

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 586**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2009 E 09781439 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2321430**

54 Título: **Método de evaluación del riesgo de cáncer oral en seres humanos**

30 Prioridad:

04.08.2008 US 86019 P

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

05.02.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT CLINIDENT (100.0%)
Biopôle Clermont Limagne
63360 Saint Beuzire, FR**

72 Inventor/es:

CHAUBRON, FRANCK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 586 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de evaluación del riesgo de cáncer oral en seres humanos

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. presentada el 4 de agosto, 2008, con el número de serie 61/086.019.

- 5 La presente invención se refiere a un método para proporcionar una evaluación del riesgo y diagnóstico del cáncer oral humano examinando en una muestra de saliva de un sujeto humano, la presencia de compuestos orgánicos bioquímicos volátiles particulares, una combinación de los cuales es indicativa de un riesgo mayor de cáncer oral.

Antecedentes de la invención

10 Los cánceres de la cavidad oral representaron 274.000 casos en 2002, con casi dos tercios de los mismos en hombres. La región del mundo con la mayor incidencia es Melanesia (31,5 por 10.000 en hombres y 20,2 por 100.000 en mujeres). Las tasas en hombres son altas en Europa occidental (11,3 por 100.000), el sur de Europa (9,2 por 100.000), sur de Asia (12,7 por 100.000), sur de África (11,1 por 100.000), y Australia/Nueva Zelanda (10,2 por 100.000). En mujeres, la incidencia del cáncer oral es relativamente alta en el sur de Asia (8,3 por 100.000). Estos patrones reflejan la prevalencia de factores de riesgo específicos, tales como el tabaco/alcohol, falta de salud dental y oral, y el mascar betel en Asia central y sur y Melanesia. Además, para el cáncer de la cavidad oral las tasas globales de supervivencia de 5 años no han mejorado en las pasadas décadas, permaneciendo bajas en aproximadamente 30-50% (Epstein, J.B. et al. 2002 *J. Can. Dent. Assoc.* 68: 617-621; Mao, L. et al. 2004 *Cancer Cell* 5: 311-316).

20 Además, la mayoría de los cánceres orales son inicialmente asintomáticos y no se diagnostican o se tratan hasta que han alcanzado una etapa avanzada. Hasta ahora se ha preguntado a los pacientes sobre los riesgos asociados con el cáncer oral (fumador, alcohol) seguido de la inspección clínica de la cavidad oral. Sin embargo, como se ha indicado antes, etapas tempranas tales como estados preneoplásicos y estados de recurrencia de tumor temprana no muestran daño tisular que sea visible para dentistas o médicos.

25 Por lo tanto, es necesario un método para evaluar el factor de riesgo, para el diagnóstico temprano, y mejorar el pronóstico. En relación con esto, un problema es proporcionar un método que se pueda llevar a cabo de forma rutinaria y en la práctica habitual o en laboratorios.

La presente invención describe un método de diagnóstico fiable y sensible aplicado a la saliva de sujetos humanos.

30 La saliva es un fluido transparente, ligeramente ácido, que contiene una serie de constituyentes inorgánicos y orgánicos importantes para la salud oral. La saliva entera es una mezcla de secreciones de las glándulas salivales mayores y menores y fluido gingival crevicular, que contiene células hospedantes desprendidas, bacterias y restos de alimentos. Por lo tanto, la saliva no es un "ultrafiltrado" pasivo del suero, sino que contiene una composición característica de enzimas, hormonas, anticuerpos y otras moléculas (Rehak, N.N. et al. 2000 *Clin. Chem. Lab. Med.* 38:335-343; Wong DT, *American Scientist*, vol 96, 2008). Por ejemplo, la saliva contiene un gran número de proteínas que ayudan a la protección de los tejidos de la cavidad oral, incluyendo mucinas, amilasas, aglutininas, lisozimas, peroxidasas, lactoferrina e IgA secretoria. La saliva completa contiene células epiteliales normales y leucocitos que se pueden peletizar, y a partir de los cuales se puede recuperar fácilmente el ADN genómico y ARNm, usado potencialmente para encontrar marcadores genómicos de diferentes enfermedades. Realmente, se encontró que la mayoría del ADN o ARN extraído de la saliva bruta era de origen vírico o bacteriano (Stamey, F.R. et al. 2003 *J. Virol. Methods* 108:189-193; Mercer, D.K. et al. 2001 *FEMS Microbiol. Lett.* 200:163-167) y de origen extra o intracelular humano. Además, muchos grupos han centrado su estudio y ensayos de diagnóstico en el líquido sobrenadante y por lo tanto la fase exenta de células de la saliva completa, que contiene muchos analitos tales como ARNm libre (Zimmermann BG et al., *Oral Oncology* 2008, 44, 425-429).

45 En los últimos 10 años, se ha aplicado satisfactoriamente el uso de la saliva en el diagnóstico (Streckfus, CF. & Bigler, L.R. 2002 *Oral Dis.* 8:69-76). Se han identificado biomarcadores de diagnóstico en la saliva para el control de caries, periodontitis, enfermedades de las glándulas salivales y trastornos sistémicos, p. ej., hepatitis y VIH (Lawrence H.P. et al, 2002 *J. Can. Dent. Assoc.* 68: 170-174). También se ha publicado que las bacterias orales son elevadas en lesiones de cáncer oral y esofágico (Mager D.L. et al. *J. Transl. Med.* 2005; 3: 27, Hooper J.S et al., *Journal of Clinical Microbiology*, May 2006, P 1719-1725). La razón de estos desplazamientos en la colonización bacteriana de lesiones de cáncer no esta clara. Los estudios mecanísticos de la unión de bacterias proporcionan alguna comprensión y la investigación ha mostrado repetidamente que las bacterias orales demuestran tropismos específicos hacia diferentes superficies biológicas en la cavidad oral tales como dientes, mucosa y otras bacterias. Hay menos tiempo en la cavidad oral para que se desarrolle una biopelícula compleja sobre las superficies de tejido blando; por lo tanto, se pone la compensación en potentes mecanismos de adhesión. Las diferencias en los tropismos bacterianos para sitios orales específicos sugieren que diferentes superficies intraorales y especies bacterianas tienen diferentes receptores y moléculas de adhesión que dictan la colonización de diferentes superficies orales. Algunos glicoconjugados sirven como receptores para bacterias específicas y publicaciones recientes apoyan la idea de que los desplazamientos en la colonización de las diferentes células de cáncer están asociados con cambios observados en los receptores de superficie celular. Hence, Mager D.L. et al., mostraron que

la microbiota salival en sujetos con una lesión de carcinoma celular escamoso oral (OSCC) difiere de la encontrada en los controles exentos de OSCC. Se determinaron los recuentos bacterianos para cada especie, se hizo la media de los sujetos en los 2 grupos de sujetos, y se determinó la significancia de las diferencias entre grupos usando la prueba de Mann-Whitney y se ajustó para comparaciones múltiples; es interesante que parece que las cepas bacterianas *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis* y *Micrococcus luteus* estaban particularmente presentes en pacientes que tenían OSCC y por lo tanto se sugirió que servían como marcadores de diagnóstico para el cáncer oral. Sin embargo, como se demuestra en (ref.) estas cepas bacterianas particulares estaban poco asociadas con el cáncer oral (una sensibilidad máxima de 80%) (Mager D.L. et al). También se ha mostrado en Li et al. (*Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97, 1311-1318) que la presencia en la saliva de números significativamente altos de bacterias vivas específicas (en este estudio se han identificado 40 cepas diferentes y se han descrito más de 200 bacterias vivas específicas en la cavidad oral), se podría asociar con la formación de biopelícula, colonización de la cavidad oral y falta de higiene oral, que a menudo están asociados con el desarrollo de cáncer oral en los países en desarrollo. Sin embargo, a partir de Li et al. no se puede predecir que las cepas particulares *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis* y *Micrococcus luteus* puedan servir como marcadores de diagnóstico fiables para el cáncer oral humano. Esta es la razón por la que, hasta la fecha, no se ha propuesto nunca un ensayo de diagnóstico basado en bacterias fiable y muy sensible, para diagnosticar el cáncer oral en la saliva.

Es interesante observar que la mayoría de las especies aisladas eran sacarolíticas y tolerantes al ácido y se sabe que producen ácidos orgánicos de cadena corta a partir de hidratos de carbono y por consiguiente reducen el pH de su entorno local. Raghunad N. et al. (*J. Radiol.* 2003; 76. S11-S22) describieron que el microentorno de tumores sólidos típicamente es hipóxico, con un pH extracelular ácido, por lo que no es sorprendente que puede haber un grado de selectividad en favor de la tolerancia al ácido. Otro factor podría ser la producción de daño oxidativo del ADN generado por bacterias orales. Takeuchi T. et al. (2000, *FEMS Microbiol Lett.* Nov 1; 192(1):133-8), investigaron el mecanismo de la inducción de daño oxidativo al ADN por exposición al O₂ en *Prevotella melaninogenica*, un anaerobio estricto encontrado en la cavidad oral y algunas enfermedades dentales. Los resultados indican que en *Prevotella melaninogenica*, la exposición al O₂ generaba y acumulaba O₂ y H₂O₂, y que un radical cripto-OH generado a través del H₂O₂ era la especie activa en la inducción de 8OHdG, altamente responsable del daño oxidativo del ADN en células humanas (efecto genotóxico), posible causa de la tumorigenicidad en células de mamífero en el entorno oral. Se han descrito otros patógenos bacterianos como posibles fuentes de cáncer de tejidos orales.

James J. Closmann, también encontraron que el carcinoma de células escamosas orales y bucofaringeas (OOSCC) se ha ligado a cepas de VPH de alto riesgo, las mismas cepas que producen cáncer de cuello uterino en mujeres. D'Souza et al. (*N. Engl. J. Med.* 2007 May 10; 356(19):1944-56) concluyeron que la infección por el VPH oral está muy asociada con el cáncer bucofaringeo entre sujetos con o sin factores de riesgo establecidos de uso de tabaco y alcohol. El grado de asociación aumentaba con el número de pajareras de sexo vaginal y sexo oral. El cáncer bucofaringeo estaba asociado con la infección por el VPH de tipo 16 (VPH-16) oral; la infección oral con cualquiera de los 37 tipos de VPH y con resultado seropositivo para la proteína de la cápside VPH-16 L1. El ADN de VPH-16 se detectó en 72% de 100 muestras de tumor embebidas en parafina, y 64% de los pacientes con cáncer eran seropositivos para la oncoproteína de VPH-16 E6, E7, o ambas. El resultado seropositivo de VPH-16 L1 estaba muy asociado con el cáncer bucofaringeo entre sujetos con una historia de uso intenso de tabaco y alcohol. La asociación aumentaba de forma similar entre sujetos con infección por VPH-16 oral, independientemente de su uso de tabaco y alcohol. Herrero R et al. (*J. Natl. Cancer Inst.* 2003 Dec 3; 95(23):1772-83) llevaron a cabo un estudio multicéntrico de casos y controles de cáncer de la cavidad oral y bucofaringeo en nueve países con 1670 pacientes de casos (1415 con cáncer de la cavidad oral y 255 con cáncer bucofaringeo) y 1732 sujetos de control, y el ADN del VPH se detectó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se detectaron los anticuerpos contra las proteínas L1, E6 y E7 del VPH16 en el plasma con ensayos inmunoabsorbentes con enzimas ligadas. Se usaron modelos multivariados para comparaciones de caso-control y caso-caso. Se detectó el ADN del VPH en muestras de biopsia de 3,9% de 766 cánceres de la cavidad oral con resultados de la PCR válidos y 18,3% de 142 cánceres bucofaringeos con resultados de PCR válidos. Se encontró el ADN de VPH16 en 94,7% de los pacientes de caso positivo de ADN de VPH. Por consiguiente, se sugirió que los anticuerpos contra VPH16 L1 estaban asociados con un riesgo alto de cánceres de la cavidad oral y bucofaringeo. Los anticuerpos contra E6 o E7 de VPH16 también se asociaron con riesgo de cánceres de la cavidad oral y bucofaringeo. El virus VPH es incluso más que un indicador de que los pacientes deben visitar al dentista dos veces al año para identificar anomalías pronto. Además, Rosenquist K. et al. (*Acta Otolaryngol.* 2007 Sep; 127(9):980-7), describieron que los pacientes infectados por el VPH por vía oral de alto riesgo tienen un riesgo significativamente mayor de reincidencia/segundo tumor primario comparado con pacientes negativos al VPH de alto riesgo. Por lo tanto, el diagnóstico del VPH en la saliva de sujetos humanos parece estar ligado a un riesgo mayor de desarrollar cáncer oral, y también para controlar los efectos asociados al tratamiento (antivirus). Sin embargo, hasta la fecha, no se han propuesto pruebas de diagnóstico basadas en el VPH para diagnosticar el cáncer oral en la saliva.

Por otra parte, las aberraciones genéticas de células de cáncer conducen a patrones de expresión de genes alterados (expresión de ARNm), que se pueden identificar mucho antes de que se pongan de manifiesto los fenotipos de cáncer resultantes. Los cambios que surgen exclusivamente o de forma preferente en el cáncer, comparado con el tejido normal del mismo origen, se pueden usar como biomarcadores moleculares (Sidransky, D.

2002 *Nat. Rev. Cancer* 2:210-219, 2002). Identificados con precisión, los biomarcadores pueden proporcionar nuevas rutas y constituyen dianas principales para la detección temprana del cáncer y la evaluación del riesgo de cáncer. Una variedad de biomarcadores basados en ácidos nucleicos se han mostrado como herramientas nuevas y potentes para la detección de cánceres (Hollstein, M. et al. 1991, *Science* 253:49-53; Liu, T. et al. 2000, *Genes Chromosomes Cancer* 27:17-25; Groden, J. et al. 1991, *Cell* 66:589-600). Estos biomarcadores basados en ácidos nucleicos son estudiados principalmente en la fase exenta de células de las muestras de saliva completa, es decir, en muestras de saliva filtradas o centrifugadas (Zimmermann BG et al., *Oral Oncology* 2008, 44, 425-429). Sin embargo, solo hay un número limitado de publicaciones que demuestren la heterogeneidad del ADN de células tumorales en la saliva de pacientes con cáncer oral (Liao P.H. et al. 2000, *Oral Oncol.* 36:272-276; El-Naggar, A.K. et al. 2001 *J. Mol. Diagn.* 3:164-170). Se ha descrito el ARNm humano del suero de la circulación para la detección del cáncer oral (Yang Li et al., 2006, *Journal of Clinical Oncology* vol 24 number 11, 1754-1760). Usando micromatrices, se ha llevado a cabo el perfil transcriptómico (ARNm) de la saliva humana en controles sanos y pacientes con cáncer (Hu S. et al. 2006, *J. Dent. Res.* Dec; 85(12):1129-33). Se analizaron los diferentes patrones de expresión de genes por combinación de una comparación de ensayo T y un análisis de número de veces de cambio en 10 pacientes de cáncer y controles correspondientes. La potencia predictiva de estos biomarcadores de ARNm de la saliva se analizaron mediante la curva característica operativa del receptor y modelos de clasificación. Estos análisis de micromatrices mostraron que hay 1.679 genes que presentan nivel de expresión significativamente diferente en la saliva entre pacientes con cáncer y controles; entre los cuales se encuentran 7 ARNm de 1L8, IL1B, DUSPI, HA3, OAZ1, S100P, SAT relacionados con el cáncer. Las combinaciones de estos biomarcadores dieron sensibilidad (91%) y especificidad (91%) en la distinción del cáncer oral frente a los controles (documentos WO2006/020005 o WO2005/081867).

La saliva es una mezcla de secreciones de múltiples glándulas salivales, que incluyen las glándulas parótida, submandibular, sublingual y otras glándulas menores que están debajo de la mucosa oral. Como se ha mencionado antes, la saliva humana alberga un amplio espectro de péptidos y proteínas que constituyen el proteoma salival humano. Lo que se ha estudiado menos es la presencia de compuestos bioquímicos orgánicos en la saliva.

Los compuestos orgánicos bioquímicos pueden ser enzimas, hormonas, iones inorgánicos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, lípidos, ácidos grasos y compuestos volátiles. Se pueden medir por muchas técnicas y dispositivos, sean tecnologías ópticas (por ejemplo espectroscopía de absorción láser, espectroscopía de absorción infrarroja media, espectroscopía de resonancia magnética láser, espectrometría de masas de reacción de transferencia de protones...) o tecnologías no ópticas (cromatografía de gases, espectrometría de masas, etc.) (Mashir A, *Advanced Powder Technology*, 2009).

Solo un estudio ha comparado el contenido orgánico bioquímico de una fracción de saliva de pacientes sanos o enfermos (Volozhin et al. *Stomatologija* (mosk), 2001;80(1):9-12). En este estudio, se hicieron ensayos en pacientes con periodontitis generalizada crónica y pacientes con gingivitis y periodontitis generalizada crónica, con aire de la cavidad oral y se recogieron muestras líquidas lavando la cavidad oral con agua estéril. Los compuestos químicos del aire y el líquido de lavado se analizaron por cromatografía-espectrometría de masas, adsorción de gases y cromatografía de gas-líquido. El contenido de sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo aumentaba en el aire oral y los ácidos grasos de cadena corta volátiles (VSCFA) tales como butirato, propionato, acetato aumentaban, pero sus aldehídos (butiraldehído, acroleína, acetaldehído) disminuían en el fluido oral durante la periodontitis. También se mostró que los ácidos grasos de cadena corta volátiles (propionato, butirato y acetato) de origen bacteriano y tisular son factores importantes de la patogénesis de la inflamación del tejido oral (Volozhin et al. *Stomatologija* (mosk), 2001;80(1):9-12). En este estudio, se han analizado los compuestos orgánicos en el aire de la cavidad oral y líquido de lavado recogido por lavado de la cavidad oral con agua estéril, pero no en la fracción volátil de la saliva bruta.

BAHAR et al. ("Salivary analysis in oral cancer patients - DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile" *CANCER*, vol. 109, no. 1, January 2007, pages 54-59) describen análisis de saliva en pacientes con cáncer oral, y encuentran que la composición de la saliva está alterada en pacientes con OSCC. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la saliva tales como NO, NO₂, NO₃, son sustancialmente más altas en los pacientes con cáncer oral.

Al contrario que la saliva, la presencia de moléculas orgánicas volátiles en el aire exhalado se ha estudiado bien y se ha mostrado que contiene muchos compuestos orgánicos volátiles: en 1971, usando análisis por cromatografía de reparto gas-líquido, Linus Pauling demostró la presencia de 250 sustancias en el aire exhalado (Pauling L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 2374- 2376). En 1990, el desarrollo de instrumentos de espectroscopía de masas (MS) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) muy sensibles, identificó miles de sustancias únicas en el aire exhalado humano (Mashir A, *Advanced Powder Technology*, 2009). Estas sustancias incluyen gases elementales tales como óxido nítrico y monóxido de carbono y una multitud de otros compuestos orgánicos volátiles. Además, el aire exhalado también lleva gotitas aerosolizadas recogidas como condensado de aire exhalado que tiene compuestos no volátiles que pueden ser capturados por una variedad de métodos y analizar una amplia variedad de biomarcadores, desde productos finales metabólicos a proteínas. El análisis del aliento ahora también se usa para diagnosticar y controlar asma, hipertensión pulmonar, enfermedades respiratorias, enfermedades gastrointestinales, enfermedad crítica, para comprobar el rechazo de trasplante de órganos, y para detectar el cáncer de pulmón y cáncer de mama (Mashir A, *Advanced Powder Technology*, 2009; Chan H.P. et al, *Lung Cancer*, 2009). Sin embargo, han que destacar que el análisis de aliento no se ha propuesto nunca para

detectar el cáncer oral en sujetos humanos.

Es interesante, que parece que la composición molecular orgánica bioquímica de la saliva no se ha comparado nunca entre pacientes que padecen cáncer, p. ej., cáncer oral e individuos sanos. Además, la composición molecular orgánica bioquímica de la fracción volátil de la saliva no se ha estudiado nunca tanto.

- 5 La fracción volátil corresponde a la parte evaporada de la fracción de fluidos de la saliva. Esta fracción volátil contiene algunos compuestos orgánicos que no se encuentran en muestras de saliva bruta sin el proceso de evaporación, incluso después de su filtración.

10 También es importante observar que el contenido molecular de la saliva no es comparable en absoluto con la composición del aire exhalado, que es principalmente un reflejo de moléculas del pulmón (Song G, et al. "Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients", *Lung Cancer* (2009)). Por lo tanto, la composición molecular de la fracción volátil de la saliva no se puede deducir de los datos obtenidos del análisis de aliento. Hasta la fecha, no se ha descrito nunca el análisis exhaustivo del contenido bioquímico de la fracción volátil de saliva, en mayor medida en el contexto del cáncer oral.

15 Uno de los valores de la saliva es la facilidad de la toma de muestra y el cumplimiento del sujeto para la recolección de la muestra, que incluye aplicaciones de campo así como recogida en casa. Sin embargo, el estudio de los compuestos bioquímicos presentes en la saliva (sea en el fluido o en la fracción volátil) para aplicación clínica parece ser difícil puesto que es necesario estabilizar y mantener su integridad durante al menos varios días a temperatura ambiente.

20 También se ha mostrado que el reactivo RNAprotect® Saliva (RPS, Qiagen Inc, Valencia, CA) podría estabilizar el ARN en muestras a temperatura ambiente durante hasta 12 semanas (Park NJ, *Clin. Chem.* 2006; 52:2303-4). Además, Jiang J et al., mostraron que se puede usar el RPS para estabilizar el ADN y las proteínas en la saliva solo cuando se eliminan previamente las células endógenas por centrifugación o por filtración (Jiang J et al., *Archives of Oral Biology*, 2008).

25 En lo que se refiere a los compuestos orgánicos bioquímicos, son degradados por la microflora, alimentos y productos para el cuidado dental, a temperatura ambiente. Es importante que nadie ha propuesto nunca un modo de proteger estos compuestos sensibles de la degradación que se produce a temperatura ambiente. Es más, hasta ahora no se ha descrito nunca un tampón que permita la estabilización tanto de los ácidos nucleicos como de los compuestos orgánicos bioquímicos durante varios días a temperatura ambiente.

30 Por lo tanto, es un estímulo aún mayor estabilizar todos los componentes de la saliva, en especial los ácidos nucleicos y compuestos orgánicos, sin ninguna etapa de filtración o centrifugación, durante un periodo de tiempo largo a temperatura ambiente.

En este contexto, los autores de la presente invención muestran aquí por primera vez que:

- 35 i) Se pueden estabilizar los ácidos nucleicos y compuestos orgánicos presentes en la saliva durante al menos 10 días en un tampón adecuado,
- ii) Se puede detectar un riesgo alto de desarrollar cáncer oral analizando el nivel de sólo algunos biomarcadores particulares en la fracción de fluido de una muestra de saliva estabilizada,
- iii) Se puede extraer una fracción volátil de una muestra de saliva estabilizada, y detectar en la misma varios compuestos orgánicos volátiles en una cantidad significativa,
- 40 iv) Se puede detectar un riesgo alto de desarrollar cáncer oral analizando el nivel de sólo algunos compuestos bioquímicos particulares en dicha fracción volátil de saliva estabilizada.

Es importante destacar que hasta ahora no se ha propuesto nunca un ensayo para predecir y/o diagnosticar el cáncer oral usando la fracción volátil de la saliva.

Lo que es más importante, hasta ahora los compuestos bioquímicos particulares identificados en los sucesivos no se habían asociado nunca con el cáncer.

45 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe:

- i) un método para estabilizar muestras de saliva bruta de sujetos humanos,
- ii) un método para detectar un riesgo alto de desarrollar cáncer oral, analizando en una reacción de una etapa, el nivel de biomarcadores particulares en la fracción de fluido de dicha saliva estabilizada,
- 50 iii) un método para extraer la fracción volátil de las muestras de saliva estabilizadas, y analizar su contenido en compuestos orgánicos bioquímicos,

iv) un método para detectar un riesgo alto de desarrollar cáncer oral, analizando el nivel de compuestos orgánicos bioquímicos particulares en la fracción volátil de la saliva estabilizada.

Finalmente, se han identificado combinaciones específicas de parámetros biológicos asociadas con riesgo alto de cáncer oral, destacando que se puede obtener un ensayo de pronóstico/diagnóstico sensible y fiable del cáncer oral a partir de una muestra única de saliva estabilizada.

Descripción de la figura

La figura 1 muestra un histograma que representa 2 grupos de muestras de saliva después de un análisis discriminante factorial (FDA) de datos de proporciones de acuerdo con el factor "tumor/salud": 5 proporciones permiten separar 98,077% de las muestras en 2 grupos de "tumor" y "grupo de referencia" (solo 1 muestra de referencia se clasifica en el grupo de "tumor" y no en el grupo de referencia).

Descripción

La presente invención describe un nuevo ensayo fiable, sensible y fácil de manejar de diagnóstico de cáncer oral en sujetos humanos.

La presente invención se refiere a un método in vitro de diagnóstico de la predisposición al cáncer oral en un sujeto humano, comprendiendo el método estabilizar una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano, y realizar al menos la siguiente etapa:

* analizar una fracción volátil correspondiente a la parte evaporable extraída de dicha saliva estabilizada detectando en dicha fracción volátil al menos un compuesto orgánico bioquímico;

en donde la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico es indicativo de un riesgo o una predisposición al cáncer oral.

La presente invención permite determinar si un sujeto humano tiene o no predisposición a desarrollar un cáncer oral.

Cuando en un sujeto humano "se diagnostica que tiene predisposición al cáncer oral" o se encuentra que está "predispuesto al cáncer oral", significa que tiene un riesgo mayor de desarrollar un cáncer oral que la población sana media en el futuro. En otras palabras, se cree que tiene predisposición a desarrollar un cáncer oral en el futuro cercano o lejano. En el contexto de la invención, se dice que un sujeto humano tiene "predisposición a desarrollar cáncer oral" cuando tiene un riesgo superior a 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% e incluso más preferiblemente 95% de desarrollar cáncer oral en un futuro cercano o lejano, comparado con una población sana normal. Esta predisposición al cáncer en general está ligada con una causa genética.

La presente invención también permite determinar que un sujeto humano no tiene "predisposición a desarrollar un cáncer oral". En este caso, significa que tiene un riesgo pequeño de desarrollar cáncer oral en el futuro. Por ejemplo, significa que tiene un riesgo de desarrollar un cáncer oral en el futuro menor de 10%, preferiblemente menor de 5% comparado con la población sana normal. En general significa que tiene al menos 90% de probabilidad de no tener mutaciones oncogénicas en su genoma.

La presente invención permite diagnosticar un cáncer oral en un sujeto humano. De hecho, la presente invención describe un método in vitro para diagnosticar un cáncer oral en un sujeto humano, que comprende estabilizar una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano, y llevar a cabo al menos la siguiente etapa:

*analizar una fracción volátil correspondiente a la parte evaporable de dicha saliva estabilizada detectando en dicha fracción volátil al menos un compuesto orgánico bioquímico;

en donde la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico es indicativa de un riesgo de desarrollar cáncer oral.

Preferiblemente, el método de la invención comprende además la etapa de:

*analizar una fracción de fluido de dicha saliva estabilizada detectando secuencias de ADN o ARN específicas de origen humano, bacteriano o vírico en dicha fracción fluida.

Por lo tanto, el método de la invención se dedica a estimar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle un cáncer oral. Este riesgo puede ser un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral o un riesgo bajo de desarrollar un cáncer oral.

Como se usa en la presente memoria, cuando un sujeto humano tiene riesgo de "desarrollar" un cáncer oral, significa que tiene riesgo de "estar desarrollando" un cáncer oral en el momento de recoger la muestra de saliva.

En el contexto de la invención, se dice que un sujeto humano "tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral" cuando tiene un riesgo al menos superior a 60%, preferiblemente a 70%, más preferiblemente a 80% e incluso más preferiblemente a 90% de desarrollar un cáncer oral. En otras palabras, el sujeto tiene una probabilidad mucho

mayor de desarrollar un cáncer oral comparado con la población normal o con un sujeto humano en el que no se ha detectado ninguno de los compuestos orgánicos. En el contexto de la presente invención, cuando un sujeto humano tiene un riesgo superior a 97% de desarrollar un cáncer oral, se dice que el sujeto humano “está desarrollando un cáncer oral”.

- 5 Este cáncer oral puede estar iniciándose o estar establecido. En una realización de la invención, el nivel de expresión de compuestos orgánicos bioquímicos particulares puede indicar potencialmente el grado del cáncer oral que está padeciendo el sujeto humano.

10 El método de la invención también permite determinar si un sujeto humano tiene un riesgo bajo de desarrollar un cáncer oral. En el contexto de la invención, el sujeto humano tiene un riesgo bajo de desarrollar un cáncer oral, cuando tiene un riesgo de desarrollar un cáncer oral inferior a 10%, preferiblemente inferior a 5% comparado con la población normal. En otras palabras, el sujeto humano tiene una probabilidad superior a 90%, preferiblemente superior a 95% de estar sano, al menos en lo que se refiere al cáncer oral. En el contexto de la invención, cuando un sujeto humano tiene un riesgo inferior a 5% de estar desarrollando un cáncer oral, se dice que el sujeto no está desarrollando un cáncer oral en el momento de recoger la muestra de saliva.

- 15 En el contexto de la invención, la expresión “cáncer oral” se refiere a los siguientes cánceres: cáncer de la cavidad oral, cáncer bucofaringeo, carcinoma de células escamosas bucofaringeo (OSCC), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, preferiblemente, carcinoma de células escamosas oral.

20 En el contexto de la invención, “recoger una muestra de saliva bruta” se obtiene recibiendo en un dispositivo estéril, una muestra de la saliva que ha escupido el sujeto humano. Se puede añadir un reactivo de recolección, por ejemplo un tampón de citrato, a la muestra. Esta muestra después se trata para estabilizarla para el análisis posterior, y prepararla para la extracción de ácidos nucleicos y/o la fracción volátil.

25 Un aspecto de la presente descripción es proporcionar un modo para estabilizar muestras brutas de saliva, para así mantener cantidades altas de marcadores genéticos y componentes bioquímicos presentes en la saliva inicialmente escupida y recogida y favorecer la extracción de ácidos nucleicos y/o elementos volátiles bioquímicos. La presente invención permite mantener preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente 80% e incluso más preferiblemente 90% de la cantidad de ácidos nucleicos y componentes orgánicos bioquímicos presentes en la saliva escupida y recogida.

30 De forma más precisa, el método proporcionado permite proteger los componentes originales de la muestra frente a la degradación durante al menos 10 días a temperatura ambiente. Esta etapa de estabilización se lleva a cabo añadiendo a la muestra bruta una llamada “disolución de conservación de la saliva” que comprende al menos un reactivo de conservación, que preferiblemente es un tampón que comprende una sal capaz de a) abrir la membrana de células bacterianas y humanas, b) bloquear la actividad de nucleasas, c) precipitar el ácido nucleico, y d) reducir la tensión de vapor de compuestos volátiles sin permitir la degradación de dichos compuestos. Esta sal, preferiblemente es una sal tal como tiocianato de guanidinio, y/o sulfato amónico y/o azida sódica, preferiblemente azida sódica. Esta sal se usa preferiblemente en un intervalo de concentración entre 20 mM y 6 M, y más preferiblemente 40 mM.

35 Por lo tanto, se describe un método para estabilizar los componentes originales de una muestra de saliva bruta (tales como ácido nucleico y compuestos orgánicos bioquímicos) durante al menos 10 días a temperatura ambiente, comprendiendo dicho método añadir a la muestra de saliva bruta una sal tal como tiocianato de guanidinio, y/o sulfato amónico y/o azida sódica. La sal preferiblemente es azida sódica y está presente en una concentración de aproximadamente 40 mM.

Por lo tanto, por muestra de saliva “estabilizada” se entiende que se refiere a muestras en las que las especies de ácido nucleico y los compuestos orgánicos volátiles se han conservado frente a la degradación causada por la microflora, alimentos y productos para el cuidado dental, durante al menos 10 días a temperatura ambiente.

- 45 En un primer aspecto, se proporciona un método para diagnosticar el riesgo o la predisposición al cáncer oral en un sujeto humano, usando simplemente una muestra estabilizada de su saliva y analizando su fracción de fluido para detectar secuencias de ADN o ARN específicas de origen humano, bacteriano o vírico.

Como se usa en la presente memoria, la “fracción de fluido” (o “fracción fluida”) de una muestra de saliva es la fase líquida de la saliva recogida, y contiene células así como ácidos nucleicos libres y compuestos orgánicos.

- 50 En el método proporcionado, y al contrario de lo que se había descrito hasta ahora, no es necesario eliminar las células de las muestras de saliva bruta para obtener la fracción de fluido. Por lo tanto, las muestras de fluido de saliva preferiblemente no se centrifugan y no se filtran.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “secuencias de ADN o ARN” se refiere al ácido nucleico total en la muestra y comprende ADN genómico y ARN total incluyendo ARNm.

- 55 Preferiblemente, dichas secuencias específicas de ADN o ARN se eligen de:

i) secuencias humanas seleccionadas de ARNm de SSAT (SEQ ID N° 62), ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63) y ARNm de IL8 (SEQ ID N° 64); y/o

ii) secuencias de bacterias seleccionadas de *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914) y *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D); y/o

5 iii) las secuencias víricas del papilomavirus humano, preferiblemente el papilomavirus humano 16 (ATCC 45113) o el papilomavirus humano 18 (ATCC 45152).

Preferiblemente, las secuencias de ADN o ARN específicas (llamadas también secuencias de ácido nucleico) se detectan incubando dicho ADN genómico y ARN total con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y con actividad de polimerasa dependiente de ADN.

10 Más preferiblemente, la combinación de la RT y PCR se lleva a cabo en una reacción en un solo tubo.

El término “detectar” como se usa en la presente memoria significa que se refiere a diagnosticar, deducir, evaluar, controlar, determinar la cantidad, concentración, proporción u otras evaluaciones cuantitativas o cualitativas en muestras, opcionalmente comparadas con una muestra de control, de ácido nucleico y compuestos volátiles.

15 En el contexto de la presente descripción, “detectar secuencias de ácido nucleico específicas” comprende comparar el nivel de expresión de secuencias de ácido nucleico específicas con el nivel de expresión medio de dichas secuencias de ácido nucleico específicas en la población normal. Una secuencia de ácido nucleico específica se detecta cuando el nivel de expresión de dichas secuencias de ácido nucleico específicas en la muestra de saliva ensayada es equivalente o superior a 2 veces el nivel de expresión medio de dichas secuencias de ácido nucleico específicas en la población normal.

20 El método proporcionado puede comprender comparar el nivel de expresión de la secuencia de ácido nucleico específica en una muestra de saliva de un sujeto, con el nivel de expresión normal de dicha secuencia de ácido nucleico en un control. Un nivel de expresión de dicho gen significativamente mayor en la muestra de saliva de un sujeto comparado con el nivel de expresión normal, es una indicación de que el paciente tiene o tiene predisposición al cáncer oral. Un “exceso de expresión” de un ácido nucleico específico se refiere a un nivel de expresión en una muestra de saliva que es mayor que el error típico del ensayo usado para evaluar la expresión, y preferiblemente es al menos 20% superior al nivel normal de expresión de dicho ácido nucleico, preferiblemente al menos 50% superior al nivel normal de expresión de dicho ácido nucleico, y lo más preferiblemente al menos 100% superior al nivel de expresión de dicho ácido nucleico. El nivel de expresión “normal” de un ácido nucleico es el nivel de expresión de dicho ácido nucleico en una muestra de saliva de un sujeto que no padece cáncer. Preferiblemente, dicho nivel de expresión normal se evalúa en una muestra de control (p. ej., muestra de un sujeto sano que no padece cáncer) y preferiblemente, el nivel de expresión medio de dicho ácido nucleico en varias muestras de control.

Además, la detección de secuencias de ácido nucleico específicas se basa en la detección de al menos 50, preferiblemente 70 e incluso más preferiblemente 100 nucleótidos sucesivos de la secuencia de ácido nucleico específica objetivo, como está registrada en las bases de datos oficiales, por ejemplo, en la base de datos de NCBI.

35 Para las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con ii) como se ha definido antes, “detectar” comprende comparar el nivel de expresión con el nivel de expresión en la población normal o con el nivel de expresión medio, y en donde cuando el nivel de expresión es equivalente o superior al umbral/punto de corte de 10^5 UFC por ml de saliva, es indicativo de mayor cáncer oral.

40 En una realización de la presente invención, la detección de al menos dos secuencias de ARNm humano como se han definido específicamente en i), y al menos una secuencia bacteriana como se han definido específicamente en ii), indica que el sujeto humano tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral.

En una realización preferida de la presente invención, la detección de al menos el ARNm humano de H3F3A (SEQ ID N° 63) y el ARNm humano de SSAT (SEQ ID N° 62) en la muestra de saliva de un sujeto humano indica que dicho sujeto tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral.

45 En una realización más preferida de la presente invención, la detección del ARNm humano de H3F3A (SEQ ID N° 63), el ARNm humano de SSAT (SEQ ID N° 62) y el genoma bacteriano de *Streptococcus mitis* (ATCC 15914) en la muestra de saliva de un sujeto humano indica que dicho sujeto tiene un riesgo superior a 64% de desarrollar un cáncer oral, y por lo tanto tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral.

50 Al contrario, cuando la secuencia de ADN o ARN particular descrita en la presente invención no se detecta en la muestra de saliva de un sujeto humano, significa que dicho sujeto humano tiene un riesgo bajo de desarrollar un cáncer oral.

Como se ha mencionado previamente, un problema era diseñar un ensayo de detección de diferentes factores de riesgo asociados con el cáncer oral en una reacción de ensayo sencilla. Realmente, algunos marcadores biológicos importantes de diferentes orígenes, vírico, bacteriano, humano o de ARNm o ADN, lo que hace difícil la detección en

un ensayo de reacción en una etapa.

En una realización de la presente invención, la detección de las secuencias de ácido nucleico comprende incubar dicho ADN genómico y ARN total con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, permitiendo la combinación de RT-PCR y PCR.

5 Preferiblemente, la reacción de RT-PCR se lleva a cabo con la ADN polimerasa Tth.

Más preferiblemente, la detección de secuencias de ácido nucleico comprende incubar dicho ADN genómico y ARN total en el mismo tubo con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, que permite la combinación de RT-PCR y PCR en una reacción en un solo tubo.

10 Incluso más preferiblemente, la detección de secuencias de ácido nucleico comprende amplificar y detectar al menos una secuencia de ADN o ARN elegida de las SEQ ID N° 62 a 70.

Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se dirige a un método para diagnosticar una predisposición al cáncer oral, o para diagnosticar un cáncer oral en un sujeto humano, comprendiendo además el método las etapas de:

15 a) extraer el ácido nucleico total (ADN genómico y ARN total) de origen bacteriano, vírico y humano de la muestra de saliva estabilizada,

b) incubar dicho ADN genómico y ARN total en el mismo tubo con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, que permite la combinación de RT y PCR en una reacción en un solo tubo,

20 en donde dicha reacción de RT-PCR se lleva a cabo con cebadores y sondas específicas para:

i) secuencias humanas seleccionadas de ARNm de SSAT (SEQ ID N° 62), ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63) y ARNm de IL8 (SEQ ID N° 64);

25 ii) secuencias de bacterias seleccionadas de *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624, SEQ ID N° 65), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845, SEQ ID N° 66), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914, SEQ ID N° 67) y *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D, SEQ ID N° 68),

iii) secuencias de virus seleccionadas de papilomavirus humano 16 (ATCC 45113, SEQ ID N° 69) o papilomavirus humano 18 (ATCC 45152, SEQ ID N° 70);

y en donde la presencia de al menos una secuencia de cada uno de i), ii) o iii), es indicativa de un riesgo o una predisposición al cáncer oral.

30 En una realización particular, la presencia de al menos una secuencia de cada uno de i), ii) y iii), es indicativa de un riesgo o una predisposición al cáncer oral.

Más específicamente, la detección de la presencia de una combinación de al menos una de dichas secuencias de iii), al menos dos de dichas secuencias de i) y al menos dos de dichas secuencias de ii), indica que el sujeto humano tiene un riesgo mayor de desarrollar cáncer oral.

35 En una realización particular, el método comprende amplificar y detectar las SEQ ID N° 62 a 70.

En otra realización particular, la invención se dirige a un método para evaluar el riesgo y diagnosticar la enfermedad de cáncer oral en un sujeto humano, que comprende las etapas de:

a) recoger una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano en un dispositivo estéril,

40 b) estabilizar dicha muestra añadiendo una disolución que comprende una sal de guanidinio, tal como tiocianato de guanidinio y/o sulfato amónico y/o azida sódica, y opcionalmente inhibidores de exo y/o endonucleasas,

c) extraer el ácido nucleico total de origen bacteriano, vírico y humano de la muestra de saliva estabilizada previamente obtenida,

d) precipitar y purificar los ácidos nucleicos totales,

45 e) incubar el ácido nucleico total purificado con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, y cebadores polinucleótidos en condiciones que permitan a la actividad de transcriptasa inversa de dicha enzima termoestable sintetizar ADNc a partir del ácido ribonucleico y amplificación del ADN genómico y ADNc a un nivel detectable por la reacción en cadena de la polimerasa,

f) detectar en un ensayo las secuencias de ADN amplificadas por hibridación con una o más sondas de polinucleótidos específicas para:

i) secuencias humanas seleccionadas de ARNm de SSAT (SEQ ID N° 62), ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63) y ARNm de IL8 (SEQ ID N° 64); o

5 ii) secuencias de bacterias seleccionadas de *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624, SEQ ID N° 65), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845, SEQ ID N° 66), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914, SEQ ID N° 67) y *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D, SEQ ID N° 68), o

iii) secuencias de virus seleccionadas de papilomavirus humano 16 (ATCC 45113, SEQ ID N° 69) o el papilomavirus humano 18 (ATCC 45152, SEQ ID N° 70).

10 Preferiblemente, dicho método se lleva a cabo detectando las secuencias de ADN amplificadas por hibridación con una o más sondas polinucleótidas específicas para i), ii) y iii).

En el método anterior, también se contempla añadir un ácido nucleico (ADN o ARN) calibrado y conocido al vial usado para recoger la saliva para medir la cantidad exacta de saliva recogida por comparación con una curva de calibración de ácido nucleico de referencia externo.

15 En relación con la etapa d), el ácido nucleico total presente en el reactivo conservante se puede purificar mediante una resina de afinidad de ácido nucleico.

En la etapa e), el ADN genómico purificado y el ARN total se incuban en el mismo tubo con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, que permite la combinación de RT y PCR en una reacción en un solo tubo, tal como la ADN polimerasa Tth, y cebadores polinucleótidos con secuencias de nucleótidos que detectan al menos uno de cada una de las secuencias i), ii) o iii).

20 De acuerdo con la invención, los cebadores polinucleótidos y sondas son ácido nucleico natural o ácido nucleico peptídico (PNA) o ácido nucleico modificado (superbase) que pueden hibridar con ácido nucleico (ADN y ARN).

La etapa f) puede comprender además la etapa de cuantificar el ADN amplificado por comparación con ADN o ARN de referencia cuantificado y determinar si el ácido nucleico está presente o no, presente en exceso o expresado en exceso en la muestra de saliva.

25 En una realización particular, la invención se refiere a un método para medir la presencia de factores de riesgo del cáncer oral en un sujeto humano que comprende las etapas de:

En una realización particular, la invención se refiere a un método para medir la presencia de factores de riesgo del cáncer oral en un sujeto humano que comprende las etapas de:

30 - La recuperación y conservación del ácido nucleico total de la saliva bruta frente a la degradación causada por nucleasas,

- Opcionalmente, la adición de un control de ácido nucleico positivo para el procedimiento analítico entero y cuantificación exacta de la cantidad de saliva,

- Extracción y concentración del ácido nucleico del ácido nucleico total (ADN genómico y ARN total),

35 - Una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en una etapa: El ADN genómico y ARN total purificados se incuban en el mismo tubo con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, que permite la combinación de RT y PCR en una reacción en un solo tubo, tal como la ADN polimerasa Tth, y cebadores polinucleótidos con secuencias de nucleótidos que detectan *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624, n° de acceso de Genbank AF543295), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845, n° de acceso de Genbank AJ555137), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914, n° de acceso de Genbank AJ617805), *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D, n° de acceso de Genbank AM285006), papilomavirus humano 16 (ATCC 45113, n° de acceso de Genbank EF422141), papilomavirus humano 18 (ATCC 45152, n° de acceso de Genbank EF422111), ARNm de SSAT (n° de acceso de Genbank NM002970), ARNm de H3F3A (n° de acceso de Genbank NM002107), ARNm de IL8 (n° de acceso de Genbank NM000584).

45 Mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real en una etapa, la invención permite al usuario llevar a cabo una RT-PCR rápida y simultáneamente detectar y cuantificar la presencia del ácido nucleico total del ARNm bacteriano, vírico y humano mediante seguimiento de la fluorescencia durante la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, sin ningún riesgo de falso positivo debido a la abertura del tubo entre la RT y la PCR y por posible contaminación ambiental del producto de la PCR debido a reacciones de amplificación precedentes en el mismo entorno.

50 El ARNm de la beta-actina (n° de acceso de Genbank X00351 - SEQ ID N° 61) es útil como referencia interna en la etapa a) para calibración y cuantificación.

En una realización preferida, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y con actividad de polimerasa dependiente de ADN, es la ADN polimerasa Tth.

5 Usando la extracción del ácido nucleico total y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real, en una etapa, en un mismo cartucho de microfluidos, la invención permite que el usuario lleve a cabo un análisis de diagnóstico inmediato que se puede usar en el consultorio médico y dental.

Alternativamente, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en una etapa y una micromatriz, la invención permite que el usuario lleve a cabo la RT-PCR y detecte y cuantifique la presencia del ácido nucleico total del ARNm bacteriano, vírico y humano, midiendo la señal de hibridación al final de la RT-PCR y compare con la referencia nucleica externa.

10 Preferiblemente, el método de la invención usa una micromatriz para diagnosticar una predisposición al cáncer oral en un sujeto humano, que comprende las secuencias de sondas seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID N° 32 a SEQ ID N° 60.

Ventajosamente, los cebadores polinucleótidos y sondas para amplificar y detectar al menos una de cada una de las secuencias i), ii) o iii) se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en las SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 60.

15 También se describen kits de partes asociadas con los métodos descritos en la presente memoria, tales como un kit para poner en práctica el método anterior, que comprende secuencias de cebadores y sondas para amplificar y detectar al menos una de cada una de las secuencias i), ii) o iii) representadas antes, y que incluye al menos uno de los siguientes:

20 a) un dispositivo estéril para recoger una muestra de saliva, que opcionalmente incluye un ácido nucleico de control y un reactivo de recolección,

b) un reactivo conservante, por ejemplo un reactivo conservante secado por atomización.

c) una resina que tiene afinidad por el ácido nucleico total,

d) una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN y polinucleótido.

25 Como se ha mencionado, antes, el reactivo de recolección es un tampón de dilución que preferiblemente es tampón de citrato.

30 El kit comprende un reactivo de conservación, que preferiblemente es un tampón que comprende una sal tal como tiocianato de guanidinio y/o sulfato amónico y/o azida sódica, y opcionalmente inhibidores de exo y/o endonucleasas. La sal azida sódica se usa preferiblemente en un intervalo de concentración entre 20 mM y 100 mM, más preferiblemente aproximadamente 40 mM. Otras sales, tales como el tiocianato de guanidinio, y/o sulfato amónico se añaden en una concentración 4 mM.

El reactivo conservante se proporciona en un formato seco en un tubo de plástico estéril a vacío, que puede preparar la saliva bruta asociada con el tampón de dilución.

35 Las secuencias de cebadores y sondas para amplificar y detectar al menos una de cada una de las secuencias i), ii) o iii) representadas antes, se definen mejor como que comprenden cebadores polinucleótidos para sintetizar ADNc por transcripción inversa, cebadores polinucleótidos para amplificar ADN genómico o ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa y sondas polinucleótidos para detectar el ADN amplificado.

40 En los kits de diagnóstico descritos en la presente memoria, el reactivo se puede proporcionar en los kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios con el fin de llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria. Normalmente se incluirán en el kit instrucciones, por ejemplo instrucciones escritas o de audio, en papel o soporte electrónico tal como cintas o CD, para llevar a cabo el ensayo.

45 En el primer aspecto, la presente invención se dirige al método in vitro de diagnóstico del cáncer oral en un sujeto humano, al método que comprende estabilizar una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano, y analizar una fracción volátil extraída de dicha saliva estabilizada, detectando en dicha fracción volátil al menos un compuesto orgánico bioquímico, en donde la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico es indicativo de un riesgo de desarrollar un cáncer oral.

50 Desde un punto de vista químico, los compuestos orgánicos bioquímico son miembros de una gran clase de compuestos bioquímicos cuyas moléculas contienen carbono. Pueden ser antígenos, hidratos de carbono, enzimas, hormonas, lípidos, ácidos grasos, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y aminoácidos, vitaminas, grasas y aceites.

Entre todos los compuestos orgánicos conocidos, los "compuestos orgánicos volátiles" (COV) se entiende que designan cualquier compuesto orgánico que sea volátil, es decir, que tienen una presión de vapor alta o punto de

ebullición bajo, y por lo tanto pueden evaporar a la temperatura y presión normales. Estos compuestos a menudo están regulados por los estados. Por ejemplo, en la Unión Europea, un “compuesto orgánico volátil” es cualquier compuesto orgánico que tiene un punto de ebullición inicial menor o igual a 250°C medido a presión atmosférica estándar de 101,3 kPa.

5 En el contexto de la invención, la “fracción volátil” se recupera calentando la muestra de saliva bruta. Preferiblemente, dicha fracción volátil se extrae de la muestra de saliva bruta calentando dicha muestra de saliva durante al menos 10 min, preferiblemente 20 min y más preferiblemente 30 min, a una temperatura comprendida entre 30°C y 50°C, preferiblemente 40°C. Durante este tiempo, la fracción volátil se separa de la muestra usando una microextracción en fase sólida (SPME) con una fibra recubierta de carboxeno/polidimetilsiloxano (fibra
10 CAR/PDMS).

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los compuestos orgánicos bioquímicos volátiles se extraen con un recubrimiento de fibra de CAR/PDMS durante al menos preferiblemente 20 min, e incluso más preferiblemente 30 min de una muestra de saliva que se calienta simultáneamente a una temperatura comprendida entre 30°C y 50°C, y preferiblemente a aproximadamente 40°C. La temperatura de desorción de la fibra está
15 comprendida entre 250°C y 300°C, y preferiblemente es de aproximadamente 280°C.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de preparación de muestra patentada basada en la adsorción de analitos directamente de una muestra acuosa sobre una fibra de sílice fundida recubierta. Esta técnica para las muestras es rápida, fácil de usar y elimina el uso de disolventes orgánicos (Mills G. et al, *Journal of Chromatography* 2000; Song C. et al, *Lung Cancer* 2009).

20 En esta tecnología, se usan a menudo las fibras de CAR/PDMS para detectar niveles de trazas de compuestos volátiles, y por lo tanto es bien conocida para el experto en la técnica (Garcia-Esteban M et al., *Talanta* 2004).

Preferiblemente, la detección de dicho compuesto orgánico bioquímico se lleva a cabo usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

25 En el contexto de la invención, un compuesto bioquímico se “detecta” cuando el nivel de expresión de dicho compuesto es al menos superior a 1,5 veces el nivel de expresión medio de dicho compuesto en la población normal.

Mediante la aplicación del método de la invención, se mostró que algunos compuestos bioquímicos eran expresados con mucho exceso en la fracción volátil de sujetos humanos que padecían cáncer oral y por lo tanto se encontró que era una herramienta de diagnóstico y/o pronóstico aguda y sensible para el cáncer oral. Es importante, que ninguno de estos compuestos se puede detectar en la fracción de fluido de la saliva, destacando la necesidad de estudiar la fracción volátil de la saliva en este caso.
30

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del riesgo o la predisposición al cáncer oral en un sujeto humano, analizando el contenido de compuestos bioquímicos en la fracción volátil de muestras estabilizadas de saliva, en donde la detección de al menos uno de los compuestos orgánicos bioquímicos se selecciona del grupo que consiste en 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), fenol (número CAS 108-95-2), butanal (número CAS 123-72-8), metilbutanona (número CAS: 563-80-4), 2-metil-2-butenol (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (*cis*)-1,2-dimetil-ciclopropano (número CAS: 930-18-7), es indicativa de un riesgo o predisposición al cáncer oral.
35

Realmente, los resultados presentados a continuación han mostrado que la detección de al menos uno de los siguientes compuestos: 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), en la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano tiene un riesgo alto de tener predisposición a desarrollar cáncer oral o tiene un riesgo alto de estar desarrollando un cáncer oral. De forma más precisa, la detección de al menos uno de los compuestos orgánicos bioquímicos mencionados antes indica que el sujeto humano ensayado tiene un riesgo superior a 60% de desarrollar un cáncer oral; la detección de al menos dos de los compuestos orgánicos bioquímicos mencionados antes indica que el sujeto humano ensayado tiene un riesgo superior a 70% de desarrollar un cáncer oral, y la detección de al menos 3 de los compuestos orgánicos bioquímicos mencionados antes indica que el sujeto humano ensayado tiene un riesgo superior a 80% de desarrollar un cáncer oral; la detección de al menos 4 de los compuestos orgánicos bioquímicos mencionados antes indica que el sujeto humano ensayado tiene un riesgo superior a 90% de desarrollar
55

un cáncer oral. Al contrario, cuando al menos uno de los compuestos orgánicos bioquímicos particulares descritos antes no se detecta en la muestra de saliva de un sujeto humano, significa que dicho sujeto humano tiene un riesgo bajo de desarrollar un cáncer oral.

5 Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 10, la detección de compuestos orgánicos bioquímicos del grupo que comprende: hexanitrito, 2,3-pentanodiona, 3-metiltiofeno y acetona, en la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano indica que dicho sujeto humano tiene un riesgo superior a 97% de desarrollar un cáncer oral, y por lo tanto tiene predisposición a desarrollar un cáncer oral o está desarrollando un cáncer oral.

10 Además, como se muestra en este ejemplo 11, la detección de la secuencia de ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63), SSAT (SEQ ID N° 62) y de los compuestos orgánicos bioquímicos hexanonitrilo, 2,3-pentanodiona, 3-metiltiofeno y acetona en la saliva de un sujeto humano permite detectar 100% de casos de cáncer en una población ensayada. Por lo tanto, en una realización preferida, la detección de la secuencia de ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63), SSAT (SEQ ID N° 62) y de los compuestos orgánicos bioquímicos hexanonitrilo, 2,3-pentanodiona, 3-metiltiofeno y acetona en la saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano está desarrollando un cáncer oral.

15 Además, como se ilustra a continuación, el método de la presente invención se puede basar en la detección de 3-metil-2-pentanona, metilbutanona, butanal, hexanal, hexanonitrilo, 1-propanol 2-propanol, (cis)-1,2-dimetilciclopropano, fenol y 2,3-butanodiona, con el fin de pronosticar o diagnosticar un cáncer oral en un sujeto humano.

20 En otra realización, la presente invención se dirige a un método de diagnóstico del riesgo o la predisposición al cáncer oral en un sujeto humano, en donde la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico en la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano indica que dicho sujeto humano no tiene predisposición a desarrollar un cáncer oral o no está desarrollando un cáncer oral.

25 Los compuestos 2-metil-2-buteno (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (cis)-1,2-dimetilciclopropano (número CAS 930-18-7) son expresados en exceso en la fracción volátil de sujeto humano sano y están ausentes en la fracción volátil de pacientes que padecen cáncer oral. Por lo tanto, estos compuestos pueden servir como "marcadores bioquímicos de estar sano". La detección de al menos uno, preferiblemente dos de estos compuestos orgánicos bioquímicos indica realmente que el sujeto humano tiene un riesgo bajo de tener predisposición de estar desarrollando un cáncer oral.

30 Además, la detección de compuestos orgánicos bioquímicos particulares tales como benzaldehído, acetona, 2,3-pentanodiona, por una parte, y la ausencia de otros compuestos orgánicos bioquímicos particulares tales como 2-metil-2-buteno, 2-metil-1-propeno, y/o (cis)-1,2-dimetilciclopropano, por otra parte, permite diagnosticar el cáncer oral con una sensibilidad alta (al menos 93%, véase el ejemplo 10).

Hay que destacar que la mayoría de estos compuestos bioquímicos no se han identificado nunca hasta ahora en la saliva. Además, ninguno de ellos se ha relacionado hasta ahora con la predisposición al cáncer, y aún más, con la predisposición al cáncer oral.

35 Por lo tanto, la invención se dirige también al uso de la detección de al menos un compuesto elegido entre: 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), 2-metil-2-buteno (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (cis)-1,2-dimetilciclopropano (número CAS 930-18-7), en un ensayo de diagnóstico para evaluar el riesgo de desarrollar un cáncer oral en un sujeto humano.

45 En una realización particular, la presente invención se dirige, por lo tanto, a un método de diagnóstico del riesgo o la predisposición al cáncer oral en un sujeto humano, que comprende las etapas de:

- a) recoger una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano en un dispositivo estéril,
- b) estabilizar dicha muestra por adición de una disolución que comprende una sal, tal como tiocianato de guanidinio, sulfato amónico y/o azida sódica,
- c) extraer la fracción volátil de dicha muestra estabilizada calentándola durante al menos 10 min a 40°C y usando, por ejemplo, la microextracción en fase sólida (SPME) para separar la fracción volátil,
- d) detectar al menos un compuesto orgánico bioquímico usando, por ejemplo, un cromatógrafo en fase gaseosa acoplado a un espectrómetro de masas,

en donde la detección de al menos uno, preferiblemente al menos dos, y más preferiblemente al menos tres compuestos orgánicos bioquímicos es indicativo de un riesgo o una predisposición al cáncer oral.

5 En una realización preferida, el al menos uno, preferiblemente al menos dos, y más preferiblemente al menos tres compuestos orgánicos bioquímicos detectados se eligen de: 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3) y 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), fenol (número CAS 108-95-2), butanal (número CAS 123-72-8), metilbutanona (número CAS: 563-80-4), 2-metil-2-butenol (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (*cis*)-1,2 dimetilciclopropano (número CAS: 930-18-7).

10 En una realización preferida, la detección de al menos un compuesto bioquímico detectado elegido de 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), y 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), es indicativa de un riesgo alto de desarrollar cáncer comparado con una población sana normal.

15 Al contrario, cuando se detecta al menos uno de los compuestos bioquímicos: 2-metil-2-butenol (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) o (*cis*)-1,2-dimetilciclopropano (número CAS 930-18-7), es indicativo de un riesgo bajo de desarrollar cáncer oral, es decir, un riesgo inferior a 10%, preferiblemente 5%, de desarrollar cáncer comparado con una población sana normal.

20 En un segundo aspecto, la presente invención se dirige al uso para poner en práctica un método de diagnóstico del riesgo o la predisposición al cáncer oral, basado en la fracción volátil, de un kit que comprende:

- a) un dispositivo estéril para recoger una muestra de saliva, que opcionalmente contiene un reactivo de recolección
- b) un reactivo conservante,
- 25 c) al menos un sensor electrónico,
- d) opcionalmente, un marcador molecular de control.

Como se ha mencionado antes, el reactivo de recolección es un tampón de dilución que es preferiblemente un tampón de citrato.

30 El kit comprende un reactivo conservante, que es preferiblemente un tampón que comprende una sal capaz de reducir la tensión de vapor de los compuestos volátiles sin permitir la degradación de dichos compuestos. Esta sal preferiblemente es una sal tal como tiocianato de guanidinio y/o sulfato amónico y/o azida sódica. Esta azida sódica se usa preferiblemente en un intervalo de concentración entre 20 mM y 6 M, preferiblemente entre aproximadamente 10 mM y 100 mM, más preferiblemente aproximadamente 40 mM. Otras sales, tales como el tiocianato de guanidinio y/o sulfato amónico, se añaden en una concentración 4 M.

35 En una realización de la presente invención, el reactivo conservante se proporciona en un formato seco en un tubo de plástico estéril a vacío, que puede preparar la saliva asociada con el tampón de dilución.

40 En el contexto de la invención, el dispositivo usado para detectar los compuestos orgánicos volátiles en la fracción volátil recogida de la saliva es un sensor electrónico, por ejemplo, narices electrónicas, narices electrónicas JPL, narices bioelectrónicas tipo FET, Alpha MOS. Estas tecnologías ahora se usan ampliamente y por lo tanto son conocidas para el experto en la técnica (Cho S.M., Sensors and Actuators 2006).

Usando sensores electrónicos específicos para identificar compuestos volátiles objetivo en una plataforma específica (nariz electrónica), la invención permite al usuario realizar una plataforma de análisis específico o un análisis de diagnóstico inmediato que se puede usar en consultorios médicos y dentales.

45 En una realización de la invención, los marcadores moleculares de control se eligen de: 1-bromobutano, 1-bromobenceno y 1,4-dibromobenceno.

Ejemplo 1: Estabilización de las muestras brutas de saliva

La saliva original se recoge con un dispositivo médico que hace más fácil la recolección de un volumen grande saliva (hasta 2 ml) seguido de estabilización de los biomarcadores de saliva (ADN, ARN, péptidos, compuesto volátil).

Se tragan entonces 4 ml de disolución de extracción de saliva durante 2 min para recoger 2 ml de saliva.

50 La disolución de extracción de saliva contiene:

- amarillo FD&C nº 5 (tartrazina)

- tampón de citrato (39 mM)

Después, los 2 ml de saliva diluida (en 4 ml) se transfieren a tubos que contienen azida sódica liofilizada para la estabilización de biomarcadores. La concentración final de azida sódica es aproximadamente 40 mM.

5 Se preparan 2 tubos para cada muestra. Un tubo está dirigido a los análisis "genéticos" (tubo 1) y el otro tubo (tubo 2) se usa para el análisis de los compuestos volátiles.

Los tubos se pueden transportar sin control de temperatura durante 10 días antes de ser analizados.

Ejemplo 2: Determinación y cuantificación simultáneas en la saliva estabilizada de la presencia de ARNm bacteriano, vírico y humano, para evaluar el riesgo de cáncer oral.

10 Se preparan de 0,250 a 3 ml de la disolución del tubo 1 y se extraen los ácidos nucleicos totales por centrifugación-filtración en una membrana de sílice sin etapa de DNAsa. Se extrae hasta un total de 1,5 mg del ácido nucleico total y se purifica a partir de 1 ml de saliva estabilizada.

15 El aislamiento de ADN y ARN de alta calidad de muestras de saliva entera es difícil porque en condiciones ambientales, la expresión y perfil de cuantificación son inestables en una escala de tiempo inferior a unos minutos. Esta inestabilidad es el resultado de la actividad metabólica de bacterias, nutrientes dependientes, concentración de nucleasas y renovación limitada del ARN en estas condiciones medioambientales. Con el fin de hacer el ácido nucleico inaccesible a la nucleasa, los autores de la invención usaron un tampón de conservación que comprende una sal para la lisis de la membrana de las bacterias así como células humanas, y precipita el ácido nucleico extraído en la muestra junto con la proteína celular. En relación con esto, los autores de la invención usaron una sal de guanidinio tal como tiocianato de guanidinio y/o sulfato amónico asociado o no con un inhibidor de ribonucleasa (EDTA < 10 mM).

20 Las dianas biológicas preferidas para detectar en la saliva bruta son *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624, nº de acceso en Genbank AF543295), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845, nº de acceso en Genbank AJ555137), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914, nº de acceso en Genbank AJ617805), *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D, nº de acceso en Genbank AM285006), papilomavirus humano 16 (ATCC 45113, nº de acceso en Genbank EF422141), papilomavirus humano 18 (ATCC 45152, nº de acceso en Genbank EF422111), ARNm de SSAT (nº de acceso en Genbank NM002970), ARNm de H3F3A (nº de acceso en Genbank NM002107), ARNm de IL8 (nº de acceso en Genbank NM000584).

El ARNm de la beta-actina (nº de acceso en Genbank X00351) se usa como control interno para la calibración y cuantificación.

30 Después de obtener células bacterianas, víricas, humanas y el ácido nucleico total humano extracelular de una muestra de saliva en un dispositivo estéril, se añade el tampón conservante en la muestra de saliva a temperatura ambiente. El tampón preferiblemente puede abrir células procariotas y eucariotas asociadas con la conservación de los ácidos nucleicos totales por acción de actividades de nucleasas de bloqueo y precipitación de los ácidos nucleicos totales. El reactivo de conservación se proporciona en un formato seco en un tubo de plástico de poli(tereftalato de etileno) (PET) estéril. El reactivo de estabilización se calibra para preparar hasta 3 ml de saliva asociada con un tampón de dilución. Los ácidos nucleicos calibrados y conocidos (ADN o ARN), por ejemplo, se pueden añadir al vial de recolección con el fin de medir la cantidad exacta de saliva recogida y analizada por comparación con la curva de calibración estándar externa obtenida después de extracción y cuantificación por PCR con transcriptasa inversa (algunas de las biodianas medidas se expresan en cantidad genómica por ml de saliva).

35 Los ácidos nucleicos calibrados y conocidos (ADN o ARN) añadidos al vial de recolección también permitirán verificar el rendimiento global del procedimiento analítico entero. Los ácidos nucleicos totales se purifican con una resina de afinidad de ácidos nucleicos. El sistema preferido de los autores de la invención usaba perlas paramagnéticas recubiertas compatibles con la sal de guanidinio, que tienen una tasa de recuperación de los ácidos nucleicos totales a partir de la muestra bruta de hasta 90% y sin selección entre el ARN y ADN.

45 El proceso de RT-PCR básico se lleva a cabo como sigue. El ARN presente en el ácido nucleico total contenido en la muestra se puede primero transcribir de forma inversa en ADNc (usando enzimas tal como la ADN polimerasa Tth como enzima purificada y un oligonucleótido o PNA u oligonucleótido modificado), y después desnaturalizar usando medios físicos, que son conocidos para los expertos en la materia. Un medio físico preferido para la separación de cadenas implica calentar el ácido nucleico hasta desnaturalización completa (>99%). Los métodos para amplificar las dianas de ARN usando una ADN polimerasa termoestable se describen en el documento W09109944 incorporado en la presente memoria por referencia. Las cadenas de ADN desnaturalizadas después se incuban en el mismo tubo con los cebadores oligonucleótidos seleccionados en condiciones de hibridación, condiciones que permiten la unión de los cebadores a las cadenas de ADN individuales. Como se conoce en la técnica, los cebadores se seleccionan de modo que sus posiciones relativas a lo largo de una secuencia dúplex son tales que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, cuando se separa de su complemento, sirve como un molde para la extensión del otro cebador para dar una cadena replicada de longitud definida. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura,

fuerza del cebador y uso del método.

Los cebadores oligonucleótidos preferidos para usar en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID N° 1 al SEQ ID N° 31.

5 La extensión dependiente de molde del o de los cebadores oligonucleótidos después es catalizada por el agente de polimerización (en presencia de cantidades adecuadas de los 4 trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP o análogos), en un medio de reacción que está compuesto de las sales adecuadas, cationes metálicos y sistema de tamponamiento del pH. Los productos de la síntesis son moléculas dúplex que consisten en cadenas molde y cadenas de extensión del cebador, que incluyen la secuencia diana. Estos productos, a su vez, sirven como moldes para otro ciclo de replicación. En el segundo ciclo de replicación, la cadena de extensión del cebador del primer ciclo se reasocia con su cebador complementario; la síntesis da un producto "corto" que está unido tanto en el extremo 5' como el 3' por secuencias de cebadores o sus complementos. Los ciclos repetidos de desnaturalización, reasociación de cebador y extensión dan como resultado la acumulación exponencial de la región diana definida por los cebadores. Se llevan a cabo suficientes ciclos para lograr la cantidad deseada de polinucleótido que contiene la región diana de ácido nucleico. La cantidad deseada puede variar, y está determinada por la función para la que va a servir el polinucleótido producto.

20 El método de la PCR se lleva a cabo en una forma en donde todos los reactivos se añaden de forma simultánea, en una etapa. En una realización preferida, la reacción de RT-PCR se lleva a cabo como un procedimiento automático que usa una enzima termostable como Tth. En un método preferido, la reacción de RT-PCR se lleva a cabo en un tipo de termociclador que tiene capacidad de leer hasta 4 colorantes fluorescentes diferentes y desarrollados/fabricados para los ensayos de PCR en tiempo real y de uso comercial.

25 Los expertos en la técnica también serán conscientes de los problemas de contaminación de una PCR por el ácido nucleico de bacterias previamente presentes en el agua usada para el tampón y que producen la amplificación no específica o de fondo. Se proporcionan métodos para reducir estos problemas usando el tampón, reactivos y enzimas adecuados para evitar fragmentos de cadena de ácido nucleico con un tamaño mayor de 100 pb. Todos los reactivos usados en la reacción de RT-PCR deben ser procesados antes de usar. Durante la amplificación por la PCR, los polinucleótidos diana se pueden detectar directamente por hibridación con un polinucleótido sonda que forma un híbrido estable con la secuencia diana en condiciones de hibridación y lavado de restricción alta a restricción baja. Las sondas típicamente están marcadas con sistemas de marcaje no radiactivos, tales como fluoresceínas y sistemas derivados.

30 Para la síntesis del ADNc, la actividad de transcriptasa inversa y con la actividad de polimerasa dependiente de ADN que permite la combinación de RT y PCR en una reacción en un solo tubo, tal como la ADN polimerasa Tth o una enzima similar a la ADN polimerasa Tth, y cebadores polinucleótidos con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 31, en condiciones que permiten la hibridación del polinucleótido a la región diana del ribonucleótido y la actividad de transcriptasa inversa de dicha polimerasa o enzima como la Tth; y (c) se amplificaron los ADNc formados hasta un nivel detectable por la reacción en cadena de la polimerasa con dicha enzima polimerasa como la ADN polimerasa Tth y cebadores y sondas polinucleótidos con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 60.

40 Más en particular, la combinación preferida de cebadores y sondas usados para detectar ARNm bacteriano, vírico y humano, consiste en las secuencias:

Prevotella melaninogenica (ATCC 25845, n° de acceso en Genbank AJ 555137)

Seq ID N° 1 + Seq ID N° 2 + Seq ID N° 32, o Seq ID N° 1 + Seq ID N° 2 + Seq ID N° 49, o Seq ID N° 3 + Seq ID N° 2 + Seq ID N° 49, o Seq ID N° 1 + Seq ID N° 4 + Seq ID N° 32, o Seq ID N° 3 + Seq ID N° 5 + Seq ID N° 49

45 ***Streptococcus mitis*** (ATCC 15914, n° de acceso en Genbank AJ617805)

Seq ID N° 6 + Seq ID N° 8 + Seq ID N° 50 o Seq ID N° 7 + Seq ID N° 8 + Seq ID N° 33 o Seq ID N° 7 + Seq ID N° 8 + Seq ID N° 51

Capnocytophaga gingivalis (ATCC 33624, n° de acceso en Genbank AF543295)

Seq ID N° 9 + Seq ID N° 10 + Seq ID N° 34 o Seq ID N° 9 + Seq ID N° 10 + Seq ID N° 52

50 ***Micrococcus luteus*** (ATCC 53598D, n° de acceso en Genbank AM285006)

Seq ID N° 11 + Seq ID N° 12 + Seq ID N° 35, o Seq ID N° 11 + Seq ID N° 12 + Seq ID N° 53

Papilomavirus humano 16 (ATCC 45113, n° de acceso en Genbank EF422141),

Seq ID N° 13 + Seq ID N° 14 + Seq ID N° 36

Papilomavirus humano 18 (ATCC 45152, nº de acceso en Genbank EF422111)

Seq ID Nº 15 + Seq ID Nº 16 + Seq ID Nº 37

ARNm de beta actina (nº de acceso en Genbank X00351)

5 Seq ID Nº 17 + Seq ID Nº 18 + Seq ID Nº 38 o Seq ID Nº 17 + Seq ID Nº 18 + Seq ID Nº 39 o Seq ID Nº 17 + Seq ID Nº 18 + Seq ID Nº 54 o Seq ID Nº 17 + Seq ID Nº 18 + Seq ID Nº 55 o Seq ID Nº 19 + Seq ID Nº 20 + Seq ID Nº 40 o Seq ID Nº 19 + Seq ID Nº 20 + Seq ID Nº 41 o Seq ID Nº 19 + Seq ID Nº 20 + Seq ID Nº 56

ARNm de SSAT (nº de acceso en Genbank NM002970)

Seq ID Nº 22 + Seq ID Nº 23 + Seq ID Nº 42 o Seq ID Nº 22 + Seq ID Nº 23 + Seq ID Nº 57 o Seq ID Nº 24 + Seq ID Nº 25 + Seq ID Nº 43

10 **ARNm de H3F3A** (nº de acceso en Genbank NM002107)

Seq ID Nº 26 + Seq ID Nº 27 + Seq ID Nº 44 o Seq ID Nº 26 + Seq ID Nº 27 + Seq ID Nº 58 o Seq ID Nº 26 + Seq ID Nº 27 + Seq ID Nº 45 o Seq ID Nº 28 + Seq ID Nº 29 + Seq ID Nº 46 o Seq ID Nº 28 + Seq ID Nº 29 + Seq ID Nº 59

ARNm de IL8 (nº de acceso en Genbank NM000584)

15 Seq ID Nº 30 + Seq ID Nº 31 + Seq ID Nº 47 o Seq ID Nº 30 + Seq ID Nº 31 + Seq ID Nº 48 o Seq ID Nº 30 + Seq ID Nº 31 + Seq ID Nº 60

También, de acuerdo con la invención, las sondas preferidas usadas para detectar ARNm bacteriano, vírico y humano fijado en una superficie de micromatriz, se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID Nº 32 a SEQ ID Nº 60.

Ejemplo 3: Análisis de marcadores genéticos en la fracción de fluido por más de 2 etapas separadas

20 1- La muestra de saliva (hasta 1000 µl) se mezcla con un tampón de dilución (reactivo estéril exento de nucleasa) y se pasa a un tubo de plástico de poli(tereftalato de etileno) (PET) estéril. El reactivo conservante y un ácido nucleico conocido (ribonucleótido sintético puro) se calibran para preparar hasta 3 ml de saliva asociada con el tampón de dilución. El procedimiento completo debe realizarse en menos de 2 min. Este procedimiento permite la conservación inmediata de los ácido nucleicos totales a temperatura ambiente durante hasta 10 días para permitir retrasos en el transporte por correo ordinario al laboratorio.

25 2- Se lleva a cabo la lisis en el laboratorio, se transfieren hasta 1000 µl de líquido del tubo de plástico de PET a un tubo estéril de 2 ml con hasta 1 ml de tampón de lisis y después se incuban a 35°C +/- 2°C durante hasta 1 h.

30 3- El lisato se procesa para la purificación de los ácidos nucleicos totales con sílice magnética o perlas de poliestireno o columnas con diseño en embudo que tienen membrana de sílice Miniprep Spin para concentrar el ácido nucleico en la circulación del plasma. El volumen de elución es hasta 100 µl. Se usan 5-2 µl (hasta 5 µl) de extracto de ácidos nucleicos puro para la RT-PCR en tiempo real en una etapa (RotorGene) con enzima como Tth y el siguiente programa con la sonda Taqman: I: transcripción inversa 61°C/20 min (20°C/s), II: Desnaturalización 95°C/30 s (20°C/s), III: PCR (35 ciclos) 95°C/5 s (20°C/s) 60°C/30 s (20°C/s). La fluorescencia emitida se mide al final de los 60°C.

35 **Ejemplo 4: Análisis de la fracción de fluido de la muestra de saliva usando micromatrices**

40 1- La muestra de saliva (hasta 1000 µl) se mezcla con un tampón de dilución (agua estéril exenta de nucleasa) y se pasa a un tubo de plástico de poli(tereftalato de etileno) (PET) estéril. El reactivo conservante y un ácido nucleico conocido (ribonucleótido sintético puro) se calibran para preparar hasta 3 ml de saliva asociada con el tampón de dilución. El procedimiento completo debe realizarse en menos de 2 min. Este procedimiento permite la conservación inmediata de los ácido nucleicos totales a temperatura ambiente durante hasta 10 días para permitir retrasos en el transporte por correo ordinario al laboratorio.

2- Se lleva a cabo la lisis en el laboratorio, se transfieren hasta 1000 µl de líquido del tubo de plástico de PET a un tubo estéril de 2 ml con hasta 1 ml de tampón de lisis y después se incuban a 35°C +/- 2°C durante hasta 1 h.

45 3- El lisato se procesa para la purificación de los ácidos nucleicos totales con sílice magnética o perlas de poliestireno o columnas con diseño en embudo que tienen membrana de sílice en Miniprep Spin para concentrar el ácido nucleico en la circulación del plasma. El volumen de elución es hasta 100 µl. Se usan 5-2 µl (hasta 5 µl) de extracto de ácidos nucleicos puro para la RT-PCR en una etapa con enzima como Tth y el siguiente programa sin sondas: I: transcripción inversa 61°C/20 min (20°C/s), II: Desnaturalización 95°C/30 s, III: PCR (35 ciclos) 95°C/20 s, 60°C/20 s, 70°C/30 s.

50 Los cebadores están marcados con Cy5 de fluorescencia. Las sondas se han aplicado como recubrimiento sobre la

superficie de un portaobjetos de PET usando brazos de oligonucleótidos.

Se mezclan 5 µl del ADN amplificado con 30 µl de tampón de hibridación y se incuban 2 min a 95°C. Se hibridan 25 µl del ADN amplificado desnaturalizado sobre la micromatriz a temperatura ambiente durante 10 min, se lavan brevemente en dos tampones de lavado. La micromatriz se seca y se mide la fluorescencia en un escáner y se compara con las referencias.

Ejemplo 5: Análisis de la fracción de fluido de saliva usando instrumento de diagnóstico inmediato por PCR en tiempo real asociado a un cartucho de microfluidos capaz de extraer y amplificar ácidos nucleicos totales (solución GeneXpert™ de Cepheid Inc o sistema Liat™ de Iqum Inc).

1- La muestra de saliva (hasta 1000 µl) se mezcla con un tampón de dilución (agua estéril exenta de nucleasa) y se pasa a un tubo de plástico de poli(tereftalato de etileno) (PET) estéril. El reactivo conservante y un ácido nucleico conocido (ribonucleótido sintético puro) se calibran para preparar hasta 3 ml de saliva asociada con el tampón de dilución.

El procedimiento completo debe realizarse en menos de 2 min.

Este procedimiento permite la conservación inmediata del ácido nucleico total a temperatura ambiente durante hasta 10 días para permitir retrasos en el transporte por correo ordinario al laboratorio o el análisis directo en el consultorio médico o dental.

2- Se transfieren hasta 3 ml o 5 ml de saliva en reactivo de estabilización a la cámara del cartucho de microfluidos que tiene tampón de lisis para el procesamiento para purificar los ácidos nucleicos totales con perlas de poliestireno y/o asociados con lisis física y/o mecánica. Sin intervención de ningún técnico, 2 µl (hasta 5 µl) de ácidos nucleicos puros extraídos se transfieren a la cámara de RT-PCR en tiempo real, en una etapa, que tiene enzima como la Tth y reactivos de PCR mezclados asociados y le sigue el programa

- con la sonda Taqman: I: transcripción inversa 61°C/20 min (20°C/s), II: Desnaturalización 95°C/30 s (20°C/s), III: PCR (35 ciclos) 95°C/5 s (20°C/s) 60°C/30 s (20°C/s). La fluorescencia emitida se mide al final de los 60°C.

Ejemplo 6: Evaluación del exceso de expresión de varios marcadores genéticos en la saliva de pacientes con cáncer oral por PCR cuantitativa

1- La muestra de saliva (hasta 1000 µl) se mezcla con un tampón de dilución (agua estéril exenta de nucleasa) y se pasa a un tubo de plástico de poli(tereftalato de etileno) (PET) estéril. El reactivo conservante y un ácido nucleico conocido (ribonucleótido sintético puro) se calibran para preparar hasta 3 ml de saliva asociada con el tampón de dilución. El procedimiento completo debe realizarse en menos de 2 min. Este procedimiento permite la conservación inmediata de los ácidos nucleicos totales a temperatura ambiente durante hasta 10 días para permitir retrasos en el transporte por correo ordinario al laboratorio.

2- Se lleva a cabo la lisis en el laboratorio, se transfieren 250 µl de líquido del tubo de plástico de PET a un tubo estéril de 2 ml con proteinasa K y después se incuban a 56°C +/- 2°C durante hasta 1 h. Se incuban la muestra antes de la lisis con un tampón de lisis, 10 min a 70°C +/-2°C.

3- El lisato se procesa para la purificación de los ácidos nucleicos totales con columnas con diseño en embudo que tienen membrana de sílice en Miniprep Spin capaces de concentrar el ácido nucleico. El volumen de elución es hasta 100 µl. Se usan 2 µl (hasta 5 µl) de extracto de ácidos nucleicos puro para las RT-PCR en una etapa con enzima como Tth y para las PCR en una etapa con enzima como ADN polimerasa. Se lleva a cabo el siguiente programa para la RT-PCR en una etapa: I: transcripción inversa 48°C/15 min, II: Desnaturalización 95°C/10 s, III: PCR (40 ciclos) 95°C/15 s, 60°C/60 s. Se lleva a cabo el siguiente programa para la PCR en una etapa: I: Desnaturalización 95°C/30 s, II: PCR (45 ciclos) 95°C/10 s, 60°C/ 10 s, 72°C/35 s.

Las PCR en una etapa, usando los cebadores de SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 10 permiten amplificar el ADN de *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis* y *Capnocytophaga gingivalis* respectivamente. El sistema de detección y cuantificación es un sistema Syber Green, o un sistema de sonda que usa la SEQ ID N° 32 o SEQ ID N° 49 para la cuantificación de *Prevotella melaninogenica*, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 51 para la cuantificación de *Streptococcus mitis* y SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 52 para la cuantificación de *Capnocytophaga gingivalis*.

Las RT-PCR en una etapa, usando los cebadores de SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 o SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 22 y SEQ ID N° 23 permiten amplificar el ARNm de H3F3A y SSAT respectivamente. El sistema de detección y cuantificación puede ser un sistema Syber Green o un sistema de sonda usando las SEQ ID N° 44 o SEQ ID N° 58 o SEQ ID N° 45 o SEQ ID N° 46 o SEQ ID N° 59 para la cuantificación de H3F3A y SEQ ID N° 42 o SEQ ID N° 57 para la cuantificación de SSAT. Cada ensayo se confirma usando los kits de sonda comercial (ABI) que amplificaban el gen de H3F3A NM005324 en el exón 4 y el gen de SSAT NM 002970 en los exones 3 y 4.

Los resultados obtenidos para los pacientes de la población con cáncer oral frente a los individuos sanos se

presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Exceso de expresión de biomarcador genético en población con cáncer oral

Nombre del biomarcador genético	Exceso de expresión en la población con cáncer oral
<i>Streptococcus mitis</i>	2,80 X
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	2,00 X
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2,30 X
SSAT	2,63 X
H3F3A	2,56 X

5 Se concluyó a partir de estos datos que la “detección” de un determinado marcador genético (ADN o ARN) en una muestra de saliva de un paciente significa que dicha muestra contiene al menos 2 veces la cantidad de dicho marcador en la población normal.

10 Es importante que se ha detectado el estado tumorigeno de 11 muestras entre 17 usando los marcadores genéticos SSAT, H3F3A y la secuencia de la bacteria *Streptococcus mitis*. Por lo tanto, se puede concluir que la detección de al menos 3 marcadores genéticos en la saliva de un sujeto humano permite diagnosticar un cáncer oral con una sensibilidad de 64%. En otras palabras, la detección del ARNm de SSAT, el ARNm de H3F3A y la secuencia de la bacteria *Streptococcus mitis* indican que el sujeto humano tiene un riesgo superior a 60% de desarrollar un cáncer oral.

Por consiguiente, no se considera que la IL8 sea un marcador significativo para el cáncer oral en la saliva.

Ejemplo 7: Análisis de los compuestos orgánicos volátiles en la fracción volátil de la saliva

15 Se sabe desde hace un tiempo, que se pueden extraer los compuestos volátiles de muestras de fluidos de la cavidad oral, dando la posibilidad de explorar la saliva como material a analizar para enfermedades patógenas (Volozhin et al. *Stomatologia* (mosk), 2001;80(1):9-12).

20 En el presente caso, se pone 1 ml de disolución de saliva en un vial de vidrio con 10 µl de la disolución de referencia con 1 ppm de 3 referencias (1-bromobutano, 1-bromobenceno y 1,4-dibromobenceno; disolución final con 1 ppm preparada en agua pura).

25 Las muestras se ponen a temperatura ambiente durante al menos 1 h antes del análisis. Las muestras se calientan a 40°C durante 10 min y después se lleva a cabo la extracción de los compuestos volátiles a 40°C, usando una fibra CAR/PDMS (conjunto de fibra de SPME CAR/PDMS de 75 µm (Supelco, Bellefont, PA, EE.UU.)), durante 30 min. Después, el análisis se llevó a cabo usando GC/MS. La temperatura del puerto de inyección de GC es 280°C. La inyección de las moléculas volátiles en GC/MS se lleva a cabo por desorción térmica de la fibra a 280°C. La separación de los compuestos volátiles se llevó a cabo con una columna capilar no polar. El programa de temperatura de la columna era: temperatura inicial de 45°C durante 5 min, después aumento a 3°C/min a 230°C durante 2 min. Los espectros de masas se miden por impacto electrónico a 70 eV.

La identificación de las moléculas volátiles se obtiene por:

- 30 - comparación de los índices de retención experimentales con los del banco de datos interno
- comparación de los espectros experimentales con los del banco Wiley 275K.

Los resultados del análisis exhaustivo de todos los compuestos orgánicos volátiles encontrados en la fracción volátil de la saliva humana se recogen en la tabla 2.

Tabla 2: Compuestos orgánicos volátiles en la fracción volátil de la saliva humana

Nombre de la molécula	número CAS
1,2-diclorobenceno	95-50-1
disulfuro de carbono	137-26-8
ácido bencenocarboxílico	65-85-0
ácido heptanoico	111-14-8
ácido nonanoico	112-05-0
ácido octanoico	124-07-2
ácido pentanoico	109-52-4
2-metil-2-propenal	78-85-3
butanal	123-72-8
3-metil-butanal	590-86-3
decanal	112-31-2
etanal	75-07-0

Nombre de la molécula	número CAS
heptanal	111-71-7
hexanal	66-25-1
2-etil-hexanal	123-05-7
nonanal	124-19-6
octanal	124-13-0
2-metil-propanal	78-84-2
4,4-dimetil-2-metilen-valeraldehído	5375-28-0
1-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptano	1713-33-3
metil-ciclopentano	96-37-7
decano	124-18-5
hexano	110-54-3
metilciclohexano	108-87-2
nonano	111-84-2
2,2,4-trimetil-pentano	540-84-1
2-metil-pentano	107-83-5
3-metil-pentano	96-14-0
benceno	71-43-2
etilbenceno	100-41-4
hidroxilueno butilado	128-37-0
deshidro-p-cimeno	1195-32-0
dibenzofurano	132-64-9
m-xileno	108-38-3
o-xileno	95-47-6
p-cimeno	99-87-6
estireno	100-42-5
tolueno	108-88-3
3,5,5-trimetil-1-hexeno	4316-65-8
2,5,5-trimetil-2-hexeno	40467-04-7
éster etílico del ácido 2-metilbutanoico	7452-79-1
éster etílico del ácido 3-metilbutanoico	108-64-5
tiolacetato de metilo	1534-08-3
butanoato de etilo	105-54-4
propanoato de etilo	105-37-3
etil-N-metilcarbamato	105-40-8
acetato de metilo	79-20-9
2-metil-1,3-dioxolano	497-26-7
éter de terc-butilo y etilo	637-92-3
bromoetano	74-96-4
bromometano	74-83-9
clorobutanol	57-15-8
dibromometano	74-95-3
diclorometano	75-09-2
3-bromo-heptano	1974-05-6
1-cloro-hexano	544-10-5
3-cloro-hexano	2346-81-8
2-cloro-4-(1,1-dimetilpropil)-fenol	98-28-2
tribromometano	75-25-2
1H-pirrol	109-97-7
1-metil-1H-pirrol	96-54-8
2-furfural	98-01-1
2-acetil-furano	1192-62-7
2-etil-furano	3208-16-0
2-pentil-furano	3777-69-3
3-metil-furano	930-27-8
5-metil-2-propionil-furano	33978-70-0
pirazina	290-37-9
2,5-dimetil-pirazina	123-32-0
etilpirazina	13925-00-3
metilpirazina	109-08-0
piridina	110-86-1
2-butenonitrilo	4786-20-3
2-piperidinona	675-20-7

ES 2 441 586 T3

Nombre de la molécula	número CAS
3-butenonitrilo	109-75-1
bencenoisocianato	103-71-9
benzonitrilo	100-47-0
3-metil-butanonitrilo,	625-28-5
isociano-etano	624-79-3
isocianato de etilo	109-90-0
propanonitrilo	107-12-0
2-metil-propanonitrilo	78-82-0
1-hexanol	111-27-3
2-etil-1-hexanol	104-76-7
1-pentanol	71-41-0
2-metil-1-propanol	78-83-1
2-butanol	15892-23-6
2-metil-2-butanol	75-85-4
2,5-dimetil-2-hexanol	3730-60-7
2-metil-2-pentanol	590-36-3
2-metil-2-propanol	75-65-0
3-hexanol	623-37-0
etanol	64-17-5
fenol	108-95-2
4-(1,1-dimetilpropil)-fenol	80-46-6
escatol	83-34-1
1,3-isobenzofuranodiona	85-44-9
2,3-octanodiona	585-25-1
3-metil-2,4-pentanodiona	815-57-6
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	719-22-2
2-butanona	78-93-3
3,3-dimetil-2-butanona	75-97-8
3-hidroxi-2-butanona	513-86-0
3,4,4-trimetil-2-ciclohexen-1-ona	17299-41-1
2,3-dimetil-2-ciclopenten-1-ona	1121-05-7
3-metil-2-ciclopenten-1-ona	2758-18-1
3-metil-2-hexanona	2550-21-2
2-metil-2-ciclopenten-1-ona	1120-73-6
3-heptanona	106-35-4
5-metil-3-hepten-2-ona	5090-16-4
3-octanona	106-68-3
3-metil-3-penten-2-ona	565-62-8
6-metil-5-hepten-2-ona	110-93-0
acetofenona	98-86-2
ciclohexanona	108-94-1
2-metil-ciclopentanona	1120-72-5
3-metil-ciclopentanona	1757-42-2
metilbutanona	563-80-4
p-metilacetofenona	122-00-9
disulfuro de dimetilo	624-92-0
metanotiol	74-93-1
dimetil-sulfona	67-71-0
sulfuro de dimetilo	75-18-3
(Z)-cariofileno	118-45-0
anetol (E)	4180-23-8
a-pineno	80-56-8
a-terpineol	10482-56-1
a-tuyeno	2867-05-2
b-burboneno	5208-59-3
b-cariofileno	87-44-5
b-pineno	127-91-3
canfeno	79-92-5
carvona	2244-16-8
cis-p-mentan-3-ona	491-07-6
dihidromircenol	18479-59-9
eucaliptol	470-82-6

Nombre de la molécula	número CAS
limoneno	138-86-3
m-menta-6,8-dieno	1461-27-4
neo-mentol	491-01-0
piperitona	89-81-6
p-ment-3-eno	500-00-5
trans-p-mentan-3-ona	89-80-5
benzaldehído	100-52-7
2-octanona	111-13-7
2-heptanona	110-43-0
2,3-pentanodiona	600-14-6
3-metil-2-pentanona	565-61-7
ácido acético	64-19-7
3-hexanona	589-38-8
2-metil-1-propeno	115-11-7
2-metil-benzaldehído	529-20-4
ácido propanoico	79-09-4
ácido butanoico	107-92-7
2-metil-3-pentanona	565-69-5
4,4-dimetil-2-pentanona	590-50-1
acetato de etilo	141-78-6
3-metil-tiofeno	616-44-4
2-pentanona	107-87-9
2-hexanona	591-78-6
ácido isovalérico	503-74-2
4-metil-2-pentanona	108-10-1
2-metil-2-buteno	513-35-9
1-propanol	71-23-8
(E)-2-metil 2-butenal	497-03-0
ácido 2-metil-butanoico	116-53-0
2-propanol	67-63-0
ácido isobutírico	79-31-2
2-metil-1-propenil-benceno	768-49-0
ácido hexanoico	142-62-1
acetona	67-64-1
ácido 4-metil-pentanoico	646-07-1
(cis)-1,2-dimetilciclopropano	930-18-7
p-cresol	106-44-5
2,3-butanodiona	431-03-8
3-metil-1-butanol	123-51-3
m-metil-acetofenona	585-74-0
5-metil-3-hexen-2-ona	5166-53-0
indol	120-72-9
3,4-dimetil-3-hexen-2-ona	1635-02-5
pentanal	110-62-3
2,3-dimetil-2-pentanol	4911-70-0
m-cimeno	535-77-3
ciclohexanona	108-94-1
anilina	62-53-3
2-metil-furano	534-22-5
2,4 dimetil-3-pentanona	565-80-0
3-metil-3-buten-2-ona	814-78-8
hexanonitrilo	628-73-9
heptanonitrilo	629-08-3
pentanonitrilo	110-59-8
butanonitrilo	109-74-0
acrilonitrilo	107-13-1

A partir de los estudios experimentales de los autores de la invención, se han identificado 192 moléculas volátiles en la fracción volátil de la saliva humana (tabla 2). Los principales compuestos volátiles identificados en la saliva son cetonas, ácidos, aldehídos, alcoholes y compuestos aromáticos.

Entre estos compuestos, se han preseleccionado 57 compuestos volátiles para usar como posible factor discriminante de biomarcadores para la detección temprana del cáncer oral (tabla 3)

Tabla 3: Compuestos volátiles potencialmente indicativos de la susceptibilidad al cáncer oral

Nombre de la molécula	número CAS
benzaldehído	100-52-7
2-octanona	111-13-7
2-heptanona	110-43-0
2,3-pentanodiona	600-14-6
3-metil-2-pentanona	565-61-7
ácido acético	64-19-7
3-hexanona	589-38-8
2-metil-1-propeno	115-11-7
2-metil-benzaldehído	529-20-4
ácido propanoico	79-09-4
ácido butanoico	107-92-7
2-metil-3-pentanona	565-69-5
4,4-dimetil-2-pentanona	590-50-1
acetato de etilo	141-78-6
3-metil-tiofeno	616-44-4
2-pentanona	107-87-9
2-hexanona	591-78-6
ácido isovalérico	503-74-2
4-metil-2-pentanona	108-10-1
2-metil-2-buteno	513-35-9
1-propanol	71-23-8
(E)-2-metil-2-butenal	497-03-0
ácido 2-metil-butanoico	116-53-0
2-propanol	67-63-0
ácido isobutírico	79-31-2
2-metil-1-propenilbenceno	768-49-0
ácido hexanoico	142-62-1
acetona	67-64-1
ácido 4-metil-pentanoico	646-07-1
(cis)-1,2-dimetilciclopropano	930-18-7
p-cresol	106-44-5
2,3-butanodiona	431-03-8
3-metil-1-butanol	123-51-3
m-metil acetofenona	585-74-0
5-metil-3-hexen-2-ona	5166-53-0
indol	120-72-9
3,4-dimetil-3-hexen-2-ona	1635-02-5
pentanal	110-62-3
2,3-dimetil-2-pentanol	4911-70-0
m-cimeno	535-77-3
ciclohexanona	108-94-1
anilina	62-53-3
2-metil-furano	534-22-5
2,4-dimetil-3-pentanona	565-80-0
3-metil-3-buten-2-ona	814-78-8
hexanonitrilo	628-73-9
heptanonitrilo	629-08-3
pentanonitrilo	110-59-8
butanonitrilo	109-74-0
3-metil-2-pentanona	565-61-7
metilbutanona	563-80-4
butanal	123-72-8
hexanal	66-25-1
fenol	108-95-2
m-xileno	108-38-3
p-xileno	106-42-3
etanal	75-07-0

Nombre de la molécula	número CAS
benceno	71-43-2
acrilonitrilo	107-13-1

De acuerdo con los resultados de los autores de la invención, al menos 19 de estos 57 compuestos están realmente correlacionados con el cáncer oral, como se muestra a continuación.

Ejemplo 8: Cuantificación de los compuestos volátiles identificados en pacientes con cáncer/sanos

5 La cuantificación de los compuestos volátiles se hace por comparación con controles de referencia que se han añadido en el tampón de conservación al principio del experimento. En este caso, se han usado las siguientes referencias moleculares:

1-bromobutano (número CAS 109-65-9)

1-bromobenceno (número CAS 108-86-1)

10 1,4-dibromobenceno (número CAS 106-37-6)

Tabla 4: Biomarcadores particulares indicativos de la predisposición al cáncer oral

Nombre del biomarcador	Exceso de expresión en la población con cáncer oral	Exceso de expresión en la población normal
2,3-pentanodiona	6,00 X	
3-metiltiofeno	1,50 X	
acetona	2,30 X	
hexanitrilo	3,00 X	
benzaldehído	1,80 X	
3-metil-2-pentanona	2,10 X	
2,3-butanodiona	4,40 X	
2-propanol	2,80 X	
acetato de etilo	3,90 X	
1-propanol	1,90 X	
hexanal	1,60 X	
5-metil-3-hexen-2-ona	1,70 X	
m- y p-xileno	1,50 X	
2-metil-2-butenal (E)	1,90 X	
2-metil-2-buteno		2,00 X
2-metil-1-propeno		3,30 X
(cis)-1,2-dimetilciclopropano		1,70 X

15 A partir de estos datos se concluyó que la "detección" de un determinado compuesto volátil en una muestra de saliva de un paciente significa que dicha muestra contiene al menos 1,5 veces la cantidad de dicho compuesto en la población normal.

Ejemplo 9: Análisis estadístico de la presencia de compuestos orgánicos bioquímicos en la saliva de pacientes con cáncer oral frente a individuos sanos

20 Se usa el software STATISTICA versión 8.0 de StatSoft Francia (2007) para el análisis de datos. Se ensayaron las significancias de las diferencias entre los grupos por análisis discriminante factorial (FDA). Así se pueden visualizar gráficamente las similitudes o las diferencias de las muestras.

La identificación de las moléculas volátiles se obtiene por:

- Comparación de los índices de retención experimentales con los del banco de datos interno,

- Comparación de los espectros experimentales con los del banco Wiley 275K y NIST 2.0d, construido en abril de 2005.

25 - Modelo estadístico 1

La población total ensayada es 45 sujetos humanos de dos áreas geográficas medioambientales distintas. La población con cáncer oral se confirma por diagnóstico visual realizado por un centro anticáncer.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con 109 compuestos volátiles. Las abundancias de las moléculas en cada muestra se refirieron respecto a las abundancias de las 3 referencias internas analizadas en la saliva. Los

compuestos volátiles principales identificados en la saliva son cetonas, ácidos, aldehídos, alcoholes y compuestos aromáticos. Todas las muestras tienen una abundancia grande en ácido hidrazoico procedente directamente de la disolución tampón de conservación.

- 5 De los 108 compuestos volátiles, 49 son significativos para separar el grupo de "tumor" del grupo de referencia. Un análisis factorial discriminante de estas variables permite clasificar bien 97,78% de las muestras con 4 compuestos volátiles: hexanonitrilo, 2,3-pentanodiona, 3-metiltofeno y acetona. Solo se ha detectado 1 falso positivo con el modelo estadístico 1.

- Modelo estadístico 2

- 10 La población total ensayada es 45 sujetos humanos de dos áreas geográficas medioambientales distintas. La población con cáncer oral se confirma por diagnóstico visual realizado por un centro anticáncer.

- 15 Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con 108 compuestos volátiles. Las abundancias de las moléculas en cada muestra se refirieron respecto a las abundancias de las 3 referencias internas analizadas en la saliva. Los compuestos volátiles principales identificados en la saliva son cetonas, ácidos, aldehídos, alcoholes y compuestos aromáticos. Todas las muestras tienen una abundancia grande en ácido hidrazoico procedente directamente de la disolución tampón conservante.

Todos los compuestos volátiles nitrilos se eliminaron del modelo estadístico número 2. Para este estudio, los 10 compuestos que constituyen los "nitrilos" no se tuvieron en cuenta.

De los 98 compuestos volátiles restantes, un ensayo ANOVA de acuerdo con el factor de "tumor" mostró que 45 componentes son significativos para separar el grupo de "tumor" del grupo de referencia.

- 20 Un análisis factorial discriminante de estas variables permite clasificar bien 93,33% de las muestras con 4 compuestos volátiles: benzaldehído, acetona, 2,3-pentanodiona y 2-metil-2-butenol. Las 3 primeras moléculas están del lado del grupo de "tumor" y el 2-metil-2-butenol del lado del grupo de control. Se detectaron 3 falsos negativos y 1 falso positivo con el modelo estadístico 2.

- 25 Para concluir, este estudio destaca la estrecha unión que existe entre 14 compuestos orgánicos (en concreto, hexanonitrilo, 2,3-pentanodiona, 3-metiltofeno, 2-metil-2-buteno, 3-metil-2-pentanona, 2,3-butanodiona, 2-propanol, acetato de etilo, 1-propanol, hexanal, 5-metil-3-hexen-2-ona, m-xileno, p-xileno, 2-metil-2-butenal (E)) y el cáncer oral en seres humanos. Hay que destacar que ninguno de ellos se había encontrado nunca en el aire exhalado (Mashir A, *Advanced Powder Technology*, 2009).

Ejemplo 10: Ensayo de diagnóstico basado en las proporciones de moléculas orgánicas específicas

- 30 Se usa el software STATISTICA versión 8.0 de StatSoft Francia (2007) para el análisis de datos. Se ensayaron las significancias de las diferencias entre los grupos por análisis discriminante factorial (FDA). Así se pueden visualizar gráficamente las similitudes o las diferencias de las muestras.

La población total ensayada es 52 sujetos humanos de dos áreas geográficas medioambientales distintas. La población con cáncer oral se confirma por diagnóstico visual realizado por un centro anticáncer.

- 35 Se usan los siguientes compuestos orgánicos volátiles en el ensayo de diagnóstico:

3-Metil- 2-pentanona (número CAS: 565-61-7)

Metilbutanona (número CAS: 563-80-4)

2,4-Dimetil-3-pentanona (número CAS: 565-80-0)

Benceno (número CAS: 71-43-2)

- 40 Fenol (número CAS: 108-95-2)

2,3-Butanodiona (número CAS: 431-03-8)

5-Metil-3-hexen-2-ona (número CAS: 5166-53-0)

2-Metil-1-propeno (número CAS: 115-11-7)

Butanal (número CAS: 123-72-8)

- 45 Hexanal (número CAS: 66-25-1)

2-Propanol (número CAS: 67-63-0)

Acetato de etilo (número CAS: 141-78-6)

Hexanonitrilo (número CAS: 628-73-9)

1-Propanol (número CAS: 71-23-8)

(cis)-1,2-dimetilciclopropano (número CAS: 930-18-7)

5 m- y p-Xileno (número CAS: 108-38-3 y número CAS: 106-42-3)

(E) 2-Metil-2-butenal (número CAS: 497-03-0)

3-Metiltiofeno (número CAS: 616-44-4)

Etanal (número CAS: 75-07-0)

Se calcularon los valores de la mediana por grupo para las siguientes proporciones:

- 10 - 3-metil-2-pentanona / metilbutanona
 - 2,4-dimetil-3-pentanona / benceno
 - fenol / 2,3-butanodiona
 - 5-metil-3-hexen-2-ona / 2-metil-1-propeno
 - butanal / hexanal
- 15 - 2-propanol / acetato de etilo
 - hexanonitrilo / 1-propanol
 - 2-propanol / (cis)-1,2-dimetilciclopropano
 - m-xileno / 2-metil-2-butenal
 - 3-metil-2-pentanona / 3-metil-tiofeno
- 20 - 2,3-butanodiona / etanal

El método estadístico usado es el FDA (Análisis de discriminación factorial).

Se calcularon los valores de la mediana para cada una de las proporciones.

Se encontró que las 5 proporciones siguientes eran estadísticamente significativas del grupo de pacientes de cáncer oral o grupo de control:

- 25 1) 3-metil-2-pentanona / metilbutanona (R1)
 2) butanal / hexanal (R56)
 3) hexanonitrilo / 1-propanol (R260)
 4) 2-propanol / (cis)-1,2-dimetilciclopropano (R266)
 5) fenol / 2,3-butanodiona (R269).

30 Entre estas proporciones, se encontró que 2 se correlacionaban de forma reproducible con sujetos sanos, y 3 eran indicativas de pacientes que padecen cáncer oral (tabla 5).

Tabla 5: Valores de la mediana para 5 proporciones correlacionadas con el cáncer oral o con la salud.

	R1	R56	R260	R266	R269
	3-metil-2-pentanona / metilbutanona	butanal / hexanal	hexanonitrilo / 1-propanol	2-propanol / (cis)-1,2-dimetilciclopropano	fenol / 2,3-butanodiona
Media sanos	0,182	0,233	0,040	2,939	0,696
Media cáncer oral	0,357	0,138	0,089	9,359	0,217

Las 3 proporciones R1 (3-metil-2-pentanona / metilbutanona), R260 (hexanonitrilo / 1-propanol) y R266 (fenol / 2,3-

butanodiona) están del lado del grupo de cáncer oral y los valores son respectivamente 1,96; 2,24 y 3,18 veces más altos en este grupo que en el grupo sano.

Las 2 proporciones R56 (butanal / hexanal) y R269 (fenol / 2,3-butanodiona) están del lado del grupo sano y son respectivamente 1,62 y 3,21 veces más altas en este grupo que en el grupo de cáncer oral.

- 5 Los valores limitantes absolutos de las proporciones que permiten clasificar los pacientes en potencial “grupo de cáncer oral” se dan en la tabla 6:

Tabla 6: Valores absolutos de las proporciones limitantes que permiten clasificar los pacientes

Relación/proporción	Condiciones para que la muestra sea “riesgo de cáncer oral”	Nº de muestras que corresponden a la relación
3-Metil-2-pentanona / metilbutanona	> 0,344	17
Butanal / hexanal	< 0,11	10
Hexanonitrilo / 1-propanol	> 0,167	3
2-Propanol / (cis)-1,2-dimetilciclopropano	> 10,33	9
Fenol / 2,3-butanodiona	< 0,005	4

- 10 Para clasificar las muestras es necesario aplicar la siguiente fórmula (del procedimiento estadístico de FDA) que tiene en cuenta las 5 proporciones (combinación lineal de las 5 proporciones variables):

$$\text{Factor X} = 1,8277 - 7,3472 \cdot R1 - 0,125 \cdot R266 - 14,2293 \cdot R260 + 1,2050 \cdot R269 + 8,883 \cdot R56$$

Si el factor $X \leq 0,6$, la muestra se clasifica en la población con riesgo de cáncer oral

Si el factor $X > 0,6$, la muestra se clasifica en sana

Por lo tanto, el método de la invención, basándose en:

- 15 i) la recuperación de la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano,
 i) la cuantificación de 10 compuestos orgánicos bioquímicos (3-metil-2-pentanona, metilbutanona, butanal, hexanal, hexanonitrilo, 1-propanol, 2-propanol, (cis)-1,2-dimetilciclopropano, fenol y 2,3-butanodiona) en dicha fracción volátil,
 ii) cálculo de las proporciones R1, R266, R260, R269 y R56 como se ha mencionado antes,
 iii) cálculo de dicho factor X y su comparación con el umbral de 0,6,
- 20 permite que el experto en la técnica pronostique y/o diagnostique un cáncer oral en dicho sujeto humano.

El análisis de las proporciones entre los compuestos orgánicos: 3-metil-2-pentanona / metilbutanona, butanal / hexanal, hexanonitrilo / 1-propanol, 2-propanol / (cis)-1,2-dimetilciclopropano, y fenol / 2,3-butanodiona, en la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano, permite obtener un ensayo muy sensible de la predisposición al cáncer oral (sensibilidad de 98,077%; 1 falso positivo) (figura 1).

- 25 **Ejemplo 11: Combinación de los biomarcadores de la fracción de fluido y la fracción volátil para el diagnóstico/pronóstico del cáncer oral.**

Se usa el software STATISTICA versión 8.0 de StatSoft Francia (2007) para el análisis de datos. Las significancias de las diferencias entre los grupos se obtuvieron por análisis discriminante factorial (FDA). Así se pueden visualizar gráficamente las similitudes o las diferencias de las muestras.

- 30 La mejor combinación de biomarcadores era la siguiente: *Streptococcus mitis* + SSAT + H3F3A + hexanonitrilo + 2,3-pentanodiona, 3-metiltiofeno + acetona. El uso de dichos marcadores permite realmente obtener resultados de 100% de sensibilidad como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Sensibilidad del ensayo de diagnóstico basado en biomarcadores de la fracción de fluido y la fracción volátil

	bacteriano	ARNm humano	Compuestos volátiles modelo estadístico 1	ARNm bacteriano + humano	ARNm bacteriano + h + compuestos volátiles
% de especificidad	76	54	98	83	98
% de sensibilidad	79	32	100	89	100

- 35 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> INSTITUT CLINIDENT CHAUBRON, Franck

<120> Método de evaluación del riesgo de cáncer oral en seres humanos

5 <130> 354993D26501

<150> US61/086,019
<151> 04-08-2008

10 <160> 70

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador directo

<400> 1
gtgggataac ctgccgaaag 20

25 <210> 2
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador inverso

<400> 2
cccatccatt accgataaat ctta 25

35 <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador directo

45 <400> 3
ggcagactaa tacctgcata g 21

50 <210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso

55 <400> 4
atccattacc gataaacttt cttc 24

60 <210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso

65 <400> 5
catcccatc cattaccgat aaatc 25

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 10 <400> 6
 taccgcataa gagtagatgt t 21

 <210> 7
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo
 20
 <400> 7
 cgatagctaa taccgcataa g 21

 <210> 8
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso
 30
 <400> 8
 caggtccatc tgtagtgat g 21

 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo
 40
 <400> 9
 ggatagcccg gagaaatttg gat 23
 45
 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 10
 55 cgtcatcaaa gtacacgtac tccttat 27

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 11
 65 taccggatag gagcgtccac c 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 10 <400> 12
 taggccgcga gtccatcaa a 21

 <210> 13
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo
 20
 <400> 13
 ttgcagatca tcaagaacac gtaga 25

 <210> 14
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso
 30
 <400> 14
 cagtagagat cagttgtctc tggttgc 27

 35 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 15
 45 agaggccagt gccattcgt 19

 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 16
 55 gtttctctgc gtcgtggag t 21

 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 17
 65 cgtcttcccc tccatcgt 18

<210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 10 <400> 18
 agctcattgt agaagggtg gtg 23

 <210> 19
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo
 20
 <400> 19
 aagacctgta cgccaacaca g 21

 <210> 20
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso
 30
 <400> 20
 cgtcatactc ctgcttgctg 20

 35 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 21
 atactcctgc ttgctgatcc ac 22
 45
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 22
 55 ggatcagaaa ttctgaagaa t 21

 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 23
 65 accctcttca ctggacagat c 21

	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo	
10	<400> 24	
	ccagtgaaga gggttggaga c	21
	<210> 25	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
20	<400> 25	
	tggaggttgt catctacagc ag	22
	<210> 26	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador directo	
	<400> 26	
	ggcgctccgt gaaattagac	20
35	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador inverso	
	<400> 27	
45	cgctggaagg gaagttgc	19
	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> ADN	
50	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo	
	<400> 28	
55	aaagcaccca ggaagcaac	19
	<210> 29	
	<211> 22	
60	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
65	<400> 29	
	gcgaatcaga agttcagtg ac	22

	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo	
10	<400> 30	
	gaggggtgtg gagaagttt tg	22
	<210> 31	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
20	<400> 31	
	ctggcatctt cactgattct tg	22
	<210> 32	
25	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> sonda directa	
	<400> 32	
	gcatagtctt cgatgacggc atcagatttg	30
35	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> sonda directa	
	<400> 33	
45	gatgttccat gacatttct t	21
	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda directa	
	<400> 34	
55	attggatggc atcattgat a	21
	<210> 35	
	<211> 18	
60	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda directa	
65	<400> 35	
	catggtgggt gttggaaa	18

<210> 36
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa

 10 <400> 36
 aatcatgcat ggagatacac ctacattgca tga 33

 <210> 37
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa
 20
 <400> 37
 gctgcaaccg agcacgacag ga 22

 <210> 38
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa
 30
 <400> 38
 caggcaccag ggcgtgat 18

 35 <210> 39
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa

 <400> 39
 45 cgagcacggc atcgtc 16

 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sonda directa

 <400> 40
 55 gcagatgtgg atcagcaa 18

 <210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa

 <400> 41
 65 aggatgcaga aggagatcac tg 22

<210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa

 10 <400> 42
 taagccaggt tgcaatgagg t 21

 <210> 43
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa
 20
 <400> 43
 gcactctca ctctctgtt g 21

 <210> 44
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa
 30
 <400> 44
 tatcagaagt ccactgaact tctgat 26

 35 <210> 45
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> sonda directa

 <400> 45
 45 atcagaagtc cactgaactt ctgatygc 29

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sonda directa

 <400> 46
 55 ggcgctccgt gaaattagac 20

 <210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa

 65 <400> 47
 ttcatctct gtggatcc 19

<210> 48
 <211> 17
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda directa

 10 <400> 48
 ttcatctct gtggtat 17

 <210> 49
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa
 20
 <400> 49
 caaatctgat gccgtcatcg aagactatgc 30

 <210> 50
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa
 30
 <400> 50
 aagyaaatgt catggaacat c 21

 35 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa
 40
 <400> 51
 aagyaaatgt catggaacat c 21

 45 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sonda inversa

 <400> 52
 55 tatcaaatga tgccatccaa t 21

 <210> 53
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa

 <400> 53
 65 ttccaacac ccaccatg 18

<210> 54
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa

 10 <400> 54
 atcacgccct ggtgcctg 18

 <210> 55
 <211> 16
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa
 20
 <400> 55
 gacgatgccg tgctcg 16

 <210> 56
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa
 30
 <400> 56
 cagtgatctc ctctgcatc ct 22

 35 <210> 57
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> sonda inversa

 <400> 57
 acctcattgc aacctggctt a 21
 45
 <210> 58
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sonda inversa

 <400> 58
 55 atcagaagtt cagtggaact ctgata 26

 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda inversa

 65 <400> 59
 gtctaatttc acggagcgcc 20

<210> 60
<211> 17
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda inversa

10 <400> 60
ataccacaga gaatgaa 17

<210> 61
<211> 1761
15 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica miscelánea
20 <223> ARNm humano para beta-actina - NCBI X00351

<400> 61

ES 2 441 586 T3

ttgccgatcc gccgcccgtc cacaccogcc gccagctcac catggatgat gatatcgccg 60
 cgctcgtcgt cgacaacggc tccggcatgt gcaaggccgg ctccgcgggc gacgatgccc 120
 cccgggcccgt cttcccctcc atcgtggggc gccccaggca ccagggcgtg atggtgggca 180
 tgggtcagaa ggattcctat gtgggcgacg agggccagag caagagaggc atcctcacc 240
 tgaagtacc catcgagcac ggcacgtca ccaactggga cgacatggag aaaatctggc 300
 accacacctt ctacaatgag ctgcgtgtgg ctcccgagga gcaccccgtg ctgctgaccg 360
 agggccccct gaacccaag gccaacggc agaagatgac ccagatcatg tttgagacct 420
 tcaacacccc agccatgtac gttgctatcc aggctgtgct atccctgtac gcctctggcc 480
 gtaccactgg catcgtgatg gactccgggtg acggggtcac ccacactgtg cccatctacg 540
 aggggtatgc cctcccccat gccatcctgc gtctggacct ggetggccgg gacctgactg 600
 actacctcat gaagatcctc accgagcggc gctacagctt caccaccacg gccgagcggg 660
 aaatcgtgcg tgacattaag gagaagctgt gctacgtcgc cctggacttc gagcaagaga 720
 tggccacggc tgcttcacg tcctccctgg agaagagcta cgagctgcct gacggccagg 780
 tcatcaccat tggcaatgag cggttccgct gccctgaggc actcttccag ccttccctcc 840
 tgggcatgga gtctgtggc atccacgaaa ctaccttcaa ctccatcatg aagtgtgacg 900
 tggacatccg caaagacctg tacgccaaca cagtgtgtc tggcggcacc accatgtacc 960
 ctggcattgc cgacaggatg cagaaggaga tcaactgcct ggcaccacg acaatgaaga 1020
 tcaagatcat tgetcctcct gagcgcaagt actccgtgtg gatcggcggc tccatcctgg 1080
 cctcgtgtc caccttccag cagatgtgga tcagcaagca ggagtatgac gagtccggcc 1140
 cctccatcgt ccaccgaaa tgcttctagg cggactatga cttagttgcy ttacaccctt 1200
 tcttgacaaa acctaactg cgcagaaaac aagatgagat tggcatggct ttatgtgtt 1260
 tttttgtttt gttttggtt ttttttttt tttggcttga ctcaggattt aaaaactgga 1320
 acggtgaagg tgacagcagt cggttggagc gagcatcccc caaagttcac aatgtggccg 1380
 aggactttga ttgcacattg ttgtttttt aatagtcatt ccaaatatga gatgcattgt 1440
 tacaggaagt cccttgccat cctaaaagcc acccacttc tctctaagga gaatggccca 1500
 gtctctccc aagtccacac aggggaggtg atagcattgc ttctgtgtaa attatgtaat 1560
 gcaaaatttt ttaatacttc gccttaatac ttttttattt tgttttattt tgaatgatga 1620
 gccttcgtgc cccccctcc cctttttgt cccccaactt gagatgtatg aaggcttttg 1680
 gtctccctgg gagggggtgg aggcagccag ggcttacctg tacactgact tgagaccagt 1740
 tgaataaaag tgcacacctt a 1761

- 5 <210> 62
- <211> 1060
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

ES 2 441 586 T3

<220>

<221> característica miscelánea

<223> espermidina/espermina N1-acetiltransferasa 1 (SAT1) Homo sapiens, ARNm NCBI NM_002970

5

<400> 62

```

cgcgggccga ctggtgttta tccgtcactc gccgaggttc cttgggtcat ggtgccagcc      60
tgactgagaa gaggacgctc ccgggagacg aatgaggaac cacctcctcc tactgttcaa     120
gtacaggggc ctggtccgca aaggaagaa aagcaaaaga cgaaaatggc taaattcgtg      180
atccgccag ccaactgccgc cgactgcagt gacatactgc ggctgatcaa ggagctggct     240
aaatatgaat acatggaaga acaagtaatc ttaactgaaa aagatctgct agaagatggt     300
tttgagagc acccctttta ccaactgcctg gttgcagaag tgccgaaaga gcaactggact     360
ccggaaggac acagcattgt tggttttgcc atgtactatt ttacctatga cccgtggatt     420
ggcaagttat tgtatcttga ggacttcttc gtgatgagt attatagagg ctttggcata     480
ggatcagaaa ttctgaagaa tctaagccag gttgcaatga ggtgtcgctg cagcagcatg     540
cacttcttgg tagcagaatg gaatgaacca tccatcaact tctataaaag aagaggtgct     600
tctgatctgt ccagtgaaga gggttggaga ctgttcaaga tcgacaagga gtacttgcta     660
aaaatggcaa cagaggagtg aggagtgctg ctgtagatga caacctccat tctattttag     720
aataaattcc caacttctct tgctttctat gctgtttcta gtgaaataat agaatgagca     780
cccattcaa agctttatta ccagtggcgt tgttgcattg ttgaaatgag gtctgtttaa     840
agtggcaatc tcagatgcag tttggagagt cagatcttcc tccttgaata tctttcgata     900
aacaacaagg tgggtgtgac ttaatatatt tgaaaaaac ttcattctcg tgagtcattt     960
aatgtgtac aatgtacaca ctggtactta gagtttctgt ttgattcttt ttaataaac    1020
tactctttga tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                    1060

```

10

<210> 63

<211> 1117

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> característica miscelánea

<223> H3 histona Homo sapiens, familia 3A (H3F3A), ARNm NCBI NM_002107

20

<400> 63

ES 2 441 586 T3

```

caattgtgtt cgcagccgcc gccgcgccgc cgctcgctctc caacgcccage gccgcctctc      60
gctcgcggag ctccagccga aggagaaggg gggtaagtaa ggaggtctct gtaccatggc      120
tcgtacaaag cagactgccc gcaaatcgac cggtggttaa gcacccagga agcaactggc      180
tacaaaagcc gctcgcgaaga gtgcgcctct tactggaggg gtgaagaaac ctcatcgtta      240
caggcctggt actgtggcgc tccgtgaaat tagacgttat cagaagtcca ctgaacttct      300
gattcgcaaa cttcccttcc agcgtctggt gcgagaaatt gtcaggact ttaaacaga      360
tctgcgcttc cagagcgcag ctatcgggctc tttgcaggag gcaagtgagg cctatctggt      420
tggccttttt gaagacacca acctgtgtgc tatccatgcc aaacgtgtaa caattatgcc      480
aaaagacatc cagctagcac gccgcatacg tggagaacgt gcttaagaat ccactatgat      540
gggaaacatt tcattctcaa aaaaaaaaaa aaaaatttct cttcttctctg ttattggtag      600
ttctgaacgt tagatatttt tttccatgg ggtcaaaagg tacctaagta tatgattgcg      660
agtggaaaaa taggggacag aatcaggta ttggcagttt ttccatttctc atttgtgtgt      720
gaatttttaa tataaatgcg gagacgtaaa gcattaatgc aagttaaaat gtttcagtga      780
acaagtttca gcggttcaac tttataataa ttataaataa acctgttaa ttttctgga      840
caatgccagc atttggattt ttttaaaca agtaaatttc ttattgatgg caactaaatg      900
gtgtttgtag catttttctc atacagtaga ttccatccat tcactatact tttctaactg      960
agttgtccta catgcaagta catgttttta atgttgtctg tcttctgtgc tgttcctgta     1020
agtttgctat taaaatacat taaactataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1080
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa                                     1117

```

<210> 64
 <211> 1665
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <223> interleuquina 8 (IL8) Homo sapiens, ARNm NM_000584

<400> 64

ES 2 441 586 T3

ctccataagg cacaaacttt cagagacagc agagcacaca agcttctagg acaagagcca 60
 ggaagaaacc accggaagga accatctcac tgtgtgtaaa catgacttcc aagctggccg 120
 tggctctctt ggcagccttc ctgatttctg cagctctgtg tgaaggtgca gttttgccaa 180
 ggagtgctaa agaacttaga tgtcagtgca taaagacata ctccaaacct ttccacccca 240
 aatttatcaa agaactgaga gtgattgaga gtggaccaca ctgcgccaac acagaaatta 300
 ttgtaaagct ttctgatgga agagagctct gtctggaccc caaggaaaac tgggtgcaga 360
 gggttgtgga gaagtttttg aagagggctg agaattcata aaaaaattca ttctctgtgg 420
 tatccaagaa tcagtgaaga tgccagtgaa acttcaagca aatctacttc aacacttcat 480
 gtattgtgtg ggtctgttgt agggttgcca gatgcaatac aagattcctg gttaaatttg 540
 aatttcagta aacaatgaat agtttttcat tgtaccatga aatatccaga acatacttat 600
 atgtaaagta ttatttattt gaatctacaa aaaacaacaa ataattttta aatataagga 660
 ttttctaga tattgcacgg gagaatatac aatagcaaa attgaggcca agggccaaga 720
 gaatatccga actttaattt caggaattga atggggttgc tagaatgtga tatttgaagc 780
 atcacataaa aatgatggga caataaattt tgccataaag tcaaatttag ctggaaatcc 840
 tggatttttt tctgttaaatt ctggcaaccc tagtctgcta gccaggatcc acaagtcctt 900
 gttccactgt gccttggttt ctcttttatt tctaagtgga aaaagtatta gccaccatct 960
 tacctcacag tgatgttgtg aggacatgtg gaagcacttt aagttttttc atcataacat 1020
 aaattatttt caagtgtaac ttattaacct atttattatt tatgtattta ttaagcatc 1080
 aaatatttgt gcaagaattt ggaaaaatag aagatgaatc attgattgaa tagttataaa 1140
 gatgttatag taaatttatt ttattttaga tattaatga tgttttatta gataaatttc 1200
 aatcagggtt tttagattaa acaaacaaac aattgggtac ccagttaaatt tttcatttca 1260
 gataaacaac aaataatttt ttagtataag tacattattg tttatctgaa attttaattg 1320
 aactaacaat cctagtttga tactcccagt cttgtcattg ccagctgtgt tggtagtgct 1380
 gtgttgaatt acggaataat gagttagaac tattaacaaca gccaaaactc cacagtcaat 1440
 attagtaatt tcttgctggt tgaaacttgt ttattatgta caaatagatt cttataatat 1500
 tatttaaatg actgcatttt taaatacaag gctttatatt tttacttta agatgttttt 1560
 atgtgctctc caaatttttt ttactgtttc tgattgtatg gaaatataaa agtaaatatg 1620
 aaacatttaa aatataattt gttgtcaaag taaaaaaaa aaaaa 1665

<210> 65
 <211> 366
 5 <212> ADN
 <213> Prevotella melaninogenica

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <223> gen ARNr 16S parcial de Prevotella melaninogenica NCBI AJ555137

<400> 65

ES 2 441 586 T3

ggctcaggat gattttctag ctacaggctt aacacatgca agtcgagggg aaacggcatt 60
 gagtgcttgc actctttgga cgtcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt atccaacctt 120
 occattactg tgggataacc tgccgaaagg cagactaata cctgcatagt cttcgatgac 180
 ggcatcagat ttgaagtaaa gatttatcgg taatggatgg ggatgcgtct gattagcttg 240
 ttggcggggg aacggcccac caaggctacg atcagtaggg gttctgagag gaaggtcccc 300
 cacattggaa ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcaatcga attcccgtt 360
 gccaca 366

<210> 66

<211> 1454

5 <212> ADN

<213> Streptococcus mitis

<220>

<221> característica miscelánea

10 <223> gen de ARNr 16S parcial de Streptococcus mitis, cepa B6 NCBI AJ617805

<400> 66

cgctggcggc gtgcctaata catgcaagta gaacgctgaa ggaggagctt gcttctctgg 60
 atgagttgcg aacgggtgag taacgcgtag gtaacctgcc tggtagcggg ggataactat 120
 tggaaacgat agctaatacc gcataagagt agatgttgca tgacatttgc ttaaaagggtg 180
 caattgcatc actaccagat ggacctgcgt tgtattagct agttggtggg gtaacggctc 240
 accaaggcga cgatacatag ccgacctgag agggatgatcg gccacactgg gactgagaca 300
 cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc ggcaatggac ggaagtctga 360
 ccgagcaacg ccgcgtgagt gaagaagggtt ttcggatcgt aaagctctgt tgtaagagaa 420
 gaacgagtgt gagagtggaa agttcacact gtgacgggat cttaccagaa agggacggct 480
 aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtcccagag cgttgtccgg atttattggg 540
 cgtaaagcga gcgcaggcgg ttagataagt ctgaagtaa aggctgtggc ttaaccatag 600
 tacgctttgg aaactgttta acttgagtgc aagaggggag agtggaatc catgtgtagc 660
 ggtgaaatgc gtagatatat ggaggaacac cgggtggcgaa agcggctctc tggcttgtaa 720

ES 2 441 586 T3

ctgacgctga ggctcgaaag cgtgggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 780
 ccgtaaacga tgagtgctag gtgttagacc ctttccgggg tttagtgccg cagctaacgc 840
 attaagcact ccgcctgggg agtacgaccg caagggtgaa actcaaagga attgacgggg 900
 gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg 960
 tcttgacatc cctctgaccg ctctagagat agagttttcc ttcgggacag aggtgacagg 1020
 tgggtgcatg ttgtcgtcag ctcgtgctgt gagatggtgg gttaagtccc gcaacgagcg 1080
 caaccctat tgtagttgc catcatttag ttgggcactc tagcgagact gccggtaata 1140
 aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca 1200
 cgtgctacaa tggctggtac aacgagtcgc aagccggtga cggcaagcta atctcttaaa 1260
 gccagtctca gttcggattg taggctgcaa ctcgcctaca tgaagtcgga atcgcctagta 1320
 atcgcggatc agcacgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1380
 accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg tgaggtaacc gtaaggagcc agccgcctaa 1440
 ggtttgatag atga 1454

<210> 67
 <211> 1480
 5 <212> ADN
 <213> Capnocytophaga gingivalis

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <223> gen de ARN ribosomal 16S de Capnocytophaga gingivalis NCBI AF543295

<400> 67
 agagtttgat cctggctcag atgaacgcta gcggcaggcc taacacatgc aagtcgaggg 60
 agaagccctt tcgggggagc aaaccggcgc acgggtgcgt aacgcgtatg caacctacct 120
 ttcacagggg gatagcccga agaaatttgg attaataccc cataatatta ttggatggca 180
 tcatttgata attaaaactg cgggtggtgaa agatgggcat gcgtcctatt agctagttgg 240
 agtggtaacg gcaccccag gctacgatag gtaggggtcc tgagagggag atccccaca 300
 ctggtactga gacagggacc agaccctac gggaggcagc agtgaggaat attggtcaat 360
 ggtcgggaaga ctgaaccagc catgccgcgt gcaggaagaa tgccttatgg gttgtaaact 420
 gcttttatat gggagaata aggtgtacgt gtacattgat gacggtagca tatgaataag 480
 catcggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg taatacggag gatgcgagcg ttattcggaa 540
 tcattggggt taaaggtct gtaggcgggc tattaagtca ggggtgaaag gtttcagctt 600
 aactgagaaa ttgcctttga tactggtagt cttgaatata tgtgaagtcc ttggaatgtg 660
 tagttagcgc gtgaaatgct tagatattac acagaacacc gattgcgaag gcaggggact 720

ES 2 441 586 T3

aacagacaat tgacgctgag agacgaaagc gtggggagcg aacaggaatt agatcccctg 780
 gtagtccacg cctgtaaacg atggatacta gctggtgggc gcaggctgag ttggcttaag 840
 cgaaagtgat aagtatccaa ccttggggaa gtacgcacgc aagtgtgaaa ctcaaaggaa 900
 ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa ttcgatgata cgcgaggaac 960
 cttaccaagg tttaaatgga gactgacagg tgtagagata cgcccttctt cggacagttt 1020
 tcaaggtgct gcatggttgt cgtcagctcg tgccgtgagg tgtcaggta agtcctataa 1080
 cgagcgcac ccctattggt agttaccagc aagtaaagtt ggggactcta gcaagactgc 1140
 cgggtgtaaac cgtgaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcacggccct tacatcttgg 1200
 gctacacacg tgctacaatg gtcgttacag agagcagcca ctgcgcgagc aggagcgaat 1260
 ctataaagac ggtcacagtt cggatcggag tctgcaactc gactccgtga agctggaatc 1320
 gctagtaatc ggatatacagc catgatccgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
 cccgtcaagc catggaagct gggagtacct gaagtcggtc accgcaagga gctgcctagg 1440
 gtaaaaccag tgactggggc taagtcgtaa caaggtaacc 1480

<210> 68
 <211> 838
 5 <212> ADN
 <213> *Micrococcus luteus*

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <223> gen de ARNr 16S parcial de *Micrococcus luteus*, aislado A24 NCBI AM285006

<400> 68
 aggatgaacg ctggcggcgt gcttacacat gcaagtcgaa cgatgaagcc cagcttgctg 60
 ggtggattag tggcgaacgg gtgagtaaca cgtgagtaac ctgcccttaa ctctgggata 120
 agcctgggaa actgggtcta ataccggata ggagcgtcca ccgcatggtg ggtgttgaa 180
 agatttatcg gttttggatg gactcgcggc ctatcagctt gttggtgagg taatggctca 240
 ccaaggcgac gacgggtagc cggcctgaga gggtgaccgg ccacactggg actgagacac 300
 ggcccagact cctacgggag gcagcagtg ggaatattgc gcaatgggcg caagcctgat 360
 gcagcgcacgc cgcgtgaggg atgacggcct tcggggtgta aacctcttc agtagggaag 420
 aagcgaaagt gacggtacct gcagaagaag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg 480
 taatacgtag ggtgcgagcg ttatccggaa ttattgggcy taaagagctc gtaggcggtt 540
 tgtcgcgtct gtcgtgaaag tccggggctt aaccccgat ctgcgggtggg tacgggcaga 600
 ctagagtgca gtaggggaga ctggaattcc tgggtgtagc gtggaatgcg cagatatcag 660
 gaggaacacc gatggcgaag gcaggtctct gggctgtaac tgacgctgag gagcgaagc 720
 atggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccatgc cgtaaagctt gggcactagg 780
 15 tgtggggacc attccacggt tttccgcgcc gcagctaacg cattaagtgc cccgcctt 838

<210> 69

ES 2 441 586 T3

<211> 297
 <212> ADN
 <213> papilomavirus humano tipo 16

5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> gen de la proteína E7 (E7) de papilomavirus humano tipo 16 cepa P209, cds completa NCBI EF422141

<400> 69
 atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgcaacc agagacaact 60
 gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120
 ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180
 tgtgactcta cgcttcgggt gtgCGTACAA agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240
 10 gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccàtct gttctcagaa accataa 297

<210> 70
 <211> 477
 <212> ADN
 15 <213> papilomavirus humano tipo 18

<220>
 <221> característica miscelánea
 <223> gen de la proteína E6 (E6) de papilomavirus humano tipo 18 cepa, cds completa NCBI EF422111

20 <400> 70
 atggcgcgct ttgaggatcc aacacggcga ccctacaagc tacctgatct gtgcacggaa 60
 ctgaacactt cactgcaaga catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa 120
 cttacagagg tatttgaatt tgcattcaaa gatttatttg tagtgtatag agacagtata 180
 ccgcatgctg catgccataa atgtatagat ttttattcta gaattagaga attaagacat 240
 tattcagact ctgtgtatgg agacacatta gaaaaactaa ctaacactgg gttatacaat 300
 ttattaataa ggtgcctgcg gtgccagaaa ccggtgaatc cagcagaaaa acttagacac 360
 cttaatgaaa aacgacgatt ccacaaaata gctgggact atagaggcca gtgccattcg 420
 tgctgcaacc gagcacgaca ggagagactc caacgacgca gagaaacaca agtataa 477

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método in vitro de diagnóstico de la predisposición al cáncer oral en un sujeto humano o de diagnóstico del cáncer oral en un sujeto humano, comprendiendo el método recoger y estabilizar una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano, y llevar a cabo al menos la siguiente etapa:
- 5 * analizar la fracción volátil que corresponde a la parte evaporable extraída de dicha muestra de saliva estabilizada, detectando en dicha fracción volátil al menos un compuesto orgánico bioquímico;
- en donde la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico es indicativa de un riesgo de predisposición a desarrollar cáncer oral.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en donde dicha fracción volátil se extrae de la muestra de saliva bruta calentando dicha muestra de saliva durante al menos 10 min a una temperatura comprendida entre 30°C y 50°C.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en donde dicho al menos un compuesto orgánico bioquímico se selecciona del grupo que consiste en: 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), fenol (número CAS 108-95-2), butanal (número CAS 123-72-8), metilbutanona (número CAS: 563-80-4), 2-metil-2-butenol (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (cis)-1,2-dimetilciclopropano (número CAS: 930-18-7); y preferiblemente la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico elegido de 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltiofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0) en la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral.
4. El método según la reivindicación 3, en donde la detección de los compuestos orgánicos bioquímicos del grupo que comprende: hexanonitrilo, 2,3-pentanodiona, 3-metiltiofeno y acetona en la fracción volátil de la saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano está desarrollando un cáncer oral.
5. El método según la reivindicación 3, en donde la detección de al menos un compuesto orgánico bioquímico elegido del grupo que comprende: 2-metil-2-butenol (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (cis)-1,2-dimetilciclopropano (número CAS 930-18-7) en la fracción volátil de saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano no está desarrollando un cáncer oral.
6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende la etapa de:
- 35 * analizar una fracción de fluido de dicha muestra de saliva estabilizada, detectando secuencias de ADN o ARN específicas de origen humano, bacteriano o vírico en dicha fracción de fluido.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dichas secuencias de ADN o ARN específicas se eligen de:
- i) secuencias humanas seleccionadas de ARNm de SSAT (SEQ ID N° 62), ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63) y ARNm de IL8 (SEQ ID N° 64); y/o
- 40 ii) secuencias de bacterias seleccionadas de *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914) y *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D); y/o
- iii) secuencias de virus seleccionadas del papilomavirus humano, preferiblemente dicho papilomavirus humano es el papilomavirus humano 16 (ATCC 45113) o el papilomavirus humano 18 (ATCC 45152);
- y preferiblemente en donde la detección de al menos dos secuencias de ARNm como se han definido específicamente en i), y al menos una secuencia bacteriana como se ha definido específicamente en ii) en la saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la detección del ARNm humano de H3F3A (SEQ ID N° 63), del ARNm humano de SSAT (SEQ ID N° 62) y del genoma bacteriano de *Streptococcus mitis* (ATCC 15914) en la saliva de un sujeto humano indica que dicho sujeto tiene un riesgo alto de desarrollar un cáncer oral.
- 50 9. El método según la reivindicación 7, en donde:
- i) la saliva bruta se estabiliza usando una disolución que comprende una sal tal como tiocianato de guanidinio, y/o sulfato amónico y/o azida sódica, y opcionalmente inhibidores de exo y/o endonucleasa; y/o

ii) se detectan secuencias de ADN o ARN específicas incubando dicho ADN genómico y ARN total con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, preferiblemente la combinación de RT-PCR y PCR se lleva a cabo en una reacción en un solo tubo.

5 10. El método según la reivindicación 7, en donde la detección de la secuencia de ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63), de ARNm de SSAT (SEQ ID N° 62), y la detección de los compuestos orgánicos bioquímicos hexanonitrilo, 2,3-pentanodiona, 3-metiltofeno y acetona en la saliva de un sujeto humano, indica que dicho sujeto humano está desarrollando un cáncer oral.

11. El método según la reivindicación 1, en donde:

10 i) la fracción volátil de la saliva se extrae de la muestra de saliva bruta calentando dicha muestra de saliva durante al menos 10 min a 40°C, usando una microextracción en fase sólida (SPME) con una fibra de CAR/PDMS; y/o

ii) los compuestos orgánicos bioquímicos en dicha fracción volátil se detectan usando una cromatografía en fase gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas.

12. El método según la reivindicación 7, que comprende amplificar y detectar al menos una secuencia de ADN o ARN elegida del grupo que comprende: SEQ ID N° 62 a 70.

15 13. El método según la reivindicación 7, que comprende las etapas de:

a) recoger una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano en un dispositivo estéril,

b) estabilizar dicha muestra añadiendo una disolución que comprende una sal de guanidinio, tal como tiocianato de guanidinio y/o sulfato amónico y/o azida sódica, y opcionalmente inhibidores de exo y/o endonucleasas,

20 c) extraer el ácido nucleico total de origen bacteriano, vírico y humano de la muestra de saliva estabilizada previamente obtenida,

d) precipitar y purificar los ácidos nucleicos totales,

25 e) incubar el ácido nucleico total purificado con una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, y cebadores polinucleótidos en condiciones que permitan a la actividad de transcriptasa inversa de dicha enzima termoestable sintetizar ADNc a partir del ácido ribonucleico y amplificación del ADN genómico y ADNc a un nivel detectable por la reacción en cadena de la polimerasa,

f) detectar en un ensayo las secuencias de ADN amplificadas por hibridación con una o más sondas de polinucleótidos específicas para:

30 i) secuencias humanas seleccionadas de ARNm de SSAT (SEQ ID N° 62), ARNm de H3F3A (SEQ ID N° 63) y ARNm de IL8 (SEQ ID N° 64); o

ii) secuencias de bacterias seleccionadas de *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624, SEQ ID N° 65), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845, SEQ ID N° 66), *Streptococcus mitis* (ATCC 15914, SEQ ID N° 67) y *Micrococcus luteus* (ATCC 53598D, SEQ ID N° 68), o

35 iii) secuencias de virus seleccionadas de papilomavirus humano 16 (ATCC 45113, SEQ ID N° 69) y el papilomavirus humano 18 (ATCC 45152, SEQ ID N° 70);

y en donde dichos cebadores y dichas sondas usadas para amplificar y detectar al menos una secuencia de i), ii) o iii), se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 60.

14. El método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

a) recoger una muestra de saliva bruta de dicho sujeto humano en un dispositivo estéril,

40 b) estabilizar dicha muestra por adición de una disolución que comprende una sal de guanidinio, tal como tiocianato de guanidinio, sulfato amónico y/o azida sódica,

c) extraer la fracción volátil de dicha muestra estabilizada calentándola durante al menos 10 min a 40°C y usando, por ejemplo, la microextracción en fase sólida (SPME) para separar la fracción volátil,

45 d) detectar al menos un compuesto orgánico bioquímico usando, por ejemplo, un cromatógrafo en fase gaseosa acoplado a un espectrómetro de masas, en donde dicho al menos un compuesto orgánico bioquímico se selecciona preferiblemente de: 2,3-pentanodiona (número CAS 600-14-6), 3-metiltofeno (número CAS 616-44-4), acetona (número CAS 67-64-1), hexanonitrilo (número CAS 628-73-9), benzaldehído (número CAS 100-52-7), 3-metil-2-pentanona (número CAS 565-61-7), 2,3-butanodiona (número CAS 431-03-8), 2-propanol (número CAS 67-63-0), acetato de etilo (número CAS 141-78-6), 1-propanol (número CAS 71-23-8), hexanal (número CAS 66-25-1), 5-metil-

3-hexen-2-ona (número CAS 5166-53-0), m-xileno (número CAS 108-38-3), p-xileno (número CAS 106-42-3), 2-metil-2-butenal (E) (número CAS 497-03-0), fenol (número CAS 108-95-2), butanal (número CAS 123-72-8), metilbutanona (número CAS: 563-80-4), 2-metil-2-butenol (número CAS 513-35-9), 2-metil-1-propeno (número CAS 115-11-7) y (cis)-1,2 dimetilciclopropano (número CAS: 930-18-7).

- 5 15. Uso para poner en práctica el método según la reivindicación 14, de un kit que comprende:
- a) Un dispositivo estéril para recoger una muestra de saliva, que opcionalmente contiene un reactivo de recolección
 - b) Un reactivo conservante,
 - c) Al menos un sensor electrónico,
- 10 d) Opcionalmente, un marcador molecular de control.

Figura 1

FDA 5 proporciones - 98,077% (número de falsos positivos: 1)
 Tamaño de la población ensayada: 52

