, excepto para la proporción LSI 5p1 5/LSI 5q31. Además, la pérdida diana raramente se clasificó en las combinaciones de sonda de máxima realización. Como resultado, en argumento adicional, la ganancia de una diana se implica, a menos que indique específicamente, como una pérdida.

A un valor límite del 10% del porcentaje de células (Tabla 6), LSI 8q24 y LSI 5p15 se encontraron normalmente en las combinaciones de dos sondas de máxima realización y también se complementaron entre sí. LSI 8q24 también se complementó bien con LSI 17q21, LSI 5q31, LSI 9p21, CEP 1, CEP 6, CEP 7, CEP 9, CEP 11 y CEP 17. LSI 5p15 también se complementó bien con LSI 17q21, LSI 5q31, LSI 9p21, LSI 13q14, CEP 8, CEP 12 y CEP 17.

Además, LSI 7p12 y CEP 1 se complementaron bien entre sí. También se observaron las mismas sondas en las mejores combinaciones de tres y cuatro sondas.

Cuando el valor límite aumentó al 20% (Tabla 7), LSI 5p15 permaneció en las combinaciones superiores de dos y se complementó mejor con LSI 3q26, CEP 16, LSI 20q13, LSI 17q21 y CEP 4. LSI 8q24, LSI 3p14, LSI 5q31, LSI 7p12, CEP 3, CEP 6 y CEP 9 también proporcionaron buena complementación con LSI 5p15. LSI 8q24 se incluyó en la parte inferior del listado, aunque también proporcionaba buenos resultados complementándose con LSI 7p12 y CEP 6. Las mejores combinaciones de tres y cuatro sondas también incluían estas sondas así como otras sondas identificadas anteriormente en las mejores combinaciones en el valor límite de 10.

A medida que el valor límite aumentaba al 30% (Tabla 8), LSI 5p15 persistía en las mejores combinaciones y LSI 8q24 estaba ausente de las combinaciones de mayor clasificación. La complementación de LSI 5p15 se proporcionó por CEP6, CEP16, LSI 20q13, LSI 3q26, LSI 17q21, LSI 7p12 y LSI 3p14. Además, LSI 7p12 se complementó con CEP 6 y CEP 6 y CEP 7 se complementaron entre sí. Se encontró que la detección de pérdida diana solo era importante en combinaciones de cuatro sondas (pérdida de LSI 17p13 con respecto a CEP7).

El aumento del valor límite al 40% (Tabla 9) redujo la importancia de LSI 5p15 en dos combinaciones de sondas, y se puso a LSI 7p12 en la parte superior de la lista, que se complementó mejor con LSI 3q26 y CEP 6 y también con CEP 18, CEP 4, CEP 16, LSI 20q13 y LSI 5p15. CEP 6 tuvo una puntuación alta cuando se complementó con CEP 1 o CEP

7. Otros pares de sondas de puntuación alta incluyeron LSI 3q26 con LSI 5p15, CEP1 o CEP 7. En combinaciones de tres sondas, la combinación de LSI 7p12 y CEP 6 con CEP 11 se encontraba en la parte superior de la lista, justo delante de combinaciones de CEP 6 con CEP 1 o CEP 7, también complementadas con CEP 11. Otras sondas incluidas en las mejores combinaciones de realización de tres fueron 17q21, LSI 3q26 CEP 4, CEP 16, CEP 18 y LSI 20q. En combinaciones de cuatro sondas, CEP 6 combinada con CEP 1 o CEP 7 estaba en la parte superior de la lista cuando se complementaba con pérdidas de 17p13/CEP 16. Otra pérdida, 9p21/CEP 9 fue la siguiente cuando se combinó con CEP 7 y LSI 3q. Otras combinaciones de cuatro de puntuación alta incluyeron LSI 7p12, LSI 10q23, CEP 10, CEP 11, LSI 5p15, LSI 5q31, LSI 5p/LSI 5q, CEP 6, CEP 7 y CEP 9.

Ejemplo 3: Selección de conjuntos de sondas

La Tabla 13 indica sondas y conjuntos de sondas seleccionados analizando los datos de los análisis discriminativos y combinatoriales y aplicando los criterios de selección de sondas descritos en este documento. Los conjuntos de sondas de la Tabla 13 varían de tamaño desde una sola sonda a 4 sondas. Pueden realizarse ensayos usando sondas adicionales, por ejemplo, más de cuatro y marcadores fluorescentes adicionales.

Las sondas sencillas indicadas en la Tabla 13 son las sondas que mostraron individualmente mejora sobre citología. Estas incluyen LSI 5p15, LSI 7p12, LSI 8q24, CEP 1, CEP 6 y CEP 9. Para cada una de estas sondas, el valor de vector fue menor de 0,400 para dos de los valores límite ensayados. Otras sondas descritas en el presente documento también proporcionaron valores de vector menores de 0,400 para un solo valor de límite. Sin embargo, una buena realización para dos valores límite implica que una sonda es más fuerte.

A continuación, la Tabla 13 indica combinaciones de 2 sondas. Los pares de sondas dispuestos en este grupo necesitaron tener un valor de vector inferior a 0,400 y se clasificaron en la parte superior aproximadamente 30 pares de sondas (valores de vector más bajos) para al menos un valor límite. Los valores de vector se indican en la tabla para cada par de sondas para cada valor límite en el que el par de sondas se clasificó en los 30 mejores. De especial interés son los pares de sondas de 5p15 + LSI 8q24, LSI 5p15 + CEP 12 y LSI 5p15 + LSI 17q21 que tienen valores de vector menores de 0,400 en 3 valores límite diferentes.

A continuación, la Tabla 13 indica combinaciones de 3 sondas. En este encabezamiento se indican pocas combinaciones de 3 sondas ya que existen pocos conjuntos que mejoren sobre combinaciones de 2 sondas para cualquier valor límite particular.

A continuación, la Tabla 13 indica combinaciones de 4 sondas. En este encabezamiento solo se indica una combinación de 4 sondas ya que fué la única combinación que mejoró sobre las combinaciones de 2 ó 3 sondas para cualquier valor límite particular.

Para aprovechar la capacidad práctica del uso de 3 y 4 sondas FISH juntas, se introdujo una estrategia de redundancia. Con esta estrategia, podría añadirse una tercera sonda a un par de sondas complementarias si esta también se complementaba con una de las 2 sondas. Como alternativa, podría no complementar bien con ninguna sonda, en su lugar sin embargo sería la siguiente sonda sencilla de mejor realización. De manera similar, podrían generarse 4 pares de sondas combinando pares de sondas complementarias. Algunos conjuntos de 3 y 4 sondas generados usando redundancia de los conjuntos de 2 sondas indicados en la Tabla 13 se indican en una parte inferior de la misma tabla. Una estrategia alternativa es elegir un doble par de sondas y añadir 2 sondas adicionales, una de las cuales se complementa con un miembro del primer par y la otra se complementa con el otro miembro del primer par. Una ventaja de las sondas de redundancia es que la especificidad del ensayo podría mejorarse necesitando ganar 2 de las dianas para denominar anómalo al espécimen. La redundancia también puede mejorar la sensibilidad ya que si una sonda de hibridación fallase en un ensayo, la sonda redundante podría aun detectar la ganancia diana. En la selección de sondas pueden considerarse otras cuestiones prácticas. Por ejemplo, el conjunto de 4 sondas de 5p15 + LSI 8q24 + LSI 7p12 + LSI 17q21 puede construirse a partir de sondas en tres de las combinaciones de 2 sondas de mayor realización indicadas en la Tabla 13. La importancia de este conjunto de sondas es que detecta los locus de importancia terapéutica, 17q21 que contiene el gen HER-2/neu y 7p12 que contiene el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La identificación de anomalías en estos locus puede usarse para seleccionar un régimen de tratamiento adecuado.

Ejemplo 4: Detección de cáncer de pulmón

Se seleccionaron dos conjuntos de sondas tricolor para ensayar preliminarmente una serie de especímenes de secreción bronquial. Los resultados de este estudio demostraron que con paneles de FISH (de las siglas en inglés, Hibridación In Situ con Fluorescencia) multicolor podía obtenerse una especificidad y sensibilidad equivalente a o mejor que la citología convencional.

Los resultados de las hibridaciones del conjunto de sondas tricolor con cada uno de los 21 frotis de secreción bronquial se indican en la Tabla 10, junto con números de identificación del espécimen, diagnóstico clínico, resultados citológicos y resultados de biopsia broncoscópica (se realizaron dos resultados con biopsia adicional). Cada espécimen se hibridó con dos conjuntos de sondas tricolor diferentes. El primer conjunto de sondas tricolor contenía LSI 8q24, LSI 5p15 y

CEP 1 y el segundo conjunto contenía LSI 8q24, LSI 5p15 y CEP 6. Se encontró ganancia de la diana 5p15 en 13 de los 13 especímenes positivos con FISH. Se encontró ganancia de las dianas 8q24, CEP1 y CEP 6 en 11, 7 y 5 de 13 dianas positivas con FISH, respectivamente. Uno de los portaobjetos con espécimen no pudo evaluarse por FISH debido a una mala morfología y no se detectaron anomalías por FISH en los 7 especímenes restantes. En las Tablas 11 y 12, respectivamente, se compara la realización de citología convencional y FISH con el diagnóstico clínico. El diagnóstico clínico se basó en la información combinada disponible para el médico y no se incluyó en el resultado de FISH.

En los métodos anteriores, se prepararon frotis de secreciones bronquiales colocando un espécimen entre dos portaobjetos del microscopio y deslizando los portaobjetos uno sobre otro mientras se aplica una ligera presión. Después los portaobjetos se fijaron brevemente con etanol y se conservaron a -20 °C hasta el momento del uso.

Los frotis de secreciones bronquiales se prepararon para hibridación *in situ* mediante el siguiente protocolo.

- (1) Incubar el portaobjetos con el espécimen en 2xSSC a 37 °C durante 10 minutos.
- (2) Colocar el portaobjetos en una solución de pepsina (0,05 mg de pepsina por ml de HCl 10 mM) a 37 °C durante 13 minutos.
- (3) Colocar el portaobjetos en 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- (4) Fijar el espécimen colocando los portaobjetos en formaldehído al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- (5) Colocar los portaobjetos en 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La hibridación *in situ* se realizó sobre los especímenes de la siguiente manera.

- (1) Desnaturalizar el ADN del espécimen colocando los portaobjetos en una solución de formamida al 70%/2xSSC a 73 °C durante 5 minutos.
- (2) Deshidratar el espécimen colocando en portaobjetos en una serie de soluciones de etanol (70%, 85%, 100%), 1-5 minutos por solución. Dejar secar el espécimen al aire antes de aplicar la sonda desnaturalizada.
- (3) Desnaturalizar una solución de sonda colocando un tubo que contenga la sonda en un baño con agua a 73 °C durante 5 minutos.
- (4) Aplicar la solución de sonda desnaturalizada al portaobjetos desnaturalizado, colocar un cubreobjetos sobre la solución y sellar el portaobjetos aplicando adhesivo de caucho a lo largo de los bordes.
- (5) Dejar que la sonda se hibride durante una noche a 37 °C en una cámara humidificada.
- (6) Lavar el portaobjetos en un tarro Coplin en 0,4xSSC/NP-40 al 0,3% durante 3 minutos a 70 °C (ó 1 minuto a 73 °C). Lavar 4 portaobjetos simultáneamente por tarro Coplin.
- (7) Sumergir el portaobjetos en 2xSSC/NP-40 al 0,1% durante varios segundos a varios minutos.
- (8) Aplicar solución de tinción de contraste/antifade y cubrir con un cubreobjetos. Conservar el portaobjetos a -20 °C hasta su análisis.

Los frotis de secreción bronquial se analizaron explorando todo el espécimen. Se examinó cada campo al microscopio secuencialmente con los 4 conjuntos de filtro de pase de banda sencillos (DAPI más 3 marcadores de sonda) para explorar células con ganancias diana. Se registró el número de dianas para cada una de las 3 sondas para cualquier célula que mostrase ganancia en una o más de las 3 dianas.

Tabla 1 Sondas usadas para la selección de sondas

NOMBRE DE LA SONDA	FUENTE DE ADN	LOCALIZACIÓN DIANA	MARCADOR	CONJUNTO DE SONDAS
CEP 1, sat. II/III	Producto Vysis	1q12	SpectrumGreen	5
CEP 3, alpha sat.	Producto Vysis	D3Z1, 3p11.1-q1 1.1	SpectrumAqua	6
LS13p14/FHIT	BAC	3p14	SpectrumOrange	6
LS13q26/TERC	BAC	3q26	SpectrumGreen	8
CEP 4, alpha sat.	Producto Vysis	4p11-q11	SpectrumAqua	8
LSI D5S721, D5S23	Producto Vysis	D5S721, D5S23, Sp15	SpectrumGreen	4
LSI EGR1	Producto Vysis	5q31	SpectrumOrange	4
CEP 6, alpha sat.	Producto Vysis	D6Z1, 6p11.1-q11	SpectrumGreen	6
CEP 7, alpha sat.	Producto Vysis	D7Z1, 7p11.1-q11.1	SpectrumAqua	5
LSI EGFR	BAC	7p12	SpectrumOrange	5
CEP 8, alpha sat.	Producto Vysis	D8Z2, 8p11.1-q11.1	SpectrumAqua	2
LSI c-myc	Producto Vysis	8q24	SpectrumOrange	2
CEP 9, alpha sat.	Producto Vysis	9p11-q11	SpectrumGreen	3
LSI9p21	Producto Vysis	9p21	SpectrumGold	3
CEP 10, alpha sat.	Producto Vysis	10p11.1-ql 1.1	SpectrumGreen	7
LSI 10q23(PTEN)	BAC	10q23	SpectrumOrange	7
CEP 11, alpha sat.	Producto Vysis	D11Z1, 11p11.1-q11	SpectrumAqua	3
CEP 12, alpha sat.	Producto Vysis	D12Z3, 12p11.1-q11	SpectrumAqua	4
LSI 13/RBI	Producto Vysis	13q14	SpectrumGreen	2
CEP 16, sat. II	Producto Vysis	D16Z3, 16q1 1.2	SpectrumGold	8
CEP 17, alpha sat.	Producto Vysis	D17Z1, 17p11.1-q1.1	SpectrumAqua	1
LSI p53	Producto Vysis	17p13	SpectrumOrange	1
LSI her2/neu (ERBB2)	Producto Vysis	17q21	SpectrumGreen	1
CEP 18, alpha sat.	Producto Vysis	D18Z1, 18p11.1-q11.1	SpectrumAqua	7
LSI20q13(ZNF217)	Producto Vysis	20q13	Spectrum Red	8
LSI 21	Producto Vysis	D21S259, D21S341, D21S342, 21q22	Spectrum Red	3

Tabla 2 Tejido de tumor de pulmón y adyacente normal usado para la selección de sondas

NOMBRE DEL ESPECIMEN	TIPO DE ESPECIMEN	TIPO DE TUMOR	GRADO DE TUMOR
T1	tumor	carcinoma bronquiolo alveolar	2
T2	tumor	adenocarcinoma	2
T3	tumor	adenocarcinoma	2
T7	tumor	adenocarcinoma	4
T8	tumor	carcinoma bronquiolo alveolar	1
T9	tumor	adenocarcinoma	2
T10	tumor	adenocarcinoma	3
T11	tumor	carcinoma de células escamosas	4
T12	tumor	adenocarcinoma	3
T13	tumor	carcinoma de células grandes	4
T14	tumor	adenocarcinoma	4
T15	tumor	tumor carcinoide	?
T16	tumor	adenocarcinoma	3
T17	tumor	adenocarcinoma	2
T18	tumor	carcinoma de células grandes	4
T19	tumor	adenocarcinoma	4
T20	tumor	carcinoma de células escamosas	4
T21	tumor	carcinoma de células escamosas	4
T22	tumor	carcinoma de células escamosas	4
T23	tumor	adenocarcinoma	3
T24	tumor	adenocarcinoma	3
T25	tumor	carcinoma de células escamosas	4
T26	tumor	adenocarcinoma	3
T27	tumor	adenocarcinoma	2
T28	tumor	?	?
131	tumor	?	?
T32	tumor	?	?
N1	NAT	NA	NA
N2	NAT	NA	NA
N3	NAT	NA	NA
N7	NAT	NA	NA
N8	NAT	NA	NA
N12	NAT	NA	NA
N 13	NAT	NA	NA
N14	NAT	NA	NA
N15	NAT	NA	NA
N16	NAT	NA	NA
N17	NAT	NA	NA
N18	NAT	NA	NA
*NAT -tejido normal adyacente al tejido tumoral, NA = no aplicable, ? = estado desconocido			

Tabla 3 ANÁLISIS DISCRIMINATIVO

SONDA	Número de especímenes	Prom. % de células con ganancia	D.T. % de células con ganancia	Prom. % de células con pérdida	D.T. % de células con pérdida
LSI5p15	10	4,4000	2,8752	2,8000	1,9322
LSI7p12	10	5,5500	2,4771	1,3000	1,9465
CEP 1	10	3,5500	0,8317	3,3000	2,5408
CEP 6	10	1,9000	2,2336	4,8000	2,5734
LS1 8q24	10	2,7500	1,9329	3,1000	1,8529
LSI20q	10	3,9000	2,2336	4,5000	2,8771
CEP 9	10	2,1000	2,0790	7,1000	5,0211
LSI3p14	10	4,3000	4,2439	2,9000	2,2828
CEP 16	10	2,8000	1,4757	10,1000	4,6774
CEP 4	10	2,8000	2,6162	2,6000	1,5055
LSI 3q	10	7,5000	3,2404	2,9000	3,0350
CEP 7	10	1,4000	0,9661	2,4000	2,0111
LSI17q21	10	2,9000	2,4698	6,5000	2,8771
LS15q31	10	3,4000	1,6465	4,4000	2,5033
CEP 3	10	1,7000	1,4181	3,7000	2,2632
CEP 10	10	1,4000	2,0656	4,1000	2,9981
CEP 11	10	2,6500	2,3576	4,4000	1,7764
CEP 8	10	1,0000	1,0541	4,5000	2,9907
CEP 18	10	1,8000	1,9889	7,9000	3,8427
LSI 13	10	2,4500	2,2417	3,6500	2,7894
LSI9p21	10	2,7500	2,8211	4,0000	3,0185
LSI10q23	10	6,0000	4,5947	3,0000	2,1602
CEP 12	10	1,5000	1,2693	4,4000	2,6331
CEP 17	10	2,3000	2,6687	10,9000	4,4585
LSI17p13	10	4,1000	3,9567	6,9000	3,2472
LS121	10	7,8500	5,8407	6,1500	4,9668
Proporciones:					
5 p/q imbal.	10	5,2234	3,4875	3,2132	1,7602
LSI7p12/CEP7	10	6,3000	3,6833	1,1500	2,1350
LSI8q24/CEP8	10	6,1561	3,3667	2,9540	1,7098
LSI3p14/CEP3	10	7,0000	4,9666	3,6000	2,6331
LSI 17q21/CEP	10	11,4000	5,4610	6,2000	2,1499
LSI 10q23/CEP	10	8,5000	5,9489	3,0000	1,6997
LSI9p21/CEP9	10	7,7041	7,4657	3,9041	3,9546
LSI 17p13/CEP	10	11,3000	5,3759	6,0000	3,0551

Tabla 4 ANÁLISIS DISCRIMINATIVO

	Número de especímenes	Prom. % de células con ganancia	D.T.% de células con ganancia	Ganancia V.D	Ganancia D.T. M	Ganancia p	Prom. % de células con pérdida	D.T.% de células con pérdida	Pérdida V.D	Pérdida D.T.M	pérdida p
SONDA											
LSI5p15	26	34,0385	25,1483	1,3710	1,0576	0,000003	1,4615	1,9022	0,2437	-0,3491	0,079773
LSI7p12	26	30,1154	21,6505	1,2708	1,0181	0,000005	1,3462	2,2617	0,0002	0,0110	0,952130
CEP 1	26	27,7308	21,7946	1,2292	1,0687	0,000007	7,7308	19,0527	0,0531	0,2052	0,256410
CEP 6	26	27,8462	24,2976	1,1307	0,9779	0,000012	3,7692	3,2901	0,0609	-0,1758	0,332295
LSI8q24	27	22,7407	19,3621	1,0555	0,9388	0,000013	1,5926	1,5753	0,3842	-0,4397	0,038297
LSI20q	19	26,2632	22,4297	0,9943	0,9067	0,1100395	2,6842	2,1616	0,2546	-0,3604	0,100820
CEP 9	26	19,6923	17,6176	0,9934	0,8932	0,000031	6,6154	8,2998	0,0025	-0,0364	0,932828
LSI3p14	26	21,5385	17,1912	0,9477	0,8042	0,000043	4,2692	6,6547	0,0379	0,1532	0,365082
CEP 16	19	21,9474	20,5520	0,8635	0,8692	0,000741	8,3684	5,9368	0,0525	-0,1631	0,398174
CEP 4	19	20,7368	19,5756	0,8248	0,8083	0,000888	2,9474	1,9511	0,0198	0,1003	0,600639
LSI3q	19	29,7895	24,278	0,8248	0,8085	0,000889	2,6316	5,9709	0,0016	-0,0301	0,872277
CEP 7	26	23,1154	24,0704	0,8126	0,8673	0,000106	2,6154	2,8576	0,0038	0,0442	0,801649
LSI17q21	27	22,3704	21,4658	0,8120	0,8134	0,000077	4,2593	4,5454	0,1735	-0,3019	0,087675
LSISq31	26	22,9231	22,2996	0,7623	0,8153	0,000154	4,2692	5,0482	0,0005	-0,0173	0,918489
CEP 3	26	21,1154	24,0671	0,6485	0,7618	0,000377	3,9231	6,5600	0,0010	0,0253	0,880460
CEP 10	25	17,1600	19,9827	0,6154	0,7149	0,000645	3,7000	2,9155	0,0091	-0,0676	0,723951
CEP 11	26	18,9231	21,5108	0,5653	0,6818	0,000770	3,4231	3,1135	0,0743	-0,1998	0,248755
CEP 8	27	17,2222	21,7155	0,5367	0,7125	0,000646	3,2593	2,9819	0,0863	-0,2077	0,278498
CEP 18	25	17,0000	21,1325	0,5128	0,6574	0,001526	5,0800	4,1122	0,2510	-0,3545	0,070839
LSI 13	27	13,4444	15,3230	0,5040	0,6239	0,001103	4,0741	3,4744	0,0091	0,0677	0,705658
LSI9p21	26	14,9615	17,5191	0,4736	0,6004	0,001833	9,0000	15,5486	0,0997	0,2693	0,128341
LSI10q23	25	15,8600	13,9280	0,4320	0,5323	0,003606	3,3600	4,4989	0,0052	0,0541	0,752077
CEP 12	26	19,3462	26,9250	0,4383	0,6330	0,002417	3,2308	3,4212	0,0734	-0,1931	0,286454
CEP 17	27	16,3704	21,9057	0,4065	0,5726	0,002832	6,2222	5,8001	0,4089	-0,4560	0,016682
ISI 17p13	27	14,1852	13,7774	0,3844	0,5111	0,004264	7,6296	9,9466	0,0049	0,0553	0,738974
LSI 21	26	17,7844	17,8255	0,2805	0,4198	0,016950	4,5832	3,8505	0,0622	-0,1777	0,384519
Proporciones:											
5 p/q imbal.	26	28,1566	22,1019	1,0505	0,8962	0,000020	5,3885	7,0458	0,0897	0,2470	0,154145

(continuación)

Proporciones:		26	15,8237	10,9781	0,6764	0,6496	0,000446	3,8921	4,6890	0,2832	0,4018	0,022057
ISI	7p12/CEP7											
LSI	8q24/CEP8	27	13,7445	8,6033	0,6747	0,6340	0,000477	5,2233	7,7125	0,0825	0,2408	0,160626
LSI	3p14/CEP3	26	12,5385	9,8599	0,2317	0,3736	0,033580	14,6154	18,1242	0,3618	0,5307	0,005431
LSI	17q21/CEP	27	16,7099	9,9709	0,2181	0,3440	0,048699	8,4901	8,3931	0,0699	0,2172	0,200321
LSI	10q23/CEP	25	12,3232	8,1702	0,1431	0,2708	0,138690	11,8277	17,5057	0,2519	0,4596	0,019653
LSI	9p21/CEP 9	26	9,2480	9,1323	0,0171	0,0930	0,60B094	13,3700	16,2368	0,3208	0,4688	0,009422
LSI	17p13/CEP	27	11,3749	9,4349	0,0000	0,0051	0,976201	17,4138	20,1651	0,3132	0,4915	0,007889

Tabla 5 Sensibilidad y Especificidad de Detección de Tumor de Pulmón

LÍMITE - 5% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 10% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSE*E SPEC.	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSE*E SPEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
CEP 1	ganancia	1,000	0,923	0,923	0,077	26	8q24	ganancia	1,000	0,778	0,778	0,222	27
8q24	ganancia	0,900	0,815	0,733	0,210	27	LSI5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
CEP 16	ganancia	1,000	0,737	0,737	0,263	19	7p12	ganancia	0,900	0,692	0,623	0,324	26
CEP 6	ganancia	0,900	0,731	0,658	0,287	26	CEP 1	ganancia	1,000	0,654	0,654	0,346	26
CEP 9	ganancia	0,900	0,771	0,658	0,287	26	CEP 9	ganancia	1,000	0,654	0,654	0,346	26
LSI 5q31	ganancia	0,900	0,692	0,623	0,324	26	LSI3q	ganancia	0,900	0,632	0,568	0,382	19
LSI20q	ganancia	0,800	0,737	0,589	0,331	19	CEP 6	ganancia	1,000	0,615	0,615	0,385	26
3p14	ganancia	0,700	0,846	0,592	0,777	26	17q21	ganancia	1,000	0,593	0,393	0,407	27
17q21	ganancia	0,800	0,704	0,563	0,337	27	CEP 16	ganancia	1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 4	ganancia	0,800	0,684	0,547	0,374	19	CEP4	ganancia	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 5p15	ganancia	0,600	0,923	0,554	0,407	26	LSI 20q	ganancia	1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 8	ganancia	1,000	0,593	0,593	0,407	27	LSI5q31	ganancia	1,000	0,577	0,577	0,423	26
LSI 13	ganancia	0,900	0,593	0,533	0,420	27	3p14	ganancia	0,900	0,577	0,519	0,435	26
CEP 11	ganancia	0,900	0,577	0,519	0,435	26	CEP 7	ganancia	1,000	0,538	0,538	0,462	26

(continuación)

LÍMITE - 5% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 10% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SOND A	PÉRDIDA / GANANCI A	ESPECIFICIDA D	SENSIBILIDA D	SENS*E S PEC.	VECTO R	Nº DE ESPECÍMENE S TUMORALES	SOND A	PÉRDIDA / GANANCI A	ESPECIFICIDA D	SENSIBILIDA D	SENS*E S PEC	VECTO R	Nº DE ESPECÍMENE S TUMORALES
CEP 10	ganancia	1,000	0,560	0,560	0,440	25	CEP 3	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	26
CEP 17	ganancia	0,900	0,556	0,500	0,456	27	CEP 8	ganancia	1,000	0,481	0,481	0,519	27
CEP 3	ganancia	1,000	0,538	0,538	0,462	26	9p21	ganancia	1,000	0,462	0,462	0,538	26
CEP 7	ganancia	1,000	0,538	0,538	0,462	26	CEP 11	ganancia	1,000	0,462	0,462	0,578	26
9p21	ganancia	0,800	0,577	0,462	0,469	26	10q23	ganancia	0,800	0,480	0,384	0,557	25
10q23	ganancia	0,600	0,720	0,432	0,488	25	CEP 12	ganancia	1,000	0,423	0,423	0,577	26
CEP 18	ganancia	0,900	0,520	0,468	0,490	25	LSI 21	ganancia	0,700	0,500	0,350	0,583	26
CEP 12	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	26	CEP 17	ganancia	1,000	0,407	0,407	0,593	27
17p13	ganancia	0,600	0,593	0,356	0,571	27	LSI 13	ganancia	1,000	0,407	0,407	0,593	27
LSI 21	ganancia	0,500	0,692	0,346	0,387	26	CEP 10	ganancia	1,000	0,400	0,400	0,600	25
7p12	ganancia	0,400	0,946	0,338	0,619	26	CEP 18	ganancia	1,000	0,400	0,400	0,600	25
9p21	ganancia	0,900	0,385	0,308	0,647	26	17p13	ganancia	0,900	0,407	0,367	0,601	27
LSI 13	ganancia	0,700	0,370	0,259	0,697	27	17p13	pérdida	0,900	0,259	0,207	0,767	27
CEP 1	ganancia	0,800	0,308	0,246	0,721	26	CEP 9	pérdida	0,800	0,192	0,154	0,932	26
LSI3q	ganancia	0,300	0,789	0,237	0,731	19	LSi 5q31	pérdida	1,000	0,154	0,154	0,846	26

(continuación)

LÍMITE - 5% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 10% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
10q23	pérdida	0,900	0,240	0,216	0,767	25	9p21	pérdida	0,900	0,154	0,138	0,852	26
3p14	pérdida	0,900	0,231	0,208	0,776	26	3p14	pérdida	1,000	0,077	0,077	0,923	26
CEP 11	pérdida	0,700	0,269	0,188	0,790	26	CEP 3	pérdida	1,000	0,077	0,077	0,923	26
CEP 6	pérdida	0,700	0,269	0,188	0,790	26	CEP 17	pérdida	0,500	0,222	0,111	0,925	27
CEP 12	pérdida	0,900	0,192	0,173	0,814	26	LSI 21	pérdida	0,900	0,077	0,069	0,929	26
CEP7	pérdida	0,900	0,192	0,173	0,814	26	17q21	pérdida	0,900	0,074	0,067	0,971	27
CEP 10	pérdida	0,700	0,240	0,168	0,817	25	CEP 18	pérdida	0,800	0,080	0,064	0,941	25
LSI 21	pérdida	0,500	0,346	0,173	0,823	26	LSI3q	pérdida	1,000	0,053	0,053	0,947	19
17q21	pérdida	0,500	0,333	0,167	0,933	27	CEP 16	pérdida	0,400	0,263	0,105	0,950	19
CEP 4	pérdida	1,000	0,158	0,158	0,842	19	10q21	pérdida	1,000	0,040	0,040	0,960	25
CEP 16	pérdida	0,300	0,526	0,158	0,845	19	CEP 10	pérdida	1,000	0,040	0,040	0,960	25
LSI 5q31	pérdida	0,600	0,271	0,138	0,967	26	CEP 1	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26
CEP 8	pérdida	0,700	0,185	0,130	0,868	27	CEP 11	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26
CEP3	pérdida	0,800	0,154	0,123	0,869	26	CEP 6	pérdida	1,000	0,078	0,038	0,962	26
LSI3q	pérdida	0,800	0,105	0,094	0,917	19	LSI13	pérdida	1,000	0,037	0,037	0,963	27

(continuación)

LÍMITE - 5% DE CÉLULAS CON GANANCIAS Ó PÉRDIDAS							LÍMITE - 10% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
7p12	pérdida	0,900	0,077	0,069	0,923	26	CEP 12	pérdida	0,900	0,039	0,035	0,967	26
17p13	pérdida	0,300	0,370	0,111	0,942	27	7p12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI 5p15	pérdida	0,900	0,038	0,035	0,967	26	8q24	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
8q24	pérdida	0,900	0,037	0,033	0,968	27	CEP 4	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
LSI20q	pérdida	0,800	0,053	0,042	0,968	19	CEP 7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 18	pérdida	0,200	0,400	0,080	1,000	25	CEP 8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 9	pérdida	0,200	0,385	0,077	1,009	26	LSI5p15	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 17	pérdida	0,100	0,519	0,052	1,021	27	LSI20p	pérdida	0,900	0,000	0,000	1,005	19
Proporciones:													
5p/q imbal.	ganancia	0,600	0,923	0,554	0,407	26	5p/q imbal.	ganancia	0,800	0,692	0,554	0,367	26
8q24/C EP8	ganancia	0,600	0,852	0,511	0,427	27	7p12/CE P7	ganancia	0,900	0,577	0,519	0,435	26
3p14/C EP3	ganancia	0,700	0,654	0,458	0,458	26	8q24/CE P8	ganancia	0,800	0,597	0,474	0,454	27
9p21/C EP9	ganancia	0,800	0,577	0,462	0,469	26	3p14/CE P3	ganancia	0,900	0,500	0,450	0,510	26
10q23/ CEP 1	ganancia	0,900	0,520	0,468	0,490	25	3p 14/CEP3	pérdida	1,000	0,462	0,462	0,538	26

(continuación)

Proporciones:															
Tp12/C EP7	ganancia	0,500	0,808	0,404	0,536	26	10q23/C EP 1	ganancia	0,700	0,490	0,336	0,600	25		
10q23/ CEP 1	ganancia	0,500	0,760	0,780	0,555	25	17q21/C EP 1	ganancia	0,500	0,667	0,333	0,601	27		
7p14/C EP3	ganancia	0,400	0,808	0,323	0,630	26	17p13/C EP 1	pérdida	0,900	0,407	0,367	0,601	27		
8q24/C EP8	pérdida	1,000	0,333	0,333	0,667	27	9p21/CE P9	pérdida	0,900	0,346	0,312	0,661	26		
9p21/C EP9	ganancia	0,400	0,615	0,246	0,713	26	17q211 CEP 1	pérdida	1,000	0,333	0,333	0,667	27		
7p12/C EP7	pérdida	0,900	0,269	0,242	0,738	26	17p13/C EP 1	ganancia	0,600	0,407	0,244	0,715	27		
17p13/ CEP 1	pérdida	0,300	0,667	0,200	0,775	27	10q23/C EP 1	pérdida	1,000	0,240	0,240	0,760	25		
5p/q imbal.	pérdida	0,900	0,231	0,208	0,776	26	9p21/CE P9	ganancia	0,800	0,231	0,185	0,795	26		
17q21/ CEP 1	pérdida	0,300	0,593	0,178	0,810	27	7p12/CE P7	pérdida	1,000	0,192	0,192	0,808	26		
17q21/ CEP 1	ganancia	0,100	0,889	0,089	0,907	27	8q24/CE P8	pérdida	1,000	0,111	0,111	0,999	27		
17p13/ CEP 1	ganancia	0,100	0,704	0,070	0,948	27	5p/q imbal.	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26		
LÍMITE = 20% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 30% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS								
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES		
LS15p1 5	ganancia	1,000	0,654	0,654	0,346	26	LS15p15	ganancia	1,000	0,577	0,577	0,423	26		

(continuación)

LÍMITE =-20% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE =30% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
7p12	ganancia	1,000	0,615	0,615	0,385	26	7p12	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	26
LSI3q	ganancia	1,000	0,579	0,579	0,421	19	CEP6	ganancia	1,000	0,300	0,500	0,50	26
CEP 1	ganancia	1,000	0,538	0,538	0,462	26	LSI 20q	ganancia	1,000	0,474	0,474	0,526	19
3p14	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	26	LSI3q	ganancia	1,000	0,474	0,474	0,526	19
CEP 6	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,300	26	CEP I	ganancia	1,000	0,385	0,785	0,615	26
CEP 16	ganancia	1,000	0,474	0,474	0,526	19	CEP 7	ganancia	1,000	0,385	0,385	0,615	26
CEP 4	ganancia	1,000	0,474	0,474	0,526	19	3p14	ganancia	1,000	0,346	0,346	0,654	26
LSI20q	ganancia	1,000	0,474	0,474	0,526	19	LSI5q31	ganancia	1,000	0,346	0,346	0,654	26
CEP 7	ganancia	1,000	0,462	0,462	0,531	26	CEP 3	ganancia	1,000	0,308	0,308	0,692	26
17q21	ganancia	1,000	0,444	0,444	0,556	27	17q21	ganancia	1,000	0,296	0,296	0,704	27
8q24	ganancia	1,000	0,444	0,444	0,556	27	CEP 11	ganancia	1,000	0,269	0,269	0,731	26
CEP 3	ganancia	1,000	0,423	0,423	0,577	26	CEP 12	ganancia	1,000	0,269	0,269	0,731	26
CEP 9	ganancia	1,000	0,423	0,423	0,577	26	CEP 16	ganancia	1,000	0,263	0,263	0,737	19
LSI 5q31	ganancia	1,000	0,423	0,423	0,577	26	CEP 4	ganancia	1,000	0,263	0,263	0,737	19

(continuación)

LÍMITE = 20% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE =30% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
CEP 11	ganancia	1,000	0,385	0,385	0,615	26	CEP 10	ganancia	1,000	0,240	0,240	0,760	25
CEP 10	ganancia	1,000	0,360	0,360	0,640	25	CEP 18	ganancia	1,000	0,240	0,240	0,760	25
CEP 12	ganancia	1,000	0,346	0,346	0,654	26	8q24	ganancia	1,000	0,222	0,222	0,778	27
10q23	ganancia	1,000	0,320	0,320	0,680	25	CEP 17	ganancia	1,000	0,222	0,222	0,778	27
CEP 18	ganancia	1,000	0,320	0,320	0,680	25	CEP 9	ganancia	1,000	0,192	0,192	0,808	26
CEP 17	ganancia	1,000	0,296	0,296	0,704	27	LSI 21	ganancia	1,000	0,192	0,192	0,808	26
CEP 8	ganancia	1,000	0,296	0,296	0,704	27	17p13	ganancia	1,000	0,185	0,185	0,915	27
LSI 21	ganancia	0,900	0,269	0,242	0,738	26	CEP 8	ganancia	1,000	0,185	0,185	0,315	27
9p21	ganancia	1,000	0,231	0,231	0,769	26	10q23	ganancia	1,000	0,160	0,160	0,840	25
17p13	ganancia	1,000	0,222	0,222	0,718	27	9p21	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26
LSI 13	ganancia	1,000	0,148	0,148	0,852	27	9p21	pérdida	1,000	0,115	0,115	0,885	26
9p21	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26	LSI 13	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27
CEP 3	ganancia	1,000	0,077	0,077	0,923	26	CEP I	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26
17p17	ganancia	1,000	0,074	0,074	0,926	27	CEP 9	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26

(continuación)

LÍMITE = 20% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE =30% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
CEP 16	1,000	0,053	0,053	0,053	0,947	19	17p13	pérdida	1,000	0,037	0,037	0,963	27
LSI3q	1,000	0,053	0,053	0,033	0,947	19	10q23	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25
3p14	1,000	0,038	0,038	0,038	0,962	26	17q21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP I	1,000	0,038	0,038	0,038	0,962	26	3p14	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 9	1,000	0,038	0,038	0,038	0,962	26	7p12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI 5q31	1,000	0,038	0,038	0,038	0,962	26	8q24	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 17	1,000	0,037	0,037	0,037	0,963	27	CEP 10	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25
10q23	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	25	CEP 11	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
17q21	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	27	CEP 12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
7p12	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 16	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
8q24	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	27	CEP 17	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 10	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	25	CEP 18	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25
CEP 11	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 3	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 12	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 4	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19

(continuación)

LÍMITE =20% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE =30% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
CEP 18	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25	CEP 6	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 4	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19	CEP 7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 6	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	LSI 13	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	LSI 20q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
LSI 13	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	LSI 21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI20q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19	LSI3q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
LSI 21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	LSI5p15	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI 5q15	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	LSI5q31	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
5p/q imbal.	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	26	5p/q imbal.	ganancia	1,000	0,385	0,385	0,615	26
17q21/ CEP 1	ganancia	1,000	0,370	0,370	0,630	27	17p13/C EP 1	pérdida	1,000	0,185	0,185	0,815	27
7p12/C EP7	ganancia	1,000	0,346	0,346	0,654	26	10q23/C EP 1	pérdida	1,000	0,160	0,160	0,840	25
17p13/ CEP 1	ganancia	1,000	0,259	0,259	0,741	27	3p14/CE P3	pérdida	1,000	0,115	0,115	0,885	26

(continuación)

LÍMITE =20% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS										LÍMITE = 30% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS									
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES	VECTOR	PEC	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA		PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES	VECTOR	PEC	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES			
3p14/C EP3	pérdida	1,000	0,192	0,192	0,192	0,808	26	3p14/CE P3		ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885		26			
9p21/C EP9	pérdida	1,000	0,192	0,192	0,192	0,808	26	7p12/CE P7		ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885		26			
17p13/ CEP 1	ganancia	0,900	0,185	0,185	0,167	0,821	27	9p21/CE P9		pérdida	1,000	0,115	0,115	0,883		26			
10q23/ CEP 1	pérdida	1,000	0,160	0,160	0,160	0,840	25	10q23/C EP 1		ganancia	1,000	0,080	0,080	0,920		25			
3p14/C EP3	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,154	0,846	26	9p21/CE P9		ganancia	1,000	0,077	0,077	0,923		26			
8q24/C EP8	ganancia	1,000	0,148	0,148	0,148	0,852	27	17q21/C EP 1		ganancia	1,000	0,074	0,074	0,926		27			
10q23/ CEP 1	Ganancia	1,000	0,120	0,120	0,120	0,880	25	17p13/C EP 1		ganancia	1,000	0,037	0,037	0,963		27			
17q21/ CEP 1	pérdida	1,000	0,111	0,111	0,111	0,889	27	17q21/C EP 1		pérdida	1,000	0,037	0,037	0,963		27			
9p21/C EP9	ganancia	0,900	0,077	0,077	0,069	0,928	26	8q24/CE P8		pérdida	1,000	0,037	0,037	0,963		27			
8q24/C EP8	pérdida	1,000	0,037	0,037	0,037	0,963	27	8q24/CE P8		ganancia	1,000	0,037	0,037	0,963		27			
5p/q imbal.	pérdida	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	26	5p/q imbal.		pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000		26			
7p12/C EP7	pérdida	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	26	7p12/CE P7		pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000		26			

(continuación)

LÍMITE = 40% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 50% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
7p12	ganancia	1,000	0,385	0,385	0,615	26	CEP 1	ganancia	1,000	0,231	0,231	0,769	26
CEP 1	ganancia	1,000	0,346	0,346	0,654	26	LSI 20q	ganancia	1,000	0,211	0,211	0,789	19
LSI3q	ganancia	1,000	0,316	0,316	0,684	19	LSI3q	ganancia	1,000	0,211	0,211	0,789	19
CEP 6	ganancia	1,000	0,308	0,308	0,692	26	CEP 7	ganancia	1,000	0,192	0,192	0,808	26
CEP 7	ganancia	1,000	0,308	0,308	0,692	26	LSI5p15	ganancia	1,000	0,192	0,192	0,808	26
LSI 5p15	ganancia	1,000	0,308	0,308	0,692	26	7p12	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26
LSI20q	ganancia	1,000	0,211	0,211	0,789	19	CEP 11	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26
CEP 18	ganancia	1,000	0,200	0,200	0,800	25	CEP 3	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26
17q21	ganancia	1,000	0,185	0,185	0,815	27	CEP 6	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26
CEP 10	ganancia	1,000	0,160	0,160	0,840	25	CEP 12	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26
CEP 16	ganancia	1,000	0,158	0,158	0,842	19	LSI5q31	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26
CEP 4	ganancia	1,000	0,158	0,158	0,842	19	17q21	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27
CEP 11	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26	8q24	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27
CEP 12	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26	CEP 17	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27

(continuación)

LÍMITE = 40% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 50% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
CEP 3	ganancia	1,000	0,154	0,154	0,846	26	CEP 8	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27
CEP 17	ganancia	1,000	0,148	0,148	0,952	27	CEP 16	ganancia	1,000	0,105	0,105	0,895	19
3p14	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26	CEP 4	ganancia	1,000	0,105	0,105	0,895	19
9p21	pérdida	1,000	0,115	0,115	0,885	26	CEP 10	ganancia	1,000	0,080	0,080	0,920	25
CEP 9	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26	CEP 18	ganancia	1,000	0,080	0,080	0,920	25
LSI 21	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26	3p14	ganancia	1,000	0,077	0,077	0,923	26
LSI 5q31	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26	LSI 21	ganancia	1,000	0,077	0,077	0,923	26
17p13	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27	17p13	ganancia	1,000	0,074	0,074	0,926	27
8q24	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27	9p21	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26
CEP 8	ganancia	1,000	0,111	0,111	0,889	27	9p21	ganancia	1,000	0,038	0,038	0,962	26
10q23	ganancia	1,000	0,040	0,040	0,960	25	CEP 1	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26
9p21	ganancia	1,000	0,038	0,038	0,962	26	CEP 9	ganancia	1,000	0,038	0,038	0,962	26
CEP 1	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26	LSI 13	ganancia	1,000	0,037	0,037	0,963	27
CEP 9	pérdida	1,000	0,038	0,038	0,962	26	10q23	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25

(continuación)

LÍMITE = 40% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 50% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENSES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
17p13	pérdida	1,000	0,037	0,037	0,963	27	10q23	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	25
LSI 13	ganancia	1,000	0,037	0,037	0,963	27	17p13	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
10q23	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25	17q21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
17q21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	3p14	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
3p14	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	7p12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
7p12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	8q24	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
Sq24	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	CEP 10	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25
CEP 10	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25	CEP 11	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 11	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 12	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 16	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
CEP 16	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19	CEP 17	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 17	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	CEP 18	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25
CEP 18	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	25	CEP 3	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 3	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 4	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19

(continuación)

LÍMITE = 40% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS							LÍMITE = 50% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						
SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
CEP 4	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19	CEP 6	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 6	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
CEP 7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	CEP 8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
CEP 8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	CEP 9	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI 13	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	LSI 13	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
LSI20q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19	LSI 20q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
LSI 21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	LSI 21	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI3q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19	LSI3q	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	19
LSI 5p15	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	LSI5p15	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
LSI 5q31	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	LSI5q31	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
5p/q ímbal.	ganancia	1,000	0,192	0,192	0,808		26.5 p/q ímbal.	ganancia	1,000	0,115	0,115	0,885	26
17p13/ CEP 1	pérdida	1,000	0,185	0,185	0,815	27	17p13/C EP 1	pérdida	1,000	0,111	0,111	0,889	27
10q23/ CEP 1	pérdida	1,000	0,080	0,090	0,920	25	10q23/C EP 1	pérdida	1,000	0,080	0,080	0,920	25
3p14/C EP3	pérdida	1,000	0,077	0,077	0,923	26	3p14/CE P3	pérdida	1,000	0,077	0,077	0,923	26

(continuación)

SONDA		LÍMITE = 40% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS						LÍMITE = 50% DE CÉLULAS CON GANANCIAS O PÉRDIDAS					
PÉRDIDA / GANANCIA		ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES	SONDA	PÉRDIDA / GANANCIA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ES PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
9p21/C EP9	pérdida	1,000	0,077	0,077	0,923	26	9p21/CE P9	pérdida	1,000	0,077	0,077	0,923	26
9p21/C EP9	ganancia	1,000	0,038	0,038	0,962	26	5p/q Imbal.	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
5p/q Imbal.	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	10q23/C EP 1	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	25
10q23/ CEP 1	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	25	17p13/C EP 1	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	27
17p17 CEP 1	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	27	17q21/C EP 1	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
17q21/ CEP 1	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	17q21/C EP 1	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	27
17q21/ CEP 1	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	27	3p14/CE P3	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	26
3p14/C EP3 3	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	26	7p12/CE P7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26
7p12/C EP7	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	26	7p12/CE P7	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	26
7p12/C EP7	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	26	8q24/CE P8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27
8q24/C EP8	pérdida	1,000	0,000	0,000	1,000	27	8q24/CE P8	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	27
8q24/C EP8	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	27	9p21/CE P9	ganancia	1,000	0,000	0,000	1,000	26

Tabla 6 Combinaciones de 2, 3 y 4 Sondas a un Valor Límite del 10%

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ESPEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
Combinaciones de 2 sondas:								
CEP 17	ganancia			1,000	0,852	0,852	0,148	27
8q24	ganancia			1,000	0,846	0,846	0,154	26
8q24	ganancia			1,000	0,846	0,846	0,154	26
CEP 12	ganancia			1,000	0,846	0,846	0,154	26
17q21	ganancia			1,000	0,815	0,815	0,185	27
17q21	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
17q21	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
8q24	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
8q24	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
8q24	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
9p21	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
9p21	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 11	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 17	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 8	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
LSI 13	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
LSI 5q31	ganancia			1,000	0,808	0,808	0,192	26
LSI5p15	ganancia			0,875	0,842	0,737	0,201	19
17p13	ganancia			0,900	0,815	0,733	0,210	27
8q24	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 17	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
LSI 20q	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
LSI 20q	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
LSI 20q	ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19

(continuación)

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS'S PEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
Combinaciones de 2 sondas:	CEP 4	ganancia		1,000	0,789	0,789	0,211	19
LSI5p15 ganancia								
Combinaciones de 3 sondas:	8q24	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,885	0,885	0,115	26
9p21 ganancia	8q24	ganancia	CEP 1	ganancia	0,885	0,885	0,115	26
9p21 ganancia	9p21	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,885	0,885	0,115	26
CEP 12 ganancia	9p21	ganancia	8q24	ganancia	0,885	0,885	0,115	26
CEP 17 ganancia	9p21	ganancia	8q24	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	9p21	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	9p21	ganancia	CEP 1 -	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	CEP 12	ganancia	CEP 1	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	CEP 8	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	CEP 8	ganancia	CEP 1	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	LSI 13	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	LSI 13	ganancia	CEP 1	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
17q21 ganancia	8q24	ganancia	CEP 7	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
9p21 ganancia	8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
9p21 ganancia	8q24	ganancia	LSI5q31	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
9p21 ganancia	CEP 8	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
9p21 ganancia	CEP 8	ganancia	CEP 1	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
9p21 ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
9p21 ganancia	LSI5q31	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
CEP 11 ganancia	9p21	ganancia	8q24	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
CEP 12 ganancia	9p21	ganancia	CEP 6	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
CEP12 ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia	0,846	0,846	0,154	26
CEP 17 ganancia	9p21	ganancia	LSI5p15	ganancia	0,846	0,846	0,154	26

(continuación)

Combinaciones de 3 sondas:	CEP 17	ganancia	CEP 8	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	CEP 17	ganancia	CEP 9	ganancia	CEP 8	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	CEP 17	ganancia	CEP 9	ganancia	CEP 8	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	CEP 9	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,846	0,346	0,154	26		
	CEP 8	ganancia	LSI 5p31	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	CEP 8	ganancia	LSI5q31	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	LSI 13	ganancia	LSI5q31	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	LSI 13	ganancia	LSI5q31	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,846	0,846	0,154	26		
	Combinaciones de 4 sondas:	17q21	ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,885	0,115	26
		17q21	ganancia	9p21	ganancia	(CEP 8	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,115	26
17q21		ganancia	CEP 12	ganancia	9p21	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
17q21		ganancia	CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
17q21		ganancia	CEP 17	ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
17q21		ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
17q21		ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
9p21		ganancia	CEP 8	ganancia	LSI5q31	ganancia	LSI3p15	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
9p21		ganancia	CEP 8	ganancia	LSI5q31	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
CEP 12		ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,11S	26	
CEP 12		ganancia	9p21	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
CEP 12		ganancia	9p21	ganancia	CEP 3	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,885	0,115	26	
CEP 17		ganancia	9p21	ganancia	CEP 9	ganancia	CEP 8	ganancia	1,000	0,883	0,115	26	
CEP 17	ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,895	0,115	26		
CEP 17	ganancia	9p21	ganancia	CEP8	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,885	0,115	26		
CEP 17	ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,895	0,115	26		
CEP 17 1	ganancia	CEP 12	ganancia	9p21	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,885	0,115	26		

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas:								
CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	CEP 9	ganancia	1,000
CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000
CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000
CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000
LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	LSI5q31	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000
LSI 13	ganancia	9p21	ganancia	LSI5q31	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000
LSI 13	ganancia	CEP 12	ganancia	9p21	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000
CEP 17	ganancia	CEP 10	ganancia	9p21	ganancia	CEP 8	ganancia	1,000
CEP 17	ganancia	LSI 13	ganancia	CEP 10	ganancia	9p21	ganancia	1,000

Tabla 7 Combinaciones de 2, 3 y 4 Sondas a un Valor Límite del 20%

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ESPEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
Combinaciones de 2 sondas:								
LSI5p15 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,737	0,131	0,263	19
LSI20q ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,131	0,737	0,263	19
LSI5p15 ganancia	CEP 4 ganancia			1,000	0,737	0,131	0,263	19
17q21 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,731	0,731	0,269	26
8q24 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,731	0,731	0,269	26
CEP 6 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,731	0,731	0,269	26
CEP 9 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,009	0,731	0,731	0,269	26
LSI5p15 ganancia	3p14 ganancia			1,000	0,731	0,731	0,269	26
LSI5p15 ganancia	CEP 3 ganancia			1,000	0,731	0,731	0,269	26
5p/q imbal. ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
5p/q imbal. ganancia	LSI 5q31 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
7p12 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
8q24 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
8q24 ganancia	CEP 6 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
CEP 12 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
CEP 17 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
CEP 7 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
CEP 8 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
CEP 9 ganancia	3p14 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
LSI 13 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
LSI5p15 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
7p12 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19
CEP 12 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19
CEP 7 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19

(continuación)

Combinaciones de 2 sondas:		LSI3q	ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19
Combinaciones de 3 sondas y comb de 3 sondas (1 rat + 1 abs)										
CEP 12	ganancia	LSI5p15	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,842	0,842	0,158	19
5 p/q imbal.	ganancia	LSI5q31	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,799	0,789	0,211	19
8q24	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 4	ganancia	1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 12	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP4	ganancia	1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,789	0,789	0,211	19
CEP 16	ganancia	CEP 12	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,789	0,789	0,211	19
LSI 20q	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,789	0,789	0,211	19
LSI 20q	ganancia	CEP 12	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,789	0,789	0,211	19
17q21	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
17q21	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
17q21	ganancia	CEP 12	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
17q21	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
17q21	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
5 p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
3 p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
5 p/q imbal	ganancia	LSI 5q31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
5 p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
8q24	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
8q24	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26
8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	0,231	26

(continuación)

Combinaciones de 3 sondas y comb de 3 sondas (1 rat + 1 abs)									
8q24	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
8q24	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 12	ganancia	CEP9	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 12	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 12	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 6	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 6	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 6	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 6	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 9	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 9	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 9	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
CEP 9	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,769	0,769	26
Combinaciones de 4 sondas y comb de 4 sondas (1 rat + 2 abs)									
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 4	0,842	0,842	19
CEP 12	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	ganancia	LSI3q	0,842	0,842	19
CEP 16	ganancia	CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI5p15	0,842	0,842	19
LSI 20q	ganancia	CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI5p15	0,842	0,842	19
17p13	ganancia	CEP 9	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	CEP 3	0,808	0,808	26
17q21	ganancia	CEP 12	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	0,808	0,808	26
17q21	ganancia	CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	0,908	0,808	26

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas y comb. de 4 sondas (1 rat + 2abs)													
17q21	ganancia	CEP 12	ganancia	LSI5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	CEP 12	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	8q24	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI5p31	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	8q24	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
17q21	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
8q24	ganancia	5 p/q imbal	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
9p21	ganancia	8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	Sq24	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 9	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI Sq31	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,192	26		

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas y comb de 4 sondas (1 rat + 2abs)												
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	5p/qimbal.	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	5p/qimbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p 15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 12	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 6	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 6	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 6	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 6	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	5p/qimbal.	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,808	0,908	0,192	26
CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	5p/qimbal.	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP9 9	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	5p/qimbal.	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	3p14	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5q31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26
CEP 9	ganancia	5p/q imbal.	ganancia	LSI 5p15	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,808	0,808	0,192	26

Tabla 8 Combinaciones de 2, 3 y 4 Sondas a un Valor Límite del 30%

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ESPEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
Combinaciones de 2 sondas:								
CEP 6 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,692	0,692	0,308	26
CEP 16 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19
LSI 20q ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19
LSI5p15 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,684	0,684	0,316	19
17q21 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,654	0,654	0,346	26
7p12 ganancia	CEP 6 ganancia			1,000	0,654	0,654	0,346	26
7p12 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,654	0,654	0,346	26
CEP 7 ganancia	CEP 6 ganancia			1,000	0,654	0,654	0,346	26
LSI5p15 ganancia	3p14 ganancia			1,000	0,654	0,654	0,346	26
10q23 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,640	0,640	0,360	25
CEP 10 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,640	0,640	0,360	25
LSI5p15 ganancia	CEP 4 ganancia			1,000	0,632	0,632	0,368	19
LSI 5q31 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,632	0,632	0,368	19
17p13 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,383	26
8q24 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
CEP 17 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
CEP 6 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
CEP 6 ganancia	LSI5q31 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
CEP 7 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
CEP 8 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
LSI 13 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
LSI5p15 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
LSI5p15 ganancia	CEP 3 ganancia			1,000	0,615	0,615	0,385	26
CEP 18 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,600	0,600	0,400	25
7p12 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,579	0,379	0,421	19
CEP 16 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 16 ganancia	LSI5p31 ganancia			1,000	0,579	0,579	0,421	19

(continuación)

Combinaciones de 2 sondas:		LSI 3q	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)		1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 7	ganancia	3p14	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	7p12	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 20q	ganancia	7p12	ganancia		CEP 6	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 20q	ganancia	CEP 12	ganancia		CEP 7	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 20q	ganancia	CEP 3	ganancia		5 p/q	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 20q	ganancia	CEP 6	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 20q	ganancia	LSI 5q31	ganancia		7p12	1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 7	ganancia	CEP 6	ganancia		CEP 6	1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 6	ganancia	CEP 7	ganancia		CEP 7	1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 6	ganancia	5 p/q	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
5 p/q imbal	ganancia	imbal.	imbal.		LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
8q24	ganancia	LSI 5q31	ganancia		LSI 3q	1,000	0,579	0,579	0,421	19
8q24	ganancia	LSI 5q31	ganancia		LSI 3q	1,000	0,579	0,579	0,421	19
CEP 16	ganancia	3 p/q	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
LSI 20q	ganancia	imbal.	imbal.		LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	5 p/q	ganancia		LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	imbal.	imbal.		LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	8q24	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	LSI 5p15	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	CEP 17	ganancia		LSI 5p15	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	CEP 7	ganancia		LSI 5p15	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	CEP 8	ganancia		LSI 5p15	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	LSI 13	ganancia	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	LSI 5p15	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	LSI 5p15	ganancia		CEP 3	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	LSI 5p15	ganancia		CEP 1	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13	ganancia	LSI 5p15	ganancia		CEP 1	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17p13/CEP	pérdida	LSI 5p15	pérdida	Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)	LSI 5p15	1,000	0,579	0,579	0,421	19
17q21	ganancia	5 p/q	ganancia		LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
		imbal.	imbal.		LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19
					LSI 5q31	1,000	0,579	0,579	0,421	19

(continuación)

Combinaciones de 3 sondas < comb 4 y 3 sondas (1 rat + 1 abs)																	
17q21	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5p31	ganancia												26
5 p/q imbal	ganancia	LSI 5p31	ganancia	3p14	ganancia												26
7p12	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI 5p31	ganancia												26
7p12/CEP7	ganancia	CEP 7	ganancia	LSI5p15	ganancia												26
8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia												26
9p21	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia												26
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5q31	ganancia												26
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI Sq31	ganancia												26
CEP 17	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI Sq31	ganancia												26
CEP 6	ganancia	LSI Sq31	ganancia	CEP 3	ganancia												26
CEP 6	ganancia	LSI Sq31	ganancia	CEP 1	ganancia												26
CEP 8	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI 5q31	ganancia												26
CEP 9	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia												26
10q23	ganancia	3 p/q imbal.	ganancia	LSI Sq31	ganancia												25
CEP 10	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	LSI Sq31	ganancia												25
CEP 18	ganancia	17p13	ganancia	LSI5p15	ganancia												25
Combinaciones de 4 sondas < comb 4 y 4 sondas (1 rat + 2 abs)																	
17p13/CEP 17	pérdida	CEP 6	ganancia	LSI 5p15	ganancia												26
17p13/CEP 17	pérdida	CEP 6	ganancia	LSI Sq31	ganancia												26
17p13/CEP 17	pérdida	CEP 7	ganancia	CEP 6	ganancia												26
7p12	ganancia	CEP 6	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia												26
9p21	ganancia	8q24	ganancia	CEP 6	ganancia												26

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas < comb 4 y 4 (1 rat + 2 abs)																			
CEP 7	ganancia	CEP 6	ganancia	ganancia	5p/q imbal.	ganancia													
CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,692	0,692	0,308	26						
8q24	ganancia	7p12	ganancia	ganancia	LSI3q	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,692	0,692	0,308	26						
8q24	ganancia	7p12	ganancia	ganancia	LSI3q	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
8q24	ganancia	CEP 7	ganancia	ganancia	LSI3q	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
8q24	ganancia	CEP 7	ganancia	ganancia	LSI3q	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	LSI Sq31	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	LSI 5q31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	LSI 5q31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	CEP 11	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316 6	19						
CEP 16	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	CEP 7	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	LSI Sq31	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
CEP 16	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	Bq24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	LSI Sq31	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	7p12	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	8q24	ganancia	ganancia	LSI Sq31	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	9p21	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	9p21	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	9p21	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	CEP 11	ganancia	ganancia	8q24	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	9p21	ganancia	8q24	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						
LSI20q	ganancia	CEP 12	ganancia	ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	1,000	0,684	0,684	0,316	19						

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas < comb 4 y 4 (1 rat + 1 abs)											
LSI 20q	ganancia	CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,684	0,316	19
LSI 20q	ganancia	CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	CEP 7	ganancia	1,000	0,684	0,316	19
LSI 20q	ganancia	CEP 12	ganancia	8q24	ganancia	LSI5q31	ganancia	1,000	0,684	0,316	19
LSI 20q	ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,684	0,316	19
LSI 20q	ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	3p14	ganancia	1,000	0,684	0,316	19
LSI 20q	ganancia	CEP 9	ganancia	8q24	ganancia	CEP 3	ganancia	1,000	0,684	0,316	19

Tabla 9 Combinaciones de 2, 3 y 4 Sondas a un Valor Límite del 40%

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	SENS*ESPEC	VECTOR	Nº DE ESPECÍMENES TUMORALES
Combinaciones de 2 sondas:								
7p12 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,579	0,379	0,421	19
7p12 ganancia	CEP 6 ganancia			1,000	0,538	0,538	0,462	26
LSI 7q ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,326	0,526	0,474	19
CEP 6 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,500	0,500	0,500	26
CEP 7 ganancia	CEP 6 ganancia			1,000	0,500	0,500	0,500	26
CEP 18 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,480	0,480	0,520	25
7p12 ganancia	CEP 4 ganancia			1,000	0,474	0,474	0,526	19
CEP 16 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,474	0,474	0,526	19
CEP 7 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,474	0,474	0,526	19
LSI 20q ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,474	0,474	0,526	19
LSI5p15 ganancia	LSI3q ganancia			1,000	0,474	0,474	0,526	19
7p12 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,462	0,462	0,538	26
CEP 10 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,440	0,440	0,560	25
CEP 18 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,440	0,440	0,560	25
7p12 ganancia	LSI Sq31 ganancia			1,000	0,423	0,423	0,577	26
CEP 11 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,423	0,423	0,577	26
CEP 6 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,423	0,423	0,577	26
CEP 7 ganancia	LSI5p15 ganancia			1,000	0,423	0,423	0,577	26
LSI5p15 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,423	0,423	0,577	26
CEP 16 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,421	0,421	0,579	19
CEP 16 ganancia	CEP 7 ganancia			1,000	0,421	0,421	0,379	19
CEP 4 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,421	0,421	0,579	19
LSI 20q ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,421	0,421	0,579	19
LSI 20q ganancia	CEP 7 ganancia			1,000	0,421	0,421	0,579	19
10q23 ganancia	7p12 ganancia			1,000	0,400	0,400	0,600	25
CEP 10 ganancia	CEP 1 ganancia			1,000	0,400	0,400	0,600	25
CEP 18 ganancia	CEP 7 ganancia			1,000	0,400	0,400	0,600	25

(continuación)

Combinaciones de 2 sondas:		ganancia	ganancia			1,000	0,385	0,385	0,615	26
CEP 11	ganancia	CEP 1	ganancia			1,000	0,385	0,385	0,615	26
CEP 11	ganancia	CEP 7	ganancia			1,000	0,385	0,385	0,615	26
CEP 12	ganancia	CEP 6	ganancia			1,000	0,383	0,385	0,615	26
Combinaciones de 3 sondas:										
CEP 11	ganancia	7p12	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,577	0,577	0,423	26
CEP 11	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,538	0,538	0,462	26
CEP 11	ganancia	CEP 7	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,538	0,538	0,462	26
17q21	ganancia	CEP 7	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 11	ganancia	7p12	ganancia	CEP 4	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 11	ganancia	CEP 7	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 16	ganancia	CEP 11	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 16	ganancia	CEP 7	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 7	ganancia	CEP 6	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 7	ganancia	LSI5p15	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
LSI 20q	ganancia	CEP 11	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
LSI 20q	ganancia	CEP 7	ganancia	LSI3q	ganancia	1,000	0,526	0,526	0,474	19
CEP 18	ganancia	10q23	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,520	0,520	0,480	25
CEP 18	ganancia	CEP 10	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,520	0,520	0,480	25
CEP 18	ganancia	CEP 6	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,520	0,520	0,480	25
CEP 18	ganancia	CEP 7	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,520	0,320	0,480	23
CEP 11	ganancia	7p12	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	26
CEP 18	ganancia	7p12	ganancia	CEP 4	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	18
CEP 18	ganancia	CEP 16	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	18
LSI 20q	ganancia	CEP 18	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,500	0,500	0,500	18
10q23	ganancia	7p12	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,480	0,480	0,520	25
CEP 10	ganancia	7p12	ganancia	LSI5p15	ganancia	1,000	0,480	0,480	0,520	25
CEP 11	ganancia	CEP 10	ganancia	7p12	ganancia	1,000	0,480	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	10q23	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,480	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	CEP 10	ganancia	CEP 1	ganancia	1,000	0,480	0,480	0,520	25

[illegible]

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas:												
CEP 18	ganancia	17q21	ganancia	10q23	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	1,000	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	17q21	ganancia	CEP 10	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	1,000	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	CEP 10	ganancia	CEP 7	ganancia	ganancia	LSI 5p13	ganancia	1,000	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	CEP 11	ganancia	10q23	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	1,000	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	CEP 11	ganancia	CEP 10	ganancia	ganancia	CEP 7	ganancia	1,000	0,480	0,520	25
CEP 18	ganancia	CEP 9	ganancia	CEP 6	ganancia	ganancia	LSI 5p15	ganancia	1,000	0,480	0,520	25
17p13/CEP 17	pérdida	CEP 6	ganancia	L51 5p15	ganancia	ganancia			1,000	0,462	0,538	26
17p13/CEP 17	pérdida	CEP 7	ganancia	LSI5p15	ganancia	ganancia			1,000	0,462	0,538	26
17p13/CEP 17	pérdida	LSI5p15	ganancia	CEP 1	ganancia	ganancia			1,000	0,462	0,538	26
9p21/CEP 9	pérdida	CEP 6	ganancia	LSI5p15	ganancia	ganancia			1,000	0,462	0,538	26
CEP 11	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	CEP 1	ganancia	ganancia			1,000	0,462	0,538	26
CEP 11	ganancia	CEP 7	ganancia	5 p/q imbal.	ganancia	ganancia			1,000	0,462	0,538	26
CEP 12	ganancia	CEP 11	ganancia	CEP 9	ganancia	ganancia	CEP 6	ganancia	1,000	0,462	0,538	26

Tabla 10 Análisis de Secreciones Bronquiales de 21 pacientes por Citología, Biopsia Bronquial y FISH

Especimen, I.D.	Diagnóstico Clínico	Resultado Citológico	Biopsia Bronquial	Biopsia Adicional	Resultado FISH	
					Sondas Indicadoras de Ganancia	Diagnóstico FISH
Nº 3933	Adenocarcinoma de Células Pequeñas	positivo	positivo	no realizada	LSI5p15	positivo
43912	Adenocarcinoma de Células Escamosas	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP1 CEP 6	positivo
Nº 3911	Adenocarcinoma de Células Escamosas	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP I CEP 6	positivo
Nº 2870	Adenocarcinoma Mesenquimal	negativo	negativo	positivo	LSI 5p15, CEP 6	positivo
Nº 30582	Adenocarcinoma	positivo	no realizada	no realizada	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP1 CEP 6	positivo
Nº 1993	Metástasis de Adenocarcinoma de mama	positivo	positivo	positivo	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP1 CEP 6	positivo
Nº 2786	Adenocarcinoma de Células Grandes	negativo	negativo	positivo	ninguna	negativo
Nº 2789	Sin malignidad	negativo	negativo	no realizada	ninguna	negativo
Nº 2545	Adenocarcinoma de Células Pequeñas	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP1	positivo
Nº 3700	Adenocarcinoma	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24,LS 5p15	positivo
Nº 2363	Adenocarcinoma de Células Grandes	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP1	positivo
Nº 3739	Adenocarcinoma de Células Escamosas	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24, LSI 5p15, CEP1	positivo
Nº 30796	Adenocarcinoma de Células Pequeñas	positivo	positivo	no realizada	LSI 8q24, LSI5p15	positivo
030671	Adenocarcinoma	positivo	negativo	positivo	LSI 8q24, LSI5p15	positivo
Nº 1864	Metástasis de Adenocarcinoma de Pecho	positivo	negativo	positivo	LSI 8q24, LSI5p15	positivo
Nº 2546	Adenocarcinoma de Células Grandes	negativo	no realizada	positivo	-	no evaluado*
Nº 2377	Sin malignidad	negativo	negativo	no realizada	ninguna	negativo
Nº 2251	Sin malignidad	negativo	no realizada	negativo	ninguna	negativo

(continuación)

					Resultado FISH	
Espécimen, I.D.	Diagnóstico Clínico	Resultado Citológico	Biopsia Bronquial	Biopsia Adicional	Sondas Indicadoras de Ganancia	Diagnóstico FISH
Nº 2603	Sin malignidad	negativo	negativo	no realizada	ninguna	negativo
Nº 2785	Sin malignidad	negativo	negativo	Positivo para adenocarcinoma epifaríngeo	ninguna	negativo
Nº 30706	Erróneo	negativo	No realizada	errónea	ninguna	negativo
*la morfología celular era demasiado pobre para permitir la evaluación,						

Tabla 11 Realización de Citología Convencional en Comparación con Diagnóstico Clínico

Resultado Citológico	Diagnóstico Clínico	
	negativo	positivo/erróneo
negativo	5	4
positivo	0	12
especificidad = 100% sensibilidad = 75% sensibilidad = 80% excluyendo el portaobjetos no evualdo por FISH		

Tabla 12 Realización por FISH en Comparación con Diagnóstico Clínico

Resultado FISH	Diagnóstico Clínico	
	negativo	positivo/erróneo
negativo	5	2
positivo	0	13
no evaluado	0	1
especificidad = 100% sensibilidad = 81% incluyendo el portaobjetos FISH no evaluable sensibilidad = 87% excluyendo el portaobjetos FISH no evaluable		

Tabla 13 Conjuntos de Sondas Basadas en Análisis Discriminativo y Combinatorial

				VALOR DEL VECTOR				
SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	LÍMITE = 5	LÍMITE = 10	LÍMITE = 20	LÍMITE = 3	LÍMITE = 40
Sondas Sencillas:								
LSI5p15				0,407	0,231	0,346	0,423	0,692
CEP 1				0,077	0,346	0,462	0,615	0,654
CEP 6				0,287	0,385	0,500	0,500	0,692
ISI7p12				0,619	0,324	0,385	0,500	0,615

(continuación)

Sondas Sencillass:				0,210	0,222	0,556	0,778	0,889
LSI8q24				0,287	0,346	0,577	0,808	0,885
Combinaciones de 2 sondas:								
LSI5p15	LSI 8q24				0,154	0,269	0,385	
LSI5p15	LSI 3q					0,211	0,316	0,526
LSI5p15	LSI20q					0,263	0,316	
LSI5p15	LSI 7p12					0,380	0,346	0,538
LSI5p15	CEP 16					0,263	0,316	
LSI5p15	CEP 4					0,263	0,368	
LSI5p15	CEP 12				0,154	0,308	0,368	
LSI5p15	CEP 6					0,269	0,308	0,577
LSI5p15	LSI 17q21				0,192	0,269	0,346	
LSI8q24	CEP 17				0,148			
LSI8q24	CEP 1				0,154			
LSI8q24	CEP 6				0,192	0,308		
LSI7p12	LSI 3q					0,316	0,421	0,421
LSI7p12	CEP 6						0,346	0,462
LSI 3q	CEP 7					0,316	0,421	0,526
CEP 6	CEP 7						0,346	0,500
Combinaciones de 3 sondas:								
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 9p21			0,115			
LSI5p15	CEP 12	LSI 9p21			0,115			
LSI8q24	CEP 17	LSI 9p21			0,115			
LSI8q24	CEP1	LSI 9p21			0,115			
LSI 5p15	LSI 3q	CEP 12				0,158		
Combinaciones de 4 sondas:								
LSI5p15	CEP 6	LSI 17p13 (pérdida)	CEP 17				0,269	
Combinaciones de sondas con complementación redundante:								

(continuación)

Combinaciones de 3 sondas (suma de 2 pares de sondas con sondas en común)								
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 3q						
LSI5p15	LSI 8q24	LSI20q						
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 7p12						
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 16						
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 4						
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 12						
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 6						
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 17q21						
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 17						
LSI5p15	LSI 8q24	CEP1						
LSI5p15	LSI 3q	LSI20q						
LSI5p15	LSI 3q	LSI 7p12						
LSI5p15	LSI 3q	CEP 16						
LSI5p15	LSI 3q	CEP 4						
LSI5p15	LSI 3q	CEP 12						
LSI5p15	LSI 3q	CEP 6						
LSI5p15	LSI 3q	LSI 17q21						
LSI5p15	LSI 3q	CEP 7						
LSI5p15	LSI 3q	LSI 7p12						
LSI5p15	LSI20q	LSI 7p12						
LSI5p15	LSI20q	CEP 16						
LSI5p15	LSI20q	CEP 4						
LSI5p15	LSI20q	CEP 12						
LSI5p15	LSI20q	CEP 6						
LSI5p15	LSI20q	LSI 17q21						
LSI5p15	LSI 7p12	CEP 16						
LSI5p15	LSI 7p12	CEP4 4						
LSI5p15	LSI 7p12	CEP 12						
LSI5p15	VLSI 7p12	CEP 6						
LSI5p15	LSI 7p12	LSI 17q21						

(continuación)

Combinaciones de 3 sondas (suma de 2 pares de sondas con sondas en común)								
LSI5p15	LSI 7p12	LSI 3q						
LSI5p15	LSI 7p12	CEP 6						
LSI5p15	CEP 16	CEP 4						
LSI5p15	CEP 16	CEP 12						
LSI5p15	CEP 16	CEP 6						
LSI5p15	CEP 16	LSI 17q21						
LSI5p15	CEP 4	CEP 12						
LSI5p15	CEP 4	CEP 6						
LSI5p15	CEP 4	LSI 17q21						
LSI5p15	CEP 12	CEP 6						
LSI5p15	CEP 12	LSI 17q21						
LSI5p15	CEP 6	LSI 17q21						
LSI5p15	CEP 6	CEP 7						
LSI8q24	CEP 17	CEP1						
LSI8q24	CEP 17	CEP 6						
LSI8q24	CEP1	CEP 6						
LSI8q24	LSI 7p12	CEP 6						
LSI8q24	CEP 6	CEP 7						
LSI7p12	LSI 3q	CEP 6						
LSI7p12	LSI 3q	CEP 7						
LSI7p12	CEP 6	CEP 7						
LSI 3q	CEP 6	CEP 7						
Combinaciones de 4 sondas - 2 pares complementarios redundantes								
LSI5p15	LSI 8q24	7p12	LSI 3q					
LSI5p15	LSI 8q24	7p12	CEP 6					
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 3q	CEP 7					
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	LSI 3q	8q24	CEP 17					
LSI5p15	LSI 3q	8q24	CEP1					
LSI5p15	LSI 3q	8q24	CEP 6					
LSI5p15	LSI 3q	7p12	CEP 6					
LSI5p15	LSI 3q	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	LSI20q	8q24	CEP 17					
LSI5p15	LSI20q	8q24	CEP1					
LSI5p15	LSI20q	8q24	CEP 6					
LSI5p15	LSI20q	7p12	LSI 3q					

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas - 2 pares complementarios redundantes								
LSI5p15	LSI20q	7p12	CEP 6					
LSI5p15	LSI20q	LSI 3q	CEP 7					
LSI5p15	LSI20q	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	7p12	8q24	CEP 17					
LSI5p15	7p12	8q24	CEP1					
LSI5p15	7p12	8q24	CEP 6					
LSI5p15	7p12	LSI 3q	CEP 7					
LSI5p15	7p12	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	CEP 16	LSI 8q24	CEP 17					
LSI5p15	CEP 16	LSI 8q24	CEP1					
LSI5p15	CEP 16	LSI 8q24	CEP 6					
LSI5p15	CEP 16	LSI 7p12	LSI 3q					
LSI5p15	CEP 16	LSI 7p12	CEP 6					
LSI5p15	CEP 16	LSI 3q	CEP 7					
LSI5p15	CEP 16	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	CEP 4	LSI 8q24	CEP 17					
LSI5p15	CEP 4	LSI 8q24	CEP1					
LSI5p15	CEP 4	LSI 8q24	CEP 6					
LSI5p15	CEP 4	LSI 7p12	LSI 3q					
LSI5p15	CEP 4	LSI 7p12	CEP 6					
LSI5p15	CEP 4	LSI 3q	CEP 7					
LSI5p15	CEP 4	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	CEP 12	LSI 8q24	CEP 17					
LSI5p15	CEP 12	LSI 8q24	CEP I					
LSI5p15	CEP 12	LSI 8q24	CEP 6					
LSI5p15	CEP 12	LSI 7p12	LSI 3q					
LSI5p15	CEP 12	LSI 7p12	CEP 6					
LSI5p15	CEP 12	LSI 3q	CEP 7					
LSI5p15	CEP 12	CEP 6	CEP 7					
LSI5p15	CEP 6	LSI 8q24	CEP 17					
LSI5p15	CEP 6	LSI 8q24	CEP I					
LSI5p15	CEP 6	LSI 7p12	LSI 3q					
LSI5p15	CEP 6	LSI 3q	CEP 7					

(continuación)

Combinaciones de 4 sondas-2 pares complementarios redundantes							
LSI5p15	LSI 17q21	LSI 8q24	CEP 17				
LSI5p15	LSI 17q21	LSI 8q24	CEP1				
LSI5p15	LSI 17q21	LSI 8q24	CEP 6				
LSI5p15	LSI 17q21	LSI 7p12	LSI 3q				
LSI5p15	LSI 17q21	LSI 7p12	CEP 6				
LSI5p15	LSI 17q21	LSI 3q	CEP 7				
LSI5p15	LSI 17q21	CEP 6	CEP 7				
LSI8q24	CEP 17	LSI 7p12	LSI 3q				
LSI8q24	CEP 17	LSI 7p12	CEP 6				
LSI8q24	CEP 17	LSI 3q	CEP 7				
LSI8q24	CEP 17	CEP 6	CEP 7				
LSI8q24	CEP	LSI 7p12	LSI 3q				
LSI8q24	CEP I	LSI 7p12	CEP 6				
LSI8q24	CEP1	LSI 3q	CEP 7				
LSI8q24	CEP I	CEP 6	CEP 7				
LSI8q24	CEP 6	LSI 7p12	LSI 3q				
LSI8q24	CEP 6	LSI 3q	CEP 7				
LSI7p12	LSI 3q	CEP 6	CEP 7				
LSI7p12	CEP 6	LSI 3q	CEP 7				
Combinaciones de 4 sondas - 3 pares con 2 sondas comunes							
ejemplos:							
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 3q	CEP1	(pares de sondas en filas 17 +18+27)			
LSI5p15	LSI 8q24	LSI 3q	CEP 6	(pares de sondas en filas 17 +18+28)			
LSI5p15	LSI 8q24	CEP 1	CEP 6	(pares de sondas en filas 17 +24+27)			
LSI7p12	LSI 3q	CEP 6	CEP 7	(pares de sondas en filas 29 +30+31)			

Ejemplo 5: Detección de cáncer de pulmón en especímenes de lavado bronquial

5 El presente estudio usó un ensayo interfase de FISH (usando un panel de FISH multicolor de 4 sondas) para detectar cáncer de pulmón en 74 especímenes de lavado bronquial que previamente se habían caracterizado por análisis citológico. Cuarenta y ocho de los especímenes procedían de pacientes con un diagnóstico clínico positivo para cáncer y 26 de los especímenes procedían de pacientes con un diagnóstico clínico negativo para cáncer.

10 Los especímenes de lavado bronquial se seleccionaron de los archivos citopatológicos del Instituto de Patología en Basel, Suiza. Estos especímenes citológicos se tiñeron previamente con tinción PAP y se montaron

permanentemente con cubreobjetos. Los especímenes se archivaron durante un periodo de tiempo que variaba de algunos meses a dos años.

Las cuatro sondas usadas para el ensayo de FISH incluyeron una sonda de secuencia repetitiva centromérica para cromosoma 1 (CEP 1) y tres sondas de secuencia única para los locus 5p15, 8q24 (que contenían el gen c-myc) y 7p12 (que contenía el gen EGFR), marcadas con SpectrumAqua™, SpectrumGreen™, SpectrumGold™ y SpectrumRed™, respectivamente. Las sondas se mezclaron entre sí y se hibridaron simultáneamente con cada espécimen de lavado bronquial.

Los portaobjetos de los archivos se sumergieron en xileno hasta que los cubreobjetos se desprendieron (aproximadamente 4-5 días) y después se lavaron dos veces en xileno reciente, 5 minutos por lavado. Después, los portaobjetos se colocaron en etanol al 95%, etanol a 85% y etanol al 70%, secuencialmente (5 minutos por solución), seguido por inmersión de los portaobjetos en tampón 2xSSC durante 1 minuto. Después los portaobjetos se incubaron en 0,5 mg/ml de solución de pepsina en HCl 10 mM durante 10 minutos a 37 °C, seguido de un lavado con PBS durante 5 minutos. Los portaobjetos se fijaron en una solución recién preparada de formalina tamponada neutra al 1% durante 5 minutos a 4 °C, seguido de inmersión en PBS durante 5 minutos. Después los portaobjetos se desnaturalizaron durante 10 minutos en formamida al 70%/2xSSC a 73 °C, se deshidrataron en series de etanol al 70%, 85% y 100% (5 minutos por solución) y se pusieron en un calentador de portaobjetos a 37-45 °C durante 1 minuto para secar. Las sondas en la mezcla de hibridación se desnaturalizaron colocando el tubo que contenía la mezcla en un baño con agua a 73 °C durante 5 minutos. Las mezclas de hibridación de sondas desnaturalizadas se aplicaron a los especímenes, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con adhesivo de caucho. Los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante una noche, después de lo cual los portaobjetos se lavaron en 2xSSC/NP40 al 0,3% a 73 °C durante 2-5 minutos. Después, los portaobjetos se colocaron en 2xSSC/NP40 al 0,1% durante varios segundos a varios minutos. Se aplicó DAPI II a las zonas diana y los portaobjetos se analizaron al microscopio de fluorescencia usando conjuntos de filtro de pase de banda sencillos.

Los portaobjetos con los especímenes se evaluaron con un microscopio de fluorescencia para evaluar primero la calidad técnica de las señales de FISH y la tinción de fondo. Si la calidad era aceptable, entonces los portaobjetos se enumeraban. El aspecto global de las muestras se evaluó con un conjunto de filtros de pase de banda sencillo DAPI a un aumento de 40x. Fue importante observar las siguientes características de la muestra: 1) la presencia de fibras mucosas finas o gruesas; 2) el grado al cual las células quedaban atrapadas dentro de las fibras mucosas; 3) la presencia de pleomorfismo nuclear y 4) la presencia de células rotas (sin bordes nucleares claros, forma amorfa). Solamente se seleccionaron células o grupos de células para determinar la enumeración de señal si poseían bordes nucleares claramente definidos y preferiblemente estaban en las zonas sin fibras mucosas.

La enumeración se realizó de acuerdo con las siguientes normas usando el conjunto de filtros de paso de banda DAPI sencillos y los tres conjuntos de filtros de pase de banda sencillos específicos de sondas (Vysis aqua, verde, oro y rojo). En todas las evaluaciones de especímenes realizadas, el evaluador desconocía la identidad del espécimen.

(1) Seleccionar la zona con células apropiada usando el conjunto de filtros de paso de banda DAPI sencillos.

(2) Cambiar el conjunto de filtros de paso de banda sencillos oro o verde y observar el campo. Si existen células con ganancia de copia de señal, registrar el modelo del número de copias en aquellas células para las 4 sondas, cambiando secuencialmente a los otros tres conjuntos de filtros de paso de banda sencillos específicos de sonda (el orden no es importante). Si las células se ven disómicas con el conjunto de filtros dorado o verde, cambiar a uno de los otros tres conjuntos de filtros específicos de sonda y observar el campo. Si existen células con ganancia de copia de señal, registrar su patrón de señal para las 4 sondas. Realizar esto hasta haber escaneado el campo con los 4 conjuntos de filtros específicos de sonda. Registrar solo una vez el patrón de cada célula.

(3) Ir a una nueva zona y repetir la evaluación.

(4) Detener la enumeración cuando se califiquen al menos 25 células o se alcance el final del portaobjetos.

Los resultados de enumeración del número de copias de señal para cada sonda se analizaron usando el programa informático estadístico JMP versión 3.2.

Las muestras usadas en este estudio se seleccionaron de manera que aproximadamente la mitad de los 48 especímenes con un diagnóstico clínico de cáncer también se diagnosticaron como positivos por citología y aproximadamente la mitad se diagnosticaron como negativos por citología. La mayoría de los especímenes positivos a cáncer procedían de pacientes con adenocarcinoma (23 especímenes), seguido de pacientes con carcinoma de células escamosas (11 especímenes). El resto de los especímenes procedían de pacientes con carcinoma de células grandes (6 especímenes), carcinoma de células pequeñas (6 especímenes), tumor carcinoideo (1 espécimen) y leiomioma (1 espécimen). Los 26 especímenes clínicamente negativos para cáncer tuvieron resultados citológicos negativos. No se seleccionaron especímenes con diagnóstico clínico negativo y un resultado citológico positivo (la especificidad de la citología en este estudio fue del 100% por diseño).

La Tabla 14 muestra la distribución de los resultados citológicos en la cohorte de pacientes que se usó en este estudio. Los resultados citológicos fueron positivos para 22 pacientes, negativos para 48 pacientes y dudosos para 4 pacientes. La sensibilidad de la citología para el grupo de 48 muestras positivas a cáncer mediante diagnóstico clínico fue del 45,8%. Trece especímenes se rechazaron de evaluación FISH debido a la excesiva pérdida de tejido (9 especímenes de pacientes positivos a cáncer y 4 especímenes de pacientes negativos a cáncer). Se excluyeron los portaobjetos que no se evaluaron por FISH, la sensibilidad de la citología para los 39 pacientes restantes positivos a cáncer fue del 50%. Si se contaban las muestras de citología dudosa como positivas, la sensibilidad de la citología aumentaba al 53,9%.

Tabla 14 Correlación entre resultados citológicos y diagnóstico clínico

Citología	Diagnóstico clínico	
	Negativo a Cáncer	Positivo a Cáncer
Citología negativa	26 (100%)	22 (45,83%)
Citología positiva	0 (0%)	22 (45,83%)
Citología dudosa	0 (0%)	4 (8,33%)

Los especímenes de lavado bronquial se hibridaron con la mezcla de sondas FISH multicolor después de eliminar los cubreobjetos sumergiéndolos en xileno. Se evaluó el aspecto global de cada muestra. Si el espécimen parecía ser extremadamente acelular o la morfología de las células estaba alterada, o la señal de hibridación era demasiado débil, entonces la muestra se rechazó para enumeración por FISH.

Para evaluar los resultados por FISH, fue necesario desarrollar criterios de positividad a cáncer. Esto implicó desarrollar normas para clasificar células individuales como dudosas para malignidad ("anómalas") o no dudosas ("normales") y establecer valores límite para el número mínimo de células anómalas necesarias para clasificar un espécimen como positivo para cáncer.

Una células se clasificaba como anómala si presentaba ganancias de número de copia para al menos dos sondas incluidas en la mezcla de sondas (esto se denominó "ganancia de locus de ADN múltiple"). Una vez establecida esta norma, se evaluaron todos los datos de los especímenes y se tabuló el número de células "anómalas" en cada uno de los especímenes. Para decidir cual debería ser el "criterio positivo a cáncer" (una medida cuantitativa para diferenciar casos negativos a cáncer de positivos a cáncer) se aplicó la estrategia de la curva característica operativa del receptor (ROC) al análisis de datos. Usando esta estrategia, se estable una serie de puntos límites provisionales y en cada punto se calcula la sensibilidad y la especificidad. Para los datos presentados en este documento, se usaron los valores límite de 1 a 10 células por espécimen. Para cada valor límite se determinó la sensibilidad para la cohorte de pacientes positivos a cáncer y se determinó la especificidad para la cohorte de pacientes negativos a cáncer. Después la curva ROC se representó gráficamente para determinar la sensibilidad (eje y) como una función de [1 - especificidad] (eje x) (Figura 1).

Como se observa en la Figura 1, existe una parte en la curva, en la que la sensibilidad aumenta significativamente mientras que la especificidad permanece aproximadamente igual. El punto límite se selecciona frecuentemente en la parte en la que la curva cambia de dirección. El punto de cambio de dirección en este ensayo corresponde a un valor límite de 5-6 células que cumple los criterios de positividad a cáncer. Por consiguiente, la norma usada en este estudio para clasificar un espécimen como positivo fué la siguiente: si la muestra contenía 6 o más células anómalas con "ganancia de locus múltiple", esta se clasificaba como "positiva a cáncer". Si una muestra tenía menos de 6 células anómalas, esta se clasificaba como "negativa a cáncer".

La Tabla 15 muestra la correlación entre los resultados de citología y de FISH para el grupo de pacientes "positivos a cáncer". La citología fue positiva en 22 de los 48 pacientes "positivos a cáncer", proporcionando una sensibilidad del 45,8%. Para otros 4 especímenes, los citopatólogos volvieron a evaluar la citología y los especímenes se clasificaron como "dudosos". Si los resultados "dudosos" se interpretaban como "positivos a cáncer", entonces la sensibilidad de la citología era del 53,8%. Se rechazaron varias muestras de la evaluación FISH debido a baja celularidad y a otras razones, de manera que el número de casos evaluados por FISH era diferente al número de casos evaluados por citología. Recalculando los resultados citológicos para aquellos casos que también se evaluaron por FISH, la sensibilidad de la citología era del 46,2% (18/39 casos), si los resultados "dudosos" se contaban como resultados positivos, la sensibilidad era del 53,8%. Por lo tanto, no hubo diferencias significativas entre los resultados de sensibilidad si las muestras rechazadas de FISH se incluían o excluían de los cálculos. Los resultados de FISH para el mismo grupo de pacientes mostraron 32 resultados positivos entre los 39 pacientes

“positivos a cáncer”, proporcionado una sensibilidad del 82,0%.

Tabla 15 Pacientes Positivos a Cáncer: Correlación de Resultados FISH y Citológicos

	Negativo con FISH	Positivo con FISH	Rechazado para FISH	Total
Negativo con Citología	3	15	4	22
Positivo con Citología	3	15	4	22
Citología Dudosa	1	2	1	4
Total	7	32	9	48

FISH pudo aclarar dos de los especímenes de citología dudosa (se rechazó otro espécimen para evaluación FISH) colocándolos en la categoría de especímenes "positivos a cáncer". La cantidad de células anómalas en cada uno de estos especímenes fue 8 para un espécimen de carcinoma de células pequeñas y 10 para un espécimen de carcinoma de células grandes. Los resultados obtenidos para el grupo de 18 casos positivos/negativos a cáncer con citología son incluso más importantes. La Tabla 15 muestra que para estos pacientes con cáncer que no lo fueron por citología, FISH fue positivo en 15/18 casos, mejorando por lo tanto el diagnóstico en el 83,3% de los casos.

Los resultados de FISH y de citología también se realizaron con respecto al tipo de tumor. Los datos demostraron que FISH tenía su menor sensibilidad para los especímenes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas (5/9 especímenes, 55,5%). Para este tipo de tumor de pulmón, la citología mostró una sensibilidad del 54,5%. El adenocarcinoma, el carcinoma de células grandes y el carcinoma de células pequeñas demostraron sensibilidad por FISH del 86,4% (19/22 casos), del 100% (5/5 casos) y del 100% (3/3 casos), respectivamente. La sensibilidad de la citología para estos tumores fue la siguiente: 60,9% para adenocarcinoma; 50% para carcinoma de células grandes y 100% para carcinoma de células pequeñas.

El grupo de pacientes “negativos a cáncer” constaba de 26 pacientes. Los resultados de citología fueron negativos para todos los pacientes en este grupo seleccionado estableciendo la especificidad del 100%. Se rechazaron cuatro especímenes de evaluación por FISH debido a baja celularidad, por lo tanto solamente se evaluaron 22 especímenes. Entre estos 22 especímenes, FISH fue claramente negativo en 18 pacientes proporcionando una especificidad del 81,8% (Tabla 16). Cuatro especímenes tuvieron resultados FISH positivos. Estos cuatro especímenes contenían hasta 19, 15, 11 y 8 células “anómalas” por 25 células dudosas evaluadas. También es importante observar que en dos de los especímenes, la magnitud de ganancia del número de copias era superior a 7-8 copias por célula en un caso y 11-12 copias por célula en otro caso. Uno de los especímenes procedía de un paciente con un diagnóstico de cáncer colorectal avanzado aproximadamente un año antes de la preparación del espécimen (el paciente murió en el momento del presente estudio). El historial previo de otro paciente indicaba que fumaba en exceso y de profesión era minero. Por tanto, es posible que estos especímenes positivos por FISH, pero “negativos por citología” procediesen de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.

Tabla 16 Pacientes Negativos a Cáncer: Correlación de Resultados FISH y Citológicos

	Negativo con FISH	Positivo con FISH	Rechazado para FISH	Total
Negativo con Citología	18	4	4	26
Positivo con Citología/ Dudoso	0	0	0	0
Total	18	4	4	26

La Tabla 17 muestra datos comparativos sobre sensibilidad y especificidad por citología y FISH para la población total de 74 pacientes.

Tabla 17 Población Total de Pacientes: Correlación de Resultados FISH y Citológicos

	Negativo con FISH	Positivo con FISH	Rechazado para FISH	Total
Negativo con Citología	21	19	8	48
Positivo con Citología	3	15	4	22
Citología Dudosa	1	2	1	4
Total	25	36	13	74

Ejemplo 6: Detección de cáncer de pulmón en especímenes broncoscópicos

- 5 El presente estudio usó un ensayo interfase FISH (usando un panel FISH multicolor de 4 sondas) para detectar cáncer de pulmón en 191 especímenes bronquiales que previamente se habían caracterizado por análisis patológico quirúrgico. Los resultados patológicos quirúrgicos de los especímenes usados en este estudio se resumen en la Tabla 18. 104 de los especímenes (55%) procedían de pacientes con un diagnóstico clínico positivo para cáncer de pulmón. 84 de los especímenes (44%) procedían de pacientes con un diagnóstico clínico negativo para cáncer de pulmón.

Tabla 18 Resultados Patológicos Quirúrgicos de Especímenes Usados en el Estudio

Número de especímenes	Diagnóstico (+ o - para cáncer)	Porcentaje
104	+	55
84	-	44
3	Diagnóstico Erróneo	1

- 15 Para cada ensayo FISH se usó uno de los siguientes tres conjuntos de cuatro sondas: (1) una sonda de secuencia repetitiva centromérica para el cromosoma 1 (CEP 1) y tres sondas de secuencia única para los locus 5p15, 8q25 y 7p12; (2) sondas de secuencia repetitiva centroméricas para el cromosoma 16 (CEP 16) y para el cromosoma 17 (CEP 17) y dos sondas de secuencia única para los locus 3q26 y 20q12 o (3) una sonda de secuencia repetitiva centromérica para el cromosoma 6 (CEP 6) y tres sondas de secuencia única para los locus 5p15, 8q24 y 7p12. Las sondas se mezclaron entre sí y se hibridaron simultáneamente con cada espécimen bronquial.

- 25 La sensibilidad detectada para cada uno de los análisis por FISH y citológicos para los 104 especímenes positivos a cáncer se representa en la Tabla 19 (38 muestras del cepillado bronquial) y en la Tabla 20 (66 muestras de secreción bronquial). Como se muestra en la Tabla 19, FISH demostró una sensibilidad significativamente potenciada (72%) en comparación con la citología (51%) para las muestras de cepillado bronquial. No se detectaron diferencias significativas entre FISH y citología para las muestras de secreción bronquial (Tabla 20).

Tabla 19 Sensibilidad de FISH y Citología para Muestras de Cepillado Bronquial

Análisis	Diagnóstico	Número	Porcentaje
FISH	+	26/36	72
FISH	-	8/36	22
FISH	Diagnóstico Erróneo	2/36	6
Citología	+	19/37	51
Citología	-	17/37	46
Citología	Diagnóstico Erróneo	1/37	3

Tabla 20 Sensibilidad de FISH y Citología para Muestras de Secreción Bronquial

Análisis	Diagnóstico	Número	Porcentaje
FISH	+	31/65	48
FISH	-	28/65	43
FISH	Diagnóstico Erróneo	6/65	9
Citología	+	34/66	52
Citología	-	28/66	42
Citología	Diagnóstico Erróneo	4/66	6

- 35 La especificidad detectada por análisis FISH y citológicos para los 84 especímenes negativos para cáncer de pulmón (como se determina mediante análisis patológico quirúrgico) se representa en la Tabla 21 (49 muestras de cepillado

bronquial) y en Tabla 22 (39 muestras de secreción bronquial). Se esperaba que entre las muestras descritas en las Tablas 21 y 22 que eran negativas por análisis patológico quirúrgico, pero positivas por análisis FISH, pudiese haber algún espécimen que contuviera células cancerosas y/o pre-cancerosas que no fuese identificado por los métodos de patología quirúrgica. En dichos casos, FISH puede permitir una detección precoz de cáncer de pulmón.

5

Tabla 21 Especificidad de FISH y Citología para Muestras de Cepillado Bronquial

Análisis	Diagnóstico	Número	Porcentaje
FISH	+	10/49	20
FISH	-	38/49	78
FISH	Diagnóstico Erróneo	1/49	2
Citología	+	2/49	4
Citología	-	47/49	96
Citología	Diagnóstico Erróneo	0/49	0

Tabla 22 Especificidad de FISH y Citología para Muestras de Secreción Bronquial

Análisis	Diagnóstico	Número	Porcentaje
FISH	+	3/35	8
FISH	-	31/35	88
FISH	Diagnóstico Erróneo	1/35	3
Citología	+	4/35	11
Citología	-	29/35	83
Citología	Diagnóstico Erróneo	2/35	6

10

Otras Realizaciones

15

Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el ámbito de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjunto de sondas cromosómicas que comprende la siguiente combinación de cuatro sondas: una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda específica del locus 7p12 y una sonda de enumeración del cromosoma 6.
2. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 1, en el que se incorporan restos de detección a las sondas.
- 10 3. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 2, en el que los restos de detección comprenden marcadores fluorescentes.
4. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 1, en el que las sondas se acoplan a diferentes restos de detección.
- 15 5. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 4, en el que los restos de detección comprenden marcadores fluorescentes.
- 20 6. Un método para detectar cáncer de pulmón en un sujeto, comprendiendo el método:
 - (a) obtener un conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 1;
 - (b) poner en contacto el conjunto de sondas con una muestra biológica del sujeto, conteniendo dicha muestra células o material celular derivado de estructuras pulmonares, en condiciones suficientes para permitir la hibridación de sondas en el conjunto de cromosomas en la muestra, si hubiese; y
 - 25 (c) detectar el patrón de hibridación del conjunto de sondas cromosómicas con la muestra biológica para determinar si el sujeto tiene cáncer de pulmón.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la muestra biológica comprende un espécimen bronquial, una biopsia de pulmón o una muestra de esputo.
- 30 8. El método de la reivindicación 6, en el que las sondas cromosómicas se marcan con fluorescencia.
9. El método de la reivindicación 6 que comprende adicionalmente realizar análisis citológico en la muestra.
- 35 10. El método de la reivindicación 6, en el que el conjunto de sondas cromosómicas consiste en una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24, una sonda de enumeración del cromosoma 6 y una sonda específica del locus 7p12.
- 40 11. Un método de selección de una combinación de sondas para detección de cáncer, comprendiendo el método:
 - proporcionar una primera pluralidad de sondas cromosómicas;
 - determinar la capacidad de cada una de la primera pluralidad de sondas para diferenciar especímenes de cáncer de especímenes normales;
 - seleccionar aquellas sondas dentro de la primera pluralidad de sondas que identifiquen los especímenes de
 - 45 cáncer en comparación con los especímenes normales para producir una segunda pluralidad de sondas, en la que cada sonda dentro de la segunda pluralidad de sondas identifica los especímenes de cáncer en comparación con los especímenes normales a un valor de p inferior a 0,01 o un valor de vector inferior a 0,500;
 - determinar la capacidad de una combinación de sondas seleccionada de la segunda pluralidad de sondas para diferenciar los especímenes de cáncer de los especímenes normales; y
 - 50 seleccionar una combinación de sondas que identifique el espécimen de cáncer en comparación con el espécimen normal con un valor de vector inferior a 0,400;
 - en el que el valor de vector se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Vector} = [(1 - \text{especificidad})^2 + (1 - \text{sensibilidad})^2]^{0.5}$$

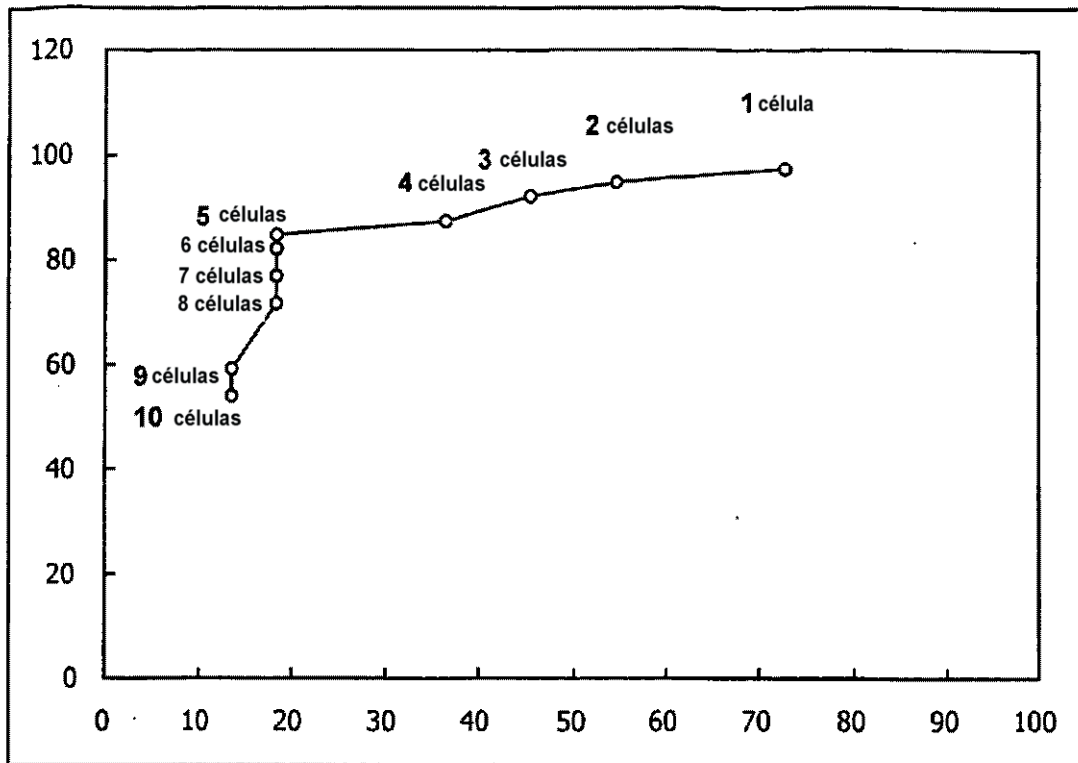


FIG. 1