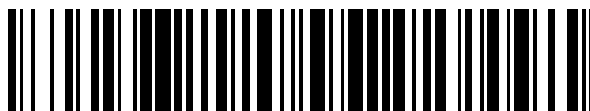


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 845**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2004** **E 04809450 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 1641810**

54 Título: **Predicción de la probabilidad de recidiva de cáncer**

30 Prioridad:

24.06.2003 US 482339 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2014

73 Titular/es:

GENOMIC HEALTH, INC. (50.0%)
301 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US y
NSABP FOUNDATION, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

BAKER, JOFFRE;
BRYANT, JOHN L.;
PAIK, SOONMYUNG y
SHAK, STEVEN

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 488 845 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

Predicción de la probabilidad de recidiva de cáncer

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente descripción proporciona conjuntos de genes cuya expresión es importante en el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los oncólogos disponen de varias opciones de tratamiento, incluyendo diferentes combinaciones de fármacos quimioterápicos que se caracterizan como "tratamiento de referencia", y varios fármacos que no tienen una declaración en la etiqueta para un cáncer particular, pero para los que hay pruebas de eficacia en ese cáncer. La mejor probabilidad de un buen desenlace del tratamiento requiere que se asignen los pacientes al tratamiento contra el cáncer disponible óptimo, y que esta asignación se realice lo más rápidamente posible tras el diagnóstico.

20 Actualmente, las pruebas de diagnóstico usadas en la práctica clínica son de un único analito, y por tanto no capturan el posible valor de conocer relaciones entre docenas de marcadores diferentes. Además, con frecuencia las pruebas de diagnóstico no son cuantitativas, basándose en la inmunohistoquímica. Con frecuencia este método proporciona resultados diferentes en diferentes laboratorios, en parte porque los reactivos no están normalizados y en parte porque las interpretaciones son subjetivas y no pueden cuantificarse fácilmente. No se han usado pruebas
25 basadas en ARN de manera frecuente debido al problema de la degradación del ARN a lo largo del tiempo y al hecho de que es difícil obtener muestras de tejido recientes de pacientes para su análisis. El tejido incrustado en parafina, fijado, está más fácilmente disponible y se han establecido métodos para detectar ARN en tejido fijado. Sin embargo, estos métodos normalmente no permiten el estudio de grandes números de genes (ADN o ARN) a partir de pequeñas cantidades de material. Por tanto, tradicionalmente el tejido fijado se ha usado con poca frecuencia
30 salvo para la detección mediante inmunohistoquímica de proteínas.

En los últimos años, varios grupos han publicado estudios relacionados con la clasificación de diversos tipos de cáncer mediante análisis de expresión génica en micromatriz (véase, por ejemplo Golub *et al.*, Science 286:531-537 (1999); Bhattacharjee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiang *et al.*, Bioinformatics
35 17 (sup. 1): S316-S322 (2001); Ramaswamy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:15149-15154 (2001)). También se han notificado determinadas clasificaciones de cánceres de mama humanos basándose en patrones de expresión génica (Martin *et al.*, Cancer Res. 60:2232-2238 (2000); West *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11462-11467 (2001); Sorlie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:10869-10874 (2001); Yan *et al.*, Cancer Res. 61:8375-8380 (2001)). Sin embargo, estos estudios se centran principalmente en mejorar y refinar la clasificación ya establecida de
40 diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, y generalmente no proporcionan nuevos conocimientos sobre la relación de los genes expresados de manera diferencial, y no vinculan los hallazgos con estrategias de tratamiento con el fin de mejorar el desenlace clínico de la terapia contra el cáncer.

Ahmad *et al.*, Am. J. Pathol. 152:721-728 (1998) dan a conocer estromelina 3 como un factor de pronóstico independiente para la supervivencia libre de recidiva en cáncer de mama de ganglios positivos.

Engel *et al.*, Int. J. Cancer 58:830-835 (1994) dan a conocer una correlación entre el nivel de ARNm de estromelina 3 y el desenlace en el cáncer de mama humano.

50 Chenard *et al.* Int. J. Cancer 69:448-451 (1996) dan a conocer niveles altos de estromelina 3 que se correlacionan con un mal pronóstico en pacientes con carcinoma de mama.

Nakopoulou *et al.* Modern Pathology 2002; 15 (11):1154-1161 dan a conocer que la expresión de la proteína estromelina 3 está asociada con una supervivencia global adversa en cáncer de mama invasivo.

55 Aunque la biología molecular y la bioquímica modernas han revelado cientos de genes cuyas actividades influyen sobre el comportamiento de células tumorales, el estado de su diferenciación y su sensibilidad o resistencia a determinados fármacos terapéuticos, con pocas excepciones, no se ha aprovechado el estado de estos genes para el fin de tomar decisiones clínicas de manera rutinaria sobre tratamientos farmacológicos. Una excepción notable es
60 el uso de la expresión de la proteína receptora de estrógenos (ER) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para un tratamiento con fármacos antiestrógenos, tales como tamoxifeno. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes con el fármaco antagonista de Her2, Herceptin® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).

65 A pesar de los recientes avances, el desafío del tratamiento contra el cáncer sigue siendo dirigir regímenes de tratamiento específicos a tipos de tumores patogénicamente diferenciados, y en última instancia personalizar el

tratamiento contra el tumor con el fin de maximizar el desenlace. Por tanto, existe la necesidad de pruebas que proporcionen simultáneamente información predictiva sobre las respuestas del paciente a la variedad de opciones de tratamiento. Esto es particularmente cierto para el cáncer de mama, cuya biología no se entiende mucho. Queda claro que la clasificación del cáncer de mama en unos pocos subgrupos, tales como subgrupo ErbB2⁺, y subgrupos caracterizados por una expresión génica de baja a ausente del receptor de estrógenos (ER) y unos pocos factores transcripcionales adicionales (Perou *et al.*, Nature 406:747-752 (2000)) no refleja la heterogenicidad celular y molecular del cáncer de mama, y no permite el diseño de estrategias de tratamiento que maximicen la respuesta del paciente.

En particular, una vez que a un paciente se le diagnostica cáncer, tal como cáncer de mama o de ovarios, existe una gran necesidad de métodos que le permitan al médico predecir la evolución esperada de la enfermedad, incluyendo la probabilidad de recidiva de cáncer, la supervivencia a largo plazo del paciente, y similares, y seleccionar en consecuencia la opción de tratamiento más apropiada.

Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de predicción de la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad de un paciente con cáncer de mama ductal invasivo, positivo para ER, de ganglios negativos, sin la recidiva de cáncer, tal como se especifica en la reivindicación 1.

En una realización, el ARN comprende ARN intrónico.

En una realización de este método, el ARN se aísla de una muestra de tejido de cáncer de mama incrustada en cera, fijada, del paciente.

En otra realización, el ARN se aísla de tejido de biopsia con aguja gruesa o células de aspirado con aguja fina.

En otra realización, el tejido de mama se obtiene de una muestra de biopsia incrustada en parafina, fijada, en la que el ARN puede estar fragmentado.

Un informe puede incluir predicción de la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad del paciente y/o una recomendación de una modalidad de tratamiento de dicho paciente.

Descripción detallada de la realización preferida

A. DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4^a ed, John Wiley & Sons (Nueva York, NY 1992), proporciona a un experto en la técnica una guía general a muchos de los términos usados en la presente solicitud.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que pueden usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos. Para fines de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

El término "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferiblemente sondas polinucleotídicas, sobre un sustrato.

El término "polinucleótido", cuando se usa en singular o en plural, se refiere de manera general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificados. Por tanto, por ejemplo, los polinucleótidos tal como se definen en el presente documento incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que incluye regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que incluye regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más normalmente, bicatenarios o incluyen regiones mono y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido" tal como se usa en el presente documento se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más normalmente implican sólo una región de algunas de las moléculas. Con frecuencia, una de las moléculas de una región de triple hélice es un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente ADNc. El término incluye ADN (incluyendo ADNc) y ARN que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, los ADN o ARN con estructuras principales modificadas por estabilidad o por otros motivos son "polinucleótidos" tal como se pretende ese término en el presente documento. Además, dentro del término "polinucleótidos" tal como se define en el presente documento se

incluyen ADN o ARN que comprenden bases no habituales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiadas. En general, el término “polinucleótido” abarca todas las formas química, enzimática y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos no modificados; así como las formas químicas de ADN y ARN característicos de virus y células, incluyendo células simples y complejas.

5 El término “oligonucleótido” se refiere a un polinucleótido relativamente corto, incluyendo, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono o bicatenarios, híbridos ARN:ADN y ADN bicatenarios. Con frecuencia los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de sondas de ADN monocatenarios, se sintetizan mediante métodos químicos, por ejemplo usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados que están
10 disponibles comercialmente. Sin embargo, pueden prepararse oligonucleótidos mediante una variedad de otros métodos, incluyendo técnicas mediadas por ADN recombinante *in vitro* y mediante la expresión de ADN en células y organismos.

15 Los términos “gen expresado de manera diferencial”, “expresión génica diferencial” y sus sinónimos, que se usan de manera intercambiable, se refieren a un gen cuya expresión está activada hasta un nivel superior o inferior en un sujeto que padece una enfermedad, específicamente cáncer, tal como cáncer de mama, con respecto a su expresión en un sujeto normal o control. Los términos también incluyen genes cuya expresión está activada hasta un nivel superior o inferior en diferentes estadios de la misma enfermedad. También se entiende que un gen expresado de manera diferencial puede estar o bien activado o bien inhibido a nivel de ácido nucleico o a nivel de proteína, o
20 puede someterse a corte y empalme alternativo para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Tales diferencias pueden demostrarse mediante un cambio en los niveles de ARNm, expresión superficial, secreción u otro reparto de un polipéptido, por ejemplo. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las razones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos procesados de manera
25 diferente del mismo gen, que se diferencian entre sujetos normales y sujetos que padecen una enfermedad, específicamente cáncer, o entre diversos estadios de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye diferencias tanto cuantitativas como cualitativas, diferencias en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión, por ejemplo, entre células normales y enfermas, o entre células que se han sometido a diferentes acontecimientos de enfermedad o estadios de enfermedad. Para el fin de esta invención, se considera
30 que está presente “expresión génica diferencial” cuando hay una diferencia de al menos aproximadamente dos veces, preferiblemente al menos aproximadamente cuatro veces, más preferiblemente al menos aproximadamente seis veces, lo más preferiblemente al menos aproximadamente diez veces entre la expresión de un gen dado en sujetos normales y enfermos, o en diversos estadios del desarrollo de la enfermedad en un sujeto enfermo.

35 El término “sobreexpresión” con respecto a un transcrito de ARN se usa para hacer referencia al nivel del transcrito determinado mediante normalización con respecto al nivel de ARNm de referencia, que pueden ser todos transcritos medidos en la muestra o un conjunto de referencia particular de ARNm.

40 La frase “amplificación génica” se refiere a un procedimiento mediante el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular particular. Con frecuencia la región duplicada (un tramo de ADN amplificado) se denomina “amplicón”. Habitualmente, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en la proporción del número de copias realizadas del gen particular expresado.

45 El término “pronóstico” se usa en el presente documento para hacer referencia a la predicción de la probabilidad de muerte atribuible al cáncer o progresión, incluyendo recidiva, propagación metastásica y resistencia a fármacos, de una enfermedad neoplásica, tal como cáncer de mama. El término “predicción” se usa en el presente documento para hacer referencia a la probabilidad de que un paciente responda o bien favorablemente o bien desfavorablemente a un fármaco o conjunto de fármacos, y también el grado de esas respuestas, o de que un
50 paciente sobreviva, tras extirpación quirúrgica del tumor primario y/o quimioterapia durante un determinado periodo de tiempo sin recidiva de cáncer. Los métodos predictivos de la presente invención pueden usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento eligiendo las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas en la predicción de si es probable que un paciente responda favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como intervención quirúrgica,
55 quimioterapia con un fármaco o combinación de fármacos dados, y/o radioterapia, o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente, tras cirugía y/o terminación de quimioterapia u otras modalidades de tratamiento.

60 El término supervivencia “a largo plazo” se usa en el presente documento para hacer referencia a la supervivencia durante al menos 3 años, más preferiblemente durante al menos 8 años, lo más preferiblemente durante al menos 10 años tras la cirugía u otro tratamiento.

El término “tumor”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los crecimientos y proliferaciones de células neoplásicas, ya sean malignos o benignos, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

65 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren al, describen el, estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer

de mama, cáncer de ovarios, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, cáncer de tiroides, cáncer renal; carcinoma, melanoma y cáncer de cerebro.

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que ponen en peligro el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anómalo o no controlable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citocinas u otros productos de secreción a niveles anómalos, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, tumores premalignos, tumores malignos, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc.

La "rigurosidad" de reacciones de hibridación puede determinarla fácilmente un experto habitual en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas superiores para un apareamiento apropiado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas inferiores. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a aparearse cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se desprende que temperaturas relativas superiores tenderán a hacer que las condiciones de reacción sean más rigurosas, mientras que temperaturas inferiores las vuelven menos rigurosas. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", tal como se definen en el presente documento, normalmente: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las "condiciones de rigurosidad moderada" pueden identificarse tal como se describe por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad moderada es incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido por lavar los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para adaptarse a factores tales como longitud de sonda y similares.

En el contexto de la presente invención, la referencia a "al menos uno", "al menos dos", "al menos cinco", etc. de los genes indicados en cualquier conjunto de genes particular significa uno cualquiera o todas y cada una de las combinaciones de los genes indicados.

El término cáncer "de ganglios negativos", tal como cáncer de mama "de ganglios negativos", se usa en el presente documento para hacer referencia a cáncer que no se ha propagado a los ganglios linfáticos.

Los términos "corte y empalme" y "corte y empalme de ARN" se usan de manera intercambiable y se refieren a procesamiento de ARN que elimina intrones y une exones para producir ARNm maduro con secuencia codificante continua que se mueve en el citoplasma de una célula eucariota.

En teoría, el término "exón" se refiere a cualquier segmento de un gen interrumpido que está representado en el producto de ARN maduro (B. Lewin. Genes IV Cell Press, Cambridge Mass. 1990). En teoría el término "intrón" se refiere a cualquier segmento de ADN que se transcribe pero se elimina del interior del transcrito mediante corte y empalme entre sí de los exones a ambos lados del mismo. Operacionalmente, se producen secuencias de exones en la secuencia de ARNm de un gen tal como se define por los números de SEQ ID de referencia. Operacionalmente, las secuencias de intrones son las secuencias intermedias dentro del ADN genómico de un gen, intercaladas entre secuencias de exones y que tienen secuencias consenso de corte y empalme GT y AG en sus límites en 5' y 3'.

B. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de

biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994).

1. Obtención del perfil de expresión génica

Los métodos de obtención del perfil de expresión génica incluyen métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en secuenciación de polinucleótidos y métodos basados en proteómica. Los métodos más comúnmente usados conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de ARNm en una muestra incluyen transferencia de tipo Northern e hibridación *in situ* (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de ARNasa (Hod, Biotechniques 13:852-854 (1992)); y métodos basados en PCR, tales como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Weis *et al.*, Trends in Genetics 8:263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis de la expresión génica basado en secuenciación incluyen análisis en serie de la expresión génica (SAGE), y análisis de la expresión génica mediante determinación de secuencias distintivas en paralelo de manera masiva (MPSS).

2. Métodos de obtención del perfil de expresión génica basados en PCR

a. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

De las técnicas indicadas anteriormente, el método cuantitativo más sensible y más flexible es la RT-PCR, que puede usarse para comparar niveles de ARNm en diferentes poblaciones de muestras, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento farmacológico, para caracterizar patrones de expresión génica, para distinguir entre ARNm estrechamente relacionados y para analizar la estructura del ARN.

La primera etapa es el aislamiento de ARNm de una muestra diana. El material de partida es normalmente ARN total aislado de tumores o líneas celulares tumorales humanos, y tejidos o líneas celulares normales correspondientes, respectivamente. Por tanto, puede aislarse ARN de una variedad de tumores primarios, incluyendo tumor o líneas celulares tumorales de mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículos, ovarios, útero, etc., con ADN combinado de donantes sanos. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, puede extraerse ARNm, por ejemplo, de muestras de tejido incrustadas en parafina congeladas o archivadas, y fijadas (por ejemplo fijadas en formalina).

En la técnica se conocen bien métodos generales para la extracción de ARNm y se dan a conocer en libros de texto convencionales de biología molecular, incluyendo Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997). Se dan a conocer métodos para la extracción de ARN a partir de tejidos incrustados en parafina, por ejemplo, en Rupp y Locker, Lab Invest. 56: A67 (1987), y De Andrés *et al.*, BioTechniques 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento de ARN puede realizarse usando un kit de purificación, conjunto de tampones y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, puede aislarse ARN total a partir de células en cultivo usando mini-columnas RNeasy de Qiagen. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles comercialmente incluyen kit de purificación de ADN y ARN completo MasterPure™ (EPICENTRE®, Madison, WI) y kit de aislamiento de ARN en bloques de parafina (Ambion, Inc.). Puede aislarse ARN total a partir de muestras de tejido usando RNA Stat-60 (Tel-Test). Puede aislarse ARN preparado a partir de un tumor, por ejemplo, mediante centrifugación con gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Dado que el ARN no puede servir como molde para la PCR, la primera etapa en la obtención del perfil de expresión génica mediante RT-PCR es la transcripción inversa del molde de ARN para dar ADNc, seguido por su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas más comúnmente usadas son transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa se cebe normalmente usando cebadores específicos, hexámeros al azar o cebadores de oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y del objetivo de la obtención del perfil de expresión. Por ejemplo, ARN extraído puede someterse a transcripción inversa usando un kit de PCR de ARN de GeneAmp (Perkin Elmer, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Entonces puede usarse el ADNc derivado como molde en la reacción de PCR posterior.

Aunque la etapa de PCR puede usar una variedad de ADN polimerasas dependientes de ADN termoestables, normalmente emplea la ADN polimerasa de Taq, que tiene una actividad nucleasa en 5'-3' pero carece de actividad endonucleasa de corrección en 3'-5'. Por tanto, la PCR TaqMan® utiliza normalmente la actividad nucleasa en 5' de polimerasa de Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero puede usarse

cualquier enzima con actividad nucleasa en 5' equivalente. Se usan dos cebadores oligonucleotídicos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido, o sonda, para detectar una secuencia de nucleótidos ubicada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no puede extenderse mediante la enzima ADN polimerasa de Taq, y está marcada con un tinte fluorescente indicador y un tinte fluorescente extintor.

Cualquier emisión inducida por láser del tinte indicador se extingue por el tinte extintor cuando los dos tintes están ubicados cerca uno del otro como lo están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima ADN polimerasa de Taq escinde la sonda de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en disolución y la señal del tinte indicador liberado está libre del efecto extintor del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de tinte indicador por cada nueva molécula sintetizada y la detección del tinte indicador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

La RT-PCR TaqMan® puede realizarse usando equipo disponible comercialmente, tal como, por ejemplo, ABI PRISM 7700™ Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de nucleasa en 5' se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como el ABI PRISM 7700™ Sequence Detection System™. El sistema consiste en un termociclador, láser, dispositivo de carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, se recoge en tiempo real una señal fluorescente inducida por láser a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para hacer funcionar el instrumento y para analizar los datos.

Los datos del ensayo de nucleasa en 5' se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Tal como se comentó anteriormente, se registran valores de fluorescencia durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El punto en el que se registra por primera vez que la señal fluorescente es estadísticamente significativa es el ciclo umbral (Ct).

Para minimizar errores y el efecto de la variación de muestra a muestra, la RT-PCR se realiza habitualmente usando un patrón interno. El patrón interno ideal se expresa a un nivel constante entre diferentes tejidos y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARN usados con mayor frecuencia para normalizar patrones de expresión génica son ARNm para los genes de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y acción β .

Una variación más reciente de la técnica de RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación de producto de PCR a través de una sonda fluorogénica con doble marcador (es decir, sonda TaqMan®). La PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR de competencia cuantitativa, en la que se usa un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, como con PCR comparativa cuantitativa que usa un gen de normalización contenido dentro de la muestra o un gen de mantenimiento para RT-PCR. Para más detalles, véase, por ejemplo Held *et al.*, Genome Research 6:986-994 (1996).

Las etapas de un protocolo representativo para obtener el perfil de expresión génica usando tejidos incrustados en parafina, fijados, como fuente de ARN, incluyendo aislamiento de ARNm, purificación, extensión por cebadores y amplificación, se facilitan en diversos artículos de revistas publicados (por ejemplo: T.E. Godfrey *et al.* J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 [2000]; K. Specht *et al.*, Am. J. Pathol. 158: 419-29 [2001]). En resumen, un procedimiento representativo comienza con cortar secciones de aproximadamente 10 μ m de grosor de muestras de tejido tumoral incrustadas en parafina. Entonces se extrae el ARN y se retiran las proteínas y el ADN. Tras el análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y se somete el ARN a transcripción inversa usando promotores específicos del gen seguido por RT-PCR.

b. Sistema MassARRAY

En el método de obtención del perfil de expresión génica basado en MassARRAY, desarrollado por Sequenom, Inc. (San Diego, CA) tras el aislamiento de ARN y transcripción inversa, al ADNc obtenido se le añaden cantidades conocidas de una molécula de ADN sintético (competidor), que se corresponde con la región de ADNc seleccionada como diana en todas las posiciones, excepto en una única base, y sirve como patrón interno. Se amplifica mediante PCR la mezcla de ADNc/competidor y se somete a un tratamiento con enzima fosfatasa alcalina de gamba (SAP) tras la PCR, que da como resultado la desfosforilación de los nucleótidos restantes. Tras la inactivación de la fosfatasa alcalina, se someten los productos de PCR del competidor y el ADNc a extensión por cebador, que genera señales de masa diferenciadas para los productos de PCR derivados de competidor y de ADNc. Tras la purificación, se dispensan estos productos sobre una matriz en chip, que se carga previamente con componentes necesarios para el análisis con un análisis de espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (EM por MALDI-TOF). Entonces se cuantifica el ADNc presente en la reacción analizando las razones de las áreas de picos en el espectro de masas generado. Para más detalles véase, por ejemplo, Ding y Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3059-3064 (2003).

c. Otros métodos basados en PCR

Las técnicas basadas en PCR adicionales incluyen, por ejemplo, presentación diferencial (Liang y Pardee, Science

257:967-971 (1992)); polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (iAFLP) (Kawamoto *et al.*, Genome Res. 12:1305-1312 (1999)); tecnología BeadArray™ (Illumina, San Diego, CA; Oliphant *et al.*, Discovery of Markers for Disease (Supplement to Biotechniques), junio de 2002; Ferguson *et al.*, Analytical Chemistry 72:5618 (2000)); BeadsArray para la detección de expresión génica (BADGE), usando el sistema Luminex100 LabMAP disponible comercialmente y microesferas codificadas por múltiples colores (Luminex Corp., Austin, TX) en un ensayo rápido para determinar la expresión génica (Yang *et al.*, Genome Res. 11:1888-1898 (2001)); y análisis de obtención de perfiles de expresión de alta cobertura (HiCEP) (Fukumura *et al.*, Nucl. Acids. Res. 31(16) e94 (2003)).

3. Micromatrices

También puede identificarse o confirmarse la expresión génica diferencial usando la técnica de micromatrices. Por tanto, puede medirse el perfil de expresión de genes asociados con cáncer de mama en tejido tumoral o bien reciente o bien incrustado en parafina, usando tecnología de micromatrices. En este método, se recubren o disponen en matriz secuencias de polinucleótido de interés (incluyendo ADNc y oligonucleótidos) sobre un sustrato de microchip. Entonces se hibridan las secuencias dispuestas en matriz con sondas de ADN específicas de células o tejidos de interés. Al igual que en el método de RT-PCR, la fuente de ARNm es normalmente ARN total aislado de tumores o líneas de células tumorales humanas, y tejidos o líneas celulares normales correspondientes. Por tanto, puede aislarse ARN de una variedad de tumores primarios o líneas de células tumorales. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, puede extraerse ARNm, por ejemplo, de muestras de tejido incrustadas en parafina congeladas o archivadas, y fijadas (por ejemplo fijadas en formalina), que se preparan y se conservan de manera rutinaria en la práctica clínica diaria.

En una realización específica de la técnica de micromatrices, se aplican insertos amplificados por PCR de clones de ADNc a un sustrato en una matriz densa. Preferiblemente se aplican al menos 10.000 secuencias de nucleótidos al sustrato. Los genes dispuestos en micromatriz, inmovilizados sobre el microchip a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para su hibridación en condiciones rigurosas. Pueden generarse sondas de ADNc marcadas con fluorescencia mediante incorporación de nucleótidos fluorescentes mediante transcripción inversa de ARN extraído a partir de tejidos de interés. Sondas de ADNc marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada punto de ADN en la matriz. Tras un lavado riguroso para eliminar sondas unidas de manera no específica, se explora el chip mediante microscopía confocal láser o mediante otro método de detección, tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento dispuesto en matriz permite la evaluación de la abundancia del ARNm correspondiente. Con fluorescencia de doble color, se hibridan por parejas a la matriz sondas de ADNc marcadas por separado generadas a partir de dos fuentes de ARN. Por tanto, se determina simultáneamente la abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una evaluación rápida y conveniente del patrón de expresión para grandes números de genes. Se ha mostrado que tales métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos poco frecuentes, que se expresan a pocas copias por célula, y para detectar de manera reproducible diferencias de al menos aproximadamente dos veces entre los niveles de expresión (Schena *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2):106-149 (1996)). Pueden realizarse análisis en micromatriz mediante equipo disponible comercialmente, siguiendo protocolos del fabricante, tal como usando la tecnología GenChip de Affymetrix o la tecnología de micromatriz de Incyte.

El desarrollo de métodos de micromatriz para el análisis a gran escala de la expresión génica hace posible buscar de manera sistemática marcadores moleculares de clasificación del cáncer y predicción del desenlace en una variedad de tipos de tumores.

4. Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)

El análisis en serie de la expresión génica (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcritos génicos, sin necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcrito. En primer lugar, se genera una etiqueta de secuencia corta (aproximadamente 10-14 pb) que contiene información suficiente para identificar de manera única un transcrito, siempre que se obtenga la etiqueta de una posición única dentro de cada transcrito. Después, se unen entre sí muchos transcritos para formar moléculas en serie largas, que pueden secuenciarse, revelando simultáneamente la identidad de las etiquetas múltiples. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos puede evaluarse cuantitativamente determinando la abundancia de etiquetas individuales e identificando el gen correspondiente a cada etiqueta. Para más detalles véase, por ejemplo, Velculescu *et al.*, Science 270:484-487 (1995); y Velculescu *et al.*, Cell 88:243-51 (1997).

5. Análisis de la expresión génica mediante determinación de secuencias distintivas en paralelo de manera masiva (MPSS)

Este método, descrito por Brenner *et al.*, Nature Biotechnology 1, 8:630-634 (2000), es un enfoque de secuenciación que combina la determinación de secuencias distintivas no basada en gel con la clonación *in vitro* de millones de moldes sobre microperlas separadas de 5 μ m de diámetro. En primer lugar, se construye una biblioteca de microperlas de moldes de ADN mediante clonación *in vitro*. Esto va seguido por el montaje de una matriz plana de las microperlas que contienen moldes en una célula de flujo a alta densidad (normalmente superior a 3 x

10⁶ microperlas/cm²). Se analizan simultáneamente los extremos libres de los moldes clonados sobre cada microperla, usando un método de determinación de secuencias distintivas basado en fluorescencia que no requiere separación de fragmentos de ADN. Se ha mostrado que este método proporciona simultáneamente y con precisión, en una única operación, cientos de miles de secuencias distintivas génicas a partir de una biblioteca de ADNc de levadura.

6. Inmunohistoquímica

Los métodos inmunohistoquímicos también son adecuados para detectar los niveles de expresión de los marcadores de pronóstico de la presente invención. Por tanto, se usan anticuerpos o antisueros, preferiblemente antisueros policlonales, y lo más preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador, para detectar la expresión. Los anticuerpos pueden detectarse mediante marcaje directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de hapteno tales como biotina, o una enzima tal como peroxidasa del rábano o fosfatasa alcalina. Alternativamente, se usa anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado, comprendiendo antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. En la técnica se conocen bien protocolos y kits de inmunohistoquímica y están disponibles comercialmente.

7. Proteómica

El término “proteoma” se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo tejido, organismo o cultivo celular) en un determinado punto de tiempo. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también denominado “proteómica de expresión”). La proteómica incluye normalmente las siguientes etapas: (1) separación de proteínas individuales en una muestra mediante electroforesis en gel en 2-D (2-D PAGE); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo mediante espectrometría de masas o secuenciación N-terminal, y (3) análisis de los datos usando bioinformática. Los métodos de proteómica son complementos valiosos para otros métodos de obtención del perfil de expresión génica, y pueden usarse, solos o en combinación con otros métodos, para detectar los productos de los marcadores de pronóstico de la presente invención.

8. Descripción general del aislamiento, la purificación y la amplificación de ARNm

Las etapas de un protocolo representativo para obtener el perfil de expresión génica usando tejidos incrustados en parafina, fijados, como fuente de ARN, incluyendo aislamiento, purificación, extensión por cebadores y amplificación de ARNm, se proporcionan en diversos artículos de revistas publicados (por ejemplo: T.E. Godfrey *et al.*, J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 [2000]; K. Specht *et al.*, Am. J. Pathol. 158: 419-29 [2001]). En resumen, un procedimiento representativo comienza con cortar secciones de aproximadamente 10 µm de grosor de muestras de tejido tumoral incrustadas en parafina. Entonces se extrae el ARN y se retiran las proteínas y el ADN. Tras el análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y se somete el ARN a transcripción inversa usando promotores específicos del gen seguido por RT-PCR. Finalmente, se analizan los datos para identificar la(s) mejor(es) opción(es) de tratamiento disponible(s) para el paciente basándose en el patrón de expresión génica característico identificado en la muestra tumoral examinada, dependiendo de la probabilidad predicha de recidiva de cáncer.

9. Conjunto de genes de cáncer de mama, subsecuencias de genes sometidos a ensayo y aplicación clínica de los datos de expresión génica

Un aspecto importante de la presente invención es usar la expresión medida de determinados genes por tejido de cáncer de mama para proporcionar información de pronóstico. Para ello, es necesario corregir (separar por normalización) tanto diferencias en la cantidad de ARN sometido a ensayo como variabilidad en la calidad del ARN usado. Por tanto, normalmente el ensayo mide e incorpora la expresión de determinados genes de normalización, incluyendo genes de mantenimiento bien conocidos, tales como GAPDH y Cyp1. Alternativamente, la normalización puede basarse en la media o mediana de la señal (Ct) de todos los genes sometidos a ensayo o un gran subconjunto de los mismos (enfoque de normalización global). Basándose en cada gen, se compara la cantidad normalizada medida del ARNm tumoral de un paciente con la cantidad encontrada en un conjunto de referencia de tejido de cáncer de mama. El número (N) de tejidos de cáncer de mama en este conjunto de referencia debe ser lo suficientemente alto como para garantizar que diferentes conjuntos de referencia (en su totalidad) se comportan esencialmente de la misma manera. Si se cumple esta condición, la identidad de los tejidos de cáncer de mama individuales presentes en un conjunto particular no tendrá ningún impacto significativo sobre las cantidades relativas de los genes sometidos a ensayo. Habitualmente, el conjunto de referencia de tejido de cáncer de mama consiste en al menos aproximadamente 30, preferiblemente al menos aproximadamente 40 muestras de tejido de cáncer de mama FPE diferentes. A menos que se indique lo contrario, los niveles de expresión normalizados para cada ARNm/tumor sometido a prueba/paciente se expresarán como porcentaje del nivel de expresión medido en el conjunto de referencia. Más específicamente, el conjunto de referencia con un número suficientemente alto (por ejemplo 40) de tumores proporciona una distribución de niveles normalizados de cada especie de ARNm. El nivel medido en una muestra tumoral particular que va a analizarse se encuentra en algún percentil dentro de este

intervalo, que puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. A continuación, a menos que se indique lo contrario, la referencia a niveles de expresión de un gen supone la expresión normalizada con respecto al conjunto de referencia aunque no siempre se mencione esto de manera explícita.

5 10. Diseño de cebadores y sondas de PCR basados en intrones

Según un aspecto de la presente invención, se diseñan cebadores y sondas de PCR basándose en secuencias de intrones presentes en el gen que va a amplificarse. Por consiguiente, la primera etapa en el diseño de cebadores/sondas es la delineación de secuencias de intrones dentro de los genes. Esto puede realizarse mediante software públicamente disponible, tal como el software DNA BLAT desarrollado por Kent, W.J., *Genome Res.* 12(4):656-64 (2002), o mediante el software BLAST incluyendo sus variaciones. Las etapas posteriores siguen métodos bien establecidos de diseño de cebadores y sondas de PCR.

Con el fin de evitar señales no específicas, es importante enmascarar secuencias de repetición dentro de los intrones cuando se diseñan los cebadores y las sondas. Esto puede lograrse fácilmente usando el programa Repeat Masker disponible en línea a través del Baylor College of Medicine, que examina secuencias de ADN frente a una biblioteca de elementos de repetición y devuelve una secuencia de consulta en la que los elementos de repetición están enmascarados. Entonces pueden usarse las secuencias de intrones enmascaradas para diseñar secuencias de cebadores y sondas usando cualquier paquete de diseño de cebadores/sondas disponible comercialmente o públicamente de otro modo, tales como Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, págs. 365-386).

Los factores más importantes considerados en el diseño de cebadores de PCR incluyen longitud de cebador, temperatura de fusión (T_f) y contenido de G/C, especificidad, secuencias de cebador complementarias y secuencia en el extremo 3'. En general, los cebadores de PCR óptimos tienen generalmente 17-30 bases de longitud y contienen aproximadamente el 20-80%, tal como, por ejemplo, aproximadamente el 50-60% de bases G+C. Normalmente se prefieren T_f de entre 50 y 80°C, por ejemplo de aproximadamente 50 a 70°C.

Para directrices adicionales para el diseño de cebadores y sondas de PCR véase, por ejemplo Dieffenbach, C.W. *et al.*, "General Concepts for PCR Primer Design" en: *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, págs. 133-155; Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs" en: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, CRC Press, Londres, 1994, págs. 5-11; y Plasterer, T.N. *Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol.* 70:520-527 (1997).

En el siguiente ejemplo no limitativo se describirán detalles adicionales de la invención.

Ejemplo

Estudio de fase II de la expresión génica en 242 tumores de mama malignos

Se diseñó y se realizó un estudio de la expresión génica con el objetivo principal de caracterizar molecularmente la expresión génica en muestras de tejido incrustadas en parafina, fijadas, de carcinoma ductal de mama invasivo, y explorar la correlación entre tales perfiles moleculares y la supervivencia libre de enfermedad.

Diseño del estudio

Se realizaron ensayos moleculares con tejidos de tumor de mama primario, incrustados en parafina, fijados en formalina, obtenidos de 252 pacientes individuales con diagnóstico de cáncer de mama invasivo. Todos los pacientes tenían ganglios linfáticos negativos, eran positivos para ER y se trataron con tamoxifeno. La edad media era de 52 años y el tamaño de tumor clínico medio era de 2 cm. La mediana del seguimiento fue de 10,9 años. A fecha del 1 de enero de 2003, 41 pacientes tenían recidiva de enfermedad local o distante o habían muerto por cáncer de mama. Los pacientes sólo se incluyeron en el estudio si la evaluación histopatológica, realizada tal como se describe en la sección de materiales y métodos, indicó cantidades adecuadas de tejido tumoral y patología homógenea.

Materiales y métodos

Se caracterizó cada bloque de tumor representativo mediante histopatología convencional para el diagnóstico, evaluación semicuantitativa de la cantidad de tumor y clasificación tumoral. Cuando el área tumoral era inferior al 70% de la sección, se sometió el área tumoral a disección macroscópica y se tomó tejido de 6 secciones (10 micrómetros). De lo contrario, se prepararon un total de 3 secciones (también de 10 micrómetros de grosor cada una). Se colocaron las secciones en dos tubos de microcentrifugadora de marca Costar (tubos de polipropileno, de 1,7 ml, transparentes). Si se obtuvo más de un bloque de tumor como parte del procedimiento quirúrgico, se usó para el análisis el bloque más representativo de la patología.

Análisis de la expresión génica

Se extrajo ARNm y se purificó a partir de muestras de tejido incrustadas en parafina, fijadas, y se preparó para el análisis de la expresión génica tal como se describió en el capítulo 6 anterior.

Se realizaron ensayos moleculares de la expresión génica cuantitativa mediante RT-PCR, usando el ABI PRISM 7900™ Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). ABI PRISM 7900™ consiste en un termociclador, láser, dispositivo de carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 384 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, se recoge en tiempo real una señal fluorescente inducida por láser a través de cables de fibra óptica para los 384 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para hacer funcionar el instrumento y para analizar los datos.

Análisis y resultados

Se analizó tejido tumoral para detectar 187 genes relacionados con cáncer y 5 genes de referencia. Se obtuvieron perfiles de RT-PCR adecuados de 242 de los 252 pacientes. Se normalizaron los valores de ciclo umbral (CT) para cada paciente basándose en la mediana de los 7 genes de referencia para ese paciente particular. Había datos de desenlace clínico disponibles para todos los pacientes a partir de una revisión de datos de registro e historias clínicas de pacientes seleccionados. Los desenlaces se clasificaron como:

Acontecimiento: Vivo con recidiva de cáncer de mama local, regional o distante o muerte debido a cáncer de mama.

Sin acontecimiento: Vivo sin recidiva de cáncer de mama local, regional o distante o vivo con recidiva de cáncer de mama contralateral o vivo con segundo cáncer primario distinto de mama o muerte antes de la recidiva de cáncer de mama.

El análisis se realizó mediante:

A. Determinación de la relación entre la expresión génica normalizada y los desenlaces binarios de 0 ó 1;

B. Análisis de la relación entre la expresión génica normalizada y el tiempo hasta el desenlace (0 ó 1 tal como se definió anteriormente) en el que se censuraron los pacientes que estaban vivos sin recidiva de cáncer de mama o que murieron debido a una causa distinta al cáncer de mama. Este enfoque se usó para evaluar el impacto del pronóstico de genes individuales y también conjuntos de múltiples genes.

Análisis de pacientes con carcinomas de mama invasivos mediante enfoque binario

En el primer enfoque (binario) se realizó el análisis con los 242 pacientes con carcinoma de mama invasivo. Se realizó una prueba de la t con los grupos de pacientes clasificados como o bien sin recidiva o bien sin muerte relacionada con cáncer de mama a los 10 años, frente a recidiva o muerte relacionada con cáncer de mama a los 10 años, y se calcularon los valores de p para las diferencias entre los grupos para cada gen.

La tabla 1 indica los 33 genes para los que el valor de p para las diferencias entre los grupos fue <0,05. La primera columna de valores de expresión medios se refiere a pacientes que tenían una recidiva metastásica de, o murieron por, cáncer de mama. La segunda columna de valores de expresión medios se refiere a pacientes que ni tenían recidiva metastásica ni murieron por cáncer de mama.

Tabla 1

Gen	Media del grupo A	Media del grupo B	Prueba estadística de la T	Valor de P
	Acontecimiento	Sin acontecimiento		
MMP9	-3,15	-4,27	3,75	0,00
GSTM1	-5,02	-4,03	-3,56	0,00
MELK	-3,89	-4,66	3,34	0,00
PR	-4,56	-3,18	-3,27	0,00
DKFZp586M07	-3,83	-2,94	-3,09	0,00
GSTM3	-2,56	-1,69	-3,06	0,00
MCM2	-3,51	-4,08	3,03	0,00
CDC20	-3,01	-3,75	3,01	0,00
CCNB1	-4,48	-5,17	3,02	0,00

STMY3	-0,58	-1,20	2,95	0,00
GRB7	-1,93	-3,01	2,98	0,00
MYBL2	-3,91	-4,78	2,91	0,01
CEGP1	-3,00	-1,85	-2,89	0,01
SURV	-4,23	-5,06	2,88	0,01
LMNB1	-2,40	-2,91	2,81	0,01
CTSL2	-5,74	-6,39	2,83	0,01
PTTG1	-3,49	-4,14	2,72	0,01
BAG1	-1,76	-1,30	-2,58	0,01
KNSL2	-3,35	-4,06	2,60	0,01
CIAP1	-4,44	-4,02	-2,58	0,01
PREP	-3,34	-3,74	2,56	0,01
NEK2	-5,25	-5,80	2,53	0,01
EpCAM	-1,95	-2,31	2,50	0,01
PCNA	-2,79	-3,13	2,42	0,02
C20_orf 1	-2,48	-3,09	2,39	0,02
ITGA7	-4,53	-3,87	-2,37	0,02
ID1	-2,58	-2,17	-2,30	0,02
B_Catenin	-1,32	-1,08	-2,28	0,03
EstR1	-0,78	-0,12	-2,28	0,03
CDH1	-2,76	-3,27	2,20	0,03
TS	-2,86	-3,29	2,18	0,03
HER2	0,53	-0,22	2,18	0,03
cMYC	-3,22	-2,85	-2,16	0,04

En la tabla 1 anterior, valores de t negativos indican una mayor expresión, asociada con mejores desenlaces, y a la inversa, valores de t superiores (positivos) indican una mayor expresión asociada con peores desenlaces. Por tanto, por ejemplo, una expresión elevada del gen CCNB1 (valor de $t = 3,02$; CT media vivos < CT media muertos) indica una probabilidad reducida de supervivencia libre de enfermedad. De manera similar, la expresión elevada del gen GSTM1 (valor de $t = -3,56$; CT media vivos > CT media muertos) indica una probabilidad aumentada de supervivencia libre de enfermedad.

Por tanto, basándose en los datos expuestos en la tabla 1, la expresión de cualquiera de los siguientes genes en el cáncer de mama indica una probabilidad reducida de supervivencia sin recidiva de cáncer: C20_orf1; CCNB1; CDC20; CDH1; CTSL2; EpCAM; GRB7; HER2; KNSL2; LMNB1; MCM2; MMP9; MYBL2; NEK2; PCNA; PREP; PTTG1; STMY3; SURV; TS; MELK.

Basándose en los datos expuestos en la tabla 1, la expresión de cualquiera de los siguientes genes en el cáncer de mama indica un mejor pronóstico para la supervivencia sin recidiva de cáncer: BAG1; B_Catenin; CEGP1; CIAP1; cMYC; DKFZp586M07; EstR1; GSTM1; GSTM3; ID1; ITGA7; PR.

Análisis de múltiples genes e indicadores del desenlace

Se tomaron dos enfoques con el fin de determinar si usar múltiples genes proporcionaba una mejor distinción entre desenlaces. En primer lugar, se realizó un análisis de distinción usando un enfoque de avance gradual. Se generaron modelos que clasificaron el desenlace con mayor distinción que la que se obtuvo con cualquier gen individual solo. Según un segundo enfoque (enfoque de tiempo hasta el acontecimiento), para cada gen se definió un modelo de riesgos proporcionales de Cox (véase, por ejemplo Cox, D. R., y Oakes, D. (1984), Analysis of Survival Data, Chapman and Hall, Londres, Nueva York) con tiempo hasta la recidiva o muerte como la variable dependiente, y el nivel de expresión del gen como la variable independiente. Se identificaron los genes que tienen un valor de $p < 0,05$ en el modelo de Cox. Para cada gen, el modelo de Cox proporciona el riesgo relativo (RR) de recidiva o muerte para un cambio de una unidad en la expresión del gen. Puede elegirse repartir los pacientes en subgrupos a cualquier valor umbral de la expresión medida (en la escala de CT), en el que todos los pacientes con

valores de expresión por encima del umbral tienen un riesgo mayor y todos los pacientes con valores de expresión por debajo del umbral tienen un riesgo menor, o viceversa, dependiendo de si el gen es un indicador de un pronóstico malo ($RR > 1,01$) o bueno ($RR < 1,01$). Por tanto, cualquier valor umbral definirá subgrupos de pacientes con riesgo respectivamente aumentado o reducido. Los resultados se resumen en la tabla 2, que indica los 42 genes para los que el valor de p para las diferencias entre los grupos era $< 0,05$.

Tabla 2

Gen	Riesgo relativo	Valor de p
GRB7	1,52	0,000011
SURV	1,57	0,000090
PR	0,74	0,000129
LMNB1	1,92	0,000227
MYBL2	1,46	0,000264
HER2	1,46	0,000505
GSTM1	0,68	0,000543
MELK	1,59	0,000684
C20_orF1	1,59	0,000735
PTTG 1	1,63	0,001135
BUB1	1,58	0,001425
CDC20	1,54	0,001443
CCNB1	1,60	0,001975
STMY3	1,47	0,002337
KNSL2	1,48	0,002910
CTSL2	1,43	0,003877
MCM2	1,59	0,005203
NEK2	1,48	0,006533
DR5	0,62	0,006660
Ki_67	1,46	0,008188
CCNE2	1,38	0,009505
TOP2A	1,38	0,009551
PCNA	1,67	0,010237
PREP	1,69	0,012308
FOXM1	1,52	0,012837
NME1	1,46	0,013622
CEGP1	0,84	0,013754
BAG1	0,68	0,015422
STK15	1,46	0,017013
HNRPAB	1,96	0,017942
EstR1	0,80	0,018877
MMP9	1,19	0,019591
DKFZp586M07	0,79	0,020073
TS	1,44	0,025186
Src	1,70	0,037398
BIN1	0,75	0,038979
NPD009	0,80	0,039020

RPLPO	0,52	0,041575
GSTM3	0,84	0,041848
MMP12	1,27	0,042074
TFRC	1,57	0,046145
IGF1R	0,78	0,046745

Basándose en los datos expuestos en la tabla 2, la expresión de cualquiera de los siguientes genes en el cáncer de mama indica una probabilidad reducida de supervivencia sin recidiva de cáncer: GRB7; SURV; LMNB1; MYBL2; HER2; MELK; C20_orf1; PTTG1; BUB1; CDC20; CCNB1; STMY3; KNSL2; CTS2L2; MCM2; NEK2; Ki_67; CCNE2; TOP2A-4; PCNA; PREP; FOXM1; NME1; STK15; HNRPA; MMP9; TS; Src; MMP12; TFRC.

Basándose en los datos expuestos en la tabla 2, la expresión de cualquiera de los siguientes genes en el cáncer de mama indica un mejor pronóstico para la supervivencia sin recidiva de cáncer: PR; GSTM11; DR5; CEGP1; BAG1; EstR1; DKFZp586M07; BIN1; NPD009; RPLPO; GSTM3; IGF1R.

Los análisis binario y de tiempo hasta el acontecimiento, con pocas excepciones, identificaron los mismos genes como marcadores de pronóstico. Por ejemplo, la comparación de las tablas 1 y 2 muestra que 10 genes estaban representados entre los 15 genes más importantes en ambas listas. Además, cuando ambos análisis identificaron el mismo gen a $[p < 0,10]$, lo que sucedió para 26 genes, siempre concordaban con respecto al sentido (signo positivo o negativo) de la correlación con la supervivencia/recidiva. En conjunto, estos resultados refuerzan la conclusión de que los marcadores identificados tienen un valor de pronóstico significativo.

Análisis genético de múltiples variables de 242 pacientes con carcinoma de mama invasivo

Para modelos de Cox que comprenden más de dos genes (modelos de múltiples variables), se realiza la introducción gradual de cada gen individual en el modelo, en el que el primer gen introducido se selecciona previamente de los genes que tienen valores de p para una variable significativos, y el gen seleccionado para su introducción en el modelo en cada etapa posterior es el gen que mejora de la mejor manera el ajuste del modelo a los datos. Este análisis puede realizarse con cualquier número total de genes. En el análisis cuyos resultados se muestran a continuación, se realizó la introducción gradual para hasta 10 genes.

Se realizó un análisis de múltiples variables usando la siguiente ecuación:

$$RR = \exp[\text{coef}(\text{genA}) \times \text{Ct}(\text{genA}) + \text{coef}(\text{genB}) \times \text{Ct}(\text{genB}) + \text{coef}(\text{genC}) \times \text{Ct}(\text{genC}) + \dots]$$

En esta ecuación, los coeficientes para los genes que son factores pronóstico de un desenlace beneficioso son números positivos y los coeficientes para genes que son factores pronóstico de un desenlace desfavorable son números negativos. Los valores de "Ct" en la ecuación son $\square \text{Ct}$, es decir, reflejan la diferencia entre el valor de Ct normalizado promedio para una población y el Ct normalizado medido para el paciente en cuestión. El convenio usado en el presente análisis ha sido que $\square \text{Ct}$ por debajo y por encima del promedio de la población tienen signos positivos y signos negativos, respectivamente (reflejando una mayor o menor abundancia de ARNm). El riesgo relativo (RR) calculado resolviendo esta ecuación indicará si el paciente tiene una probabilidad potenciada o reducida de supervivencia a largo plazo sin recidiva de cáncer.

Se realizó un análisis gradual de múltiples variables, usando el modelo de riesgos proporcionales de Cox, sobre los datos de expresión génica obtenidos para los 242 pacientes con carcinoma de mama invasivo. Mediante este análisis se identificó que el siguiente conjunto de diez genes tenía un valor predictivo particularmente fuerte de la supervivencia de pacientes: GRB7; LMNB1; ER; STMY3; KLK10; PR; KRT5; FGFR1; MCM6; SNRPF. En este conjunto de genes, ER, PR, KRT5 y MCM6 contribuyen a un buen pronóstico, mientras que GRB7, LMNB1, STMY3, KLK10, FGFR1 y SNRPF contribuyen a un mal pronóstico.

Aunque se ha descrito la presente invención con referencia a lo que se considera que son las realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no se limita a tales realizaciones. Por el contrario, se pretende que la invención cubra diversas modificaciones y equivalentes incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tabla 3

Gen	Regis- tro	Inicia- ción	Termi- nación	SEQ ID NO.	Secuencia
B- Catenin	NM_001 904	1549	1629	SEQ NO: 1	ID GGCTCTTGTGCGTACTGTCTTCGGGCTGGTGACAGGGAAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTG CTCTTCGTCATCTGA
BAG1	NM_004 323	673	754	SEQ NO: 2	ID CGTTGTCAGCACTTGGAAATACAAGATGGTTGCCGGGTCATGTTAATTGGGAAAAAGAACAGTCCAC AGGAAGAGGTTGAAC
BIN1	NM_004 305	866	942	SEQ NO: 3	ID CCTGCAAAAGGGAACAAGAGCCCTTCGCCTCCAGATGGCTCCCTGCCGCCACCCCGAGATCA GAGTCAACCACG

BUB1	NM_004	1002	1070	SEQ	ID	CCGAGGTTAATCCAGCACGTATGGGGCCAAAGTGTAGGCTCCAGCAGGAAGTGTAGAGCGCCATG
	336			NO: 4		TCCT
C20	NM_012	2675	2740	SEQ	ID	TCAGCTGTGAGCTGCGGATACCGCCCGCAATGGGACCTGCTCTTAACCTCAAACCTAGGACCGT
orf1	112			NO: 5		
CCNB1	NM_031	823	907	SEQ	ID	TTCAGGTTGTTGCAGGAGACCATGTACATGACTGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCAGAATAATT
	966			NO: 6		GTGTGCCCAAGAAGATG
CCNE2	NM_057	2026	2108	SEQ	ID	ATGCTGTGGCTCCTTCTAACTGGGGCTTTCTTGACATGTAGGTTGCTTGGTAATAACCTTTTGTG
	749			NO: 7		TATCACAATTTGGGT
CDC20	NM_001	679	747	SEQ	ID	TGGATTGGAGTTCTGGGAATGTACTGGCCGTGGCACTGGACAACAGTGTGTACCTGTGGAGTGCA
	255			NO: 8		AGC
CDH1	NM_004	2499	2580	SEQ	ID	TGAGTGTCCCGGATCTTCCCCGCCCTGCCAATCCCGATGAAATTGGAAATTTTATTGATGAAA
	360			NO: 9		ATCTGAAAGCGGCTG
CEGP1	NM_020	563	640	SEQ	ID	TGACAATCAGCACACCTGCATTACCGCTCGGAAGAGGGCTGAGCTGCATGAATAAGGATCACG
	974			NO: 10		GCTGTAGTCACA
CIAP1	NM_001	1822	1894	SEQ	ID	TGCCTGTGGTGGGAAGCTCAGTAACCTGGGAACCAAGGATGATGCTATGTCAGAACACCGGAGGC
	166			NO: 11		ATTTTCC
cMYC	NM_002	1494	1578	SEQ	ID	TCCCTCCACTCGGAAGGACTATCCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGTGAGAGTCTG
	467			NO: 12		GACAGATCAGCAACACCG
CTSL2	NM_001	671	738	SEQ	ID	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAATCTGGTGGACTGTTGCGCTCTCAAGGCAATCAGGGCTGCAATG
	333			NO: 13		GT
DKFZp5	AL05022	559	633	SEQ	ID	TCCATTTTCTACTGTAACTTTCATCATTTTGTGCAAGGCCCTGGAAGCAAAGAGAGGAAGGGACC
86	7			NO: 14		GACTGCAT
DR5	NM_003	1127	1211	SEQ	ID	CTCTGAGACAGTGTCTCGATGACTTTGCAGACTTGGTGGCTTTGACTCCTGGGAGCCGCTCATGA
	842			NO: 15		GGAAAGTTGGGCTCATGG
EpCAM	NM_002	435	510	SEQ	ID	GGGCCCCCTCCAGAACAAATGATGGGCTTTATGATCCTGACTGCGATGAGAGCGGGCTCTTTAAGGCC
	354			NO: 16		AAGCAGTGCA
EstR1	NM_000	1956	2024	SEQ	ID	CCTGGTGCCCTCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGGACGCCACCGCCTACATGCGCCCACTA
	125			NO: 17		GCC
FGFR1	NM_023	2685	2759	SEQ	ID	CACGGGACATTCACCACATCGACTACTATAAAAGACAACCAACGGCCGACTGCCTGTGAAGTGG
	109			NO: 18		ATGGCACCC
FOXM1	NM_021	1898	1980	SEQ	ID	CCACCCCGAGCAATCTGTCTCCCGAGAACCCCTGAATCCTGGAGGCTCACGCCCCAGCCAAA
	953			NO: 19		GTAGGGGGAGCTGGATT
GRB7	NM_005	1275	1342	SEQ	ID	CCATCTGCATCCATCTTGTGGGCTCCCCACCCCTTGAGAAAGTGCCTCAGATAATACCCTGGTGGC
	310			NO: 20		C
GSTM1	NM_000	93	179	SEQ	ID	AAGCTATGAGGAAAAGTACACGATGGGGGACGCTCCTGATTATGACAGAAGCCAGTGGCTGA
	561			NO: 21		ATGAAAAATTCAAGCTGGGCC
GSTM3	NM_000	248	324	SEQ	ID	CAATGCCATCTTGCGCTACATCGCTCGCAAGCAACAATGTGTGGTGAAGTGAAGAAGAAAAGAT
	849			NO: 22		TCGAGTGGAC
HER2	NM_004	1138	1208	SEQ	ID	CGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGC
	448			NO: 23		GAGAGG
HNRPA	NM_004	1086	1170	SEQ	ID	CAAGGGAGCGCAACTGATCGCACACATGCTTTGTTGGATATGGAGTGAACACAATTATGTACC
B	499			NO: 24		AAATTTAACTTGGCAAC
ID1	NM_002	286	356	SEQ	ID	AGAACCAGCAAGGTGAGCAAGGTGGAGATTCTCCAGCACGTATCGACTACATCAGGGACCTTCAG
	165			NO: 25		TTGGA
IGF1R	NM_000	3467	3550	SEQ	ID	GCATGGTAGCCGAAGATTTACAGTCAAAATCGGAGATTTTGGTATGACCGCAGATATCTATGAGA
	875			NO: 26		CAGACTATTACCGGAAA
ITGA7	NM_002	633	712	SEQ	ID	GATATGATTGGTCTGCTGTTGTGCTCAGCCAGGACCTGGCCATCCGGGATGAGTTGGATGGTGG
	206			NO: 27		GGAAATGGAAGTTCT
KI-67	NM_002	42	122	SEQ	ID	CGGACTTTGGGTGCGACTTGACGAGCGGTGTTTCGACAAGTGGCCTTGCGGGCCGGATCGTCCC
	417			NO: 28		AGTGGAAAGATTGTAA
KLK10	NM_002	966	1044	SEQ	ID	GCCCAGAGGCTCCATCGTCCATCCTCTTCTCCCCAGTCGGCTGAACTCTCCCTTGTCTGCACT
	776			NO: 29		GTTCAAACCTCTG
KNSL2	BC00071	1266	1343	SEQ	ID	CCACCTCGCCATGATTTTTCTTTGACCGGGTATTCCACCAGGAAGTGGACAGGATGAAGTGT
	2			NO: 30		GAAGAGATTGC
KRT5	NM_000	1605	1674	SEQ	ID	TCAGTGGGAAGGAGTTGGACCACTCAACATCTCTGTTGTCAACAGAGTGTTCCTCTGGATATG
	424			NO: 31		GCA
LMNB1	NM_005	1500	1566	SEQ	ID	TGCAAACGCTGGTGTACAGCCAGCCCCCAACTGACCTCATCTGGAAGAACCAGAACTCGTGGG
	573			NO: 32		G
MCM2	NM_004	2442	2517	SEQ	ID	GACTTTTGCCCGCTACCTTTTCATTCCGGCGTGACAACAATGAGCTGTTGCTCTTCACTGAAGCA
	528			NO: 33		GTTAGTGGC
MCM6	NM_005	2669	2751	SEQ	ID	TGATGGTCTATGTGTCACATTCATCAGGTTTCATACCAACACAGGCTTCAGCACTTCTTTGGT
	915			NO: 34		GTGTTTCTGTGCCA
MELK	NM_014	22	87	SEQ	ID	AACCCGCGCATCGAAAAGATTCTTAGGAACGCCGTACCAGCCGCTCTCTCAGGACAGCAGGCC
	791			NO: 35		
MMP12	NM_002	816	894	SEQ	ID	CCAACGCTTGCCAAATCCTGACAATTCAGAACCAGCTCTCTGTGACCCCAATTTGAGTTTTGATGCT
	426			NO: 36		GTCCTACCGT
MMP9	NM_004	124	191	SEQ	ID	GAGAACCAATCTCACCAGCAGGCAGCTGGCAGAGGAATACCTGTACCGCTATGGTTACACTCGGG
	994			NO: 37		TG
MYBL2	NM_002	599	673	SEQ	ID	GCCGAGATCGCCAAGATGTTGCCAGGGAGGACAGACAATGCTGTGAAGAATCACTGGAATCTAC
	466			NO: 38		CATCAAAAG
NEK2	NM_002	102	181	SEQ	ID	GTGAGGCAGCGCGACTCTGGCGACTGGCCGGCCATGCCCTCCCGGGCTGAGGACTATGAAGTG
	497			NO: 39		TGTACACCAATTGGCA
NME1	NM_000	365	439	SEQ	ID	CCAACCTGCAGACTCCAAGCCTGGGACCATCCGTGGAGACTTCTGCATACAAGTTGGCAGGAAC
	269			NO: 40		ATTATACAT
NPD009	NM_020	589	662	SEQ	ID	GGCTGTGGCTGAGGCTGTAGCATCTCTGCTGGAGGTGAGACACTCTGGGAAGTGAATTTGACCTCG
	686			NO: 41		AATGCTCC
PCNA	NM_002	157	228	SEQ	ID	GAAGGTGTTGGAGGCACTCAAGGACCTCATCAACGAGGCTGCTGGGATATTAGCTCCAGCGGTG
	592			NO: 42		TAAACC
PR	NM_000	1895	1980	SEQ	ID	GCATCAGGCTGTCTATTGTTGTTGCTTACCTGTGGGAGCTGTAAAGTCTTCTTTAAGAGGGCAATG
	926			NO: 43		GAAGGGCAGCACAACACT
PREP	NM_002	889	965	SEQ	ID	GGGACGGTGTTCACATTCAAGACGAATCGCCAGTCTCCCAACTATCGCGTGATCAACATTGACTTC
	726			NO: 44		TGGATCCTG
PTTG1	NM_004	48	122	SEQ	ID	GGCTACTCTGATCTATGTTGATAAGGAAAATGGAGAACCAGGCACCCGTGTGGTGTCTAAGGATG
	219			NO: 45		GGCTGAAGC
RPLPO	NM_001	791	866	SEQ	ID	CCATTCTATCATCAACGGGTACAACAGAGTCTGTCCTGTGGAGACGATTACACCTTCCC
	002			NO: 46		ACTTGCTGA

SNRPF	NM_003095	71	150	SEQ	ID	GGCTGGTCGGCAGAGAGTAGCCTGCAACATTGCGCCGTGGTTTACATGAGTTTACCCCTCAATCC
				NO: 47		CAAACCTTTCTCA
Src	NM_004383	979	1043	SEQ	ID	CCTGAACATGAAGGAGCTGAAGCTGCTGCAGACCATCGGAAGGGGGAGTTGCGAGACGTGATG
				NO: 48		
STK15	NM_003600	1101	1170	SEQ	ID	CATCTTCCAGGAGGACCACTCTCTGTGGCACCCTGGACTACCTGCCCCCTGAAATGATTGAAGGT
				NO: 49		CGGA
STMY3	NM_005940	2090	2180	SEQ	ID	CCTGGAGGCTGCAACATACCTCAATCCTGTCCCAGGCCGGATCCTCCTGAAGCCCTTTTCGCAGC
				NO: 50		ACTGCTATCCTCCAAAGCCATTGTA
SURV	NM_001168	737	817	SEQ	ID	TGTTTTGATTCCCGGGCTTACCAGGTGAGAAGTGAGGGAGGAAGAAGGCAGTGTCCCTTTTGCTA
				NO: 51		GAGCTGACAGCTTG
TFRC	NM_003234	2110	2178	SEQ	ID	GCCAACTGCTTTCATTTGTGAGGGATCTGAACCAATACAGAGCAGACATAAAGGAAATGGGCCTGA
				NO: 52		GT
TOP2A	NM_001067	4505	4577	SEQ	ID	AATCCAAGGGGAGAGTGATGACTTCCATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGCTCCTCGGGCAAAA
				NO: 53		TCTGTAC
TS	NM_001071	764	829	SEQ	ID	GCCTCGGTGTGCCTTTCAACATCGCCAGCTACGCCCTGCTCACGTACATGATTGCGCACATCACG
				NO: 54		

Tabla 4

Gen	Registro	Nombre	SEQ ID NO	Secuencia	
B-Catenin	NM_001904	S2150/B-Cate.f3	SEQ ID NO: 55	GGCTCTTGTCGCTACTGTCCCTT	22
B-Catenin	NM_001904	S2151/B-Cate.r3	SEQ ID NO: 56	TCAGATGACGAAGAGCACAGATG	23
B-Catenin	NM_001904	S5046/B-Cate.p3	SEQ ID NO: 57	AGGCTCAGTGATGTCTTCCCTGTCAACCAG	29
BAG1	NM_004323	S1386/BAG1.f2	SEQ ID NO: 58	CGTTGTGACCACTTGAATACAA	23
BAG1	NM_004323	S1387/BAG1.r2	SEQ ID NO: 59	GTTCAACCTCTTCTGTGGACTGT	24
BAG1	NM_004323	S4731/BAG1.p2	SEQ ID NO: 60	CCCAATTAACATGACCCGGAACCAT	26
BIN1	NM_004305	S2651/BIN1.f3	SEQ ID NO: 61	CCTGCAAAAGGGAACAAGAG	20
BIN1	NM_004305	S2652/BIN1.r3	SEQ ID NO: 62	CGTGGTTGACTCTGATCTCG	20
BIN1	NM_004305	S4954/BIN1.p3	SEQ ID NO: 63	CTTCGCCTCCAGATGGCTCCC	21
BUB1	NM_004336	S4294/BUB1.f1	SEQ ID NO: 64	CCGAGGTTAATCCAGCACGTA	21
BUB1	NM_004336	S4295/BUB1.r1	SEQ ID NO: 65	AAGACATGGCGCTCTCAGTTC	21
BUB1	NM_004336	S4296/BUB1.p1	SEQ ID NO: 66	TGCTGGGAGCCTACACTTGGCCC	23
C20 orf1	NM_012112	S3560/C20o.f1	SEQ ID NO: 67	TCAGCTGTGAGCTGCGGATA	20
C20 orf1	NM_012112	S3561/C20o.r1	SEQ ID NO: 68	ACGGTCCTAGGTTTGAGGTTAAGA	24
C20 orf1	NM_012112	S3562/C20o.p1	SEQ ID NO: 69	CAGGTCCCATTGCCGGGCG	19
CCNB1	NM_031966	S1720/CCNB1.f2	SEQ ID NO: 70	TTCAGGTTGTTGCAGGAGAC	20
CCNB1	NM_031966	S1721/CCNB1.r2	SEQ ID NO: 71	CATCTTCTGGGCACACAAAT	20
CCNB1	NM_031966	S4733/CCNB1.p2	SEQ ID NO: 72	TGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCA	27
CCNE2	NM_057749	S1458/CCNE2.f2	SEQ ID NO: 73	ATGCTGTGGCTCCTTCCTAACT	22
CCNE2	NM_057749	S1459/CCNE2.r2	SEQ ID NO: 74	ACCAAATTGTGATATACAAAAGGTT	27
CCNE2	NM_057749	S4945/CCNE2.p2	SEQ ID NO: 75	TACCAAGCAACCTACATGTCAAGAAAGCCC	30
CDC20	NM_001255	S4447/CDC20.f1	SEQ ID NO: 76	TGGATTGGAGTTCTGGGAATG	21
CDC20	NM_001255	S4448/CDC20.r1	SEQ ID NO: 77	GCTTGCACTCCACAGGTACACA	22
CDC20	NM_001255	S4449/CDC20.p1	SEQ ID NO: 78	ACTGGCCGTGGCACTGGACAACA	23
CDH1	NM_004360	S0073/CDH1.f3	SEQ ID NO: 79	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	21
CDH1	NM_004360	S0075/CDH1.r3	SEQ ID NO: 80	CAGCCGCTTTCAGATTTTCAT	21
CDH1	NM_004360	S4990/CDH1.p3	SEQ ID NO: 81	TGCCAATCCCGATGAAATTGGAAATTT	27
CEGP1	NM_020974	S1494/CEGP1.f2	SEQ ID NO: 82	TGACAATCAGCACACCTGCAT	21
CEGP1	NM_020974	S1495/CEGP1.r2	SEQ ID NO: 83	TGTGACTACAGCCGTGATCCTTA	23
CEGP1	NM_020974	S4735/CEGP1.p2	SEQ ID NO: 84	CAGGCCCTCTTCCGAGCGGT	20
CIAP1	NM_001166	S0764/CIAP1.f2	SEQ ID NO: 85	TGCCTGTGGTGGGAAGCT	18
CIAP1	NM_001166	S0765/CIAP1.r2	SEQ ID NO: 86	GGAAAATGCCTCCGGTGTT	19

ES 2 488 845 T3

CIAP1	NM_001166	S4802/CIAP1.p2	SEQ ID NO: 87	TGACATAGCATCATCCTTTGGTTCCAGTT	30
cMYC	NM_002467	S0085/eMYC.f3	SEQ ID NO: 88	TCCCTCCACTCGGAAGGACTA	21
cMYC	NM_002467	S0087/cMYC.r3	SEQ ID NO: 89	CGG1-7-GTTGCTGATCTGTCTCA	22
cMYC	NM_002467	S4994/cMYC.p3	SEQ ID NO: 90	TCTGACACTGTCCAACCTTGACCCTCTT	27
CTSL2	NM_001333	S4354/CTSL2.f1	SEQ ID NO: 91	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAA	21
CTSL2	NM_001333	S4355/CTSL2.r1	SEQ ID NO: 92	ACCATTGCAGCCCTGATTG	19
CTSL2	NM_001333	S4356/CTSL2.p1	SEQ ID NO: 93	CTTGAGGACGCGAACAGTCCACCA	24
DKFZp586M0723	AL050227	S4396/DKFZp5.f1	SEQ ID NO: 94	TCCATTTTCTACCTGTAAACCTTCATC	27
DKFZp586M0723	AL050227	S4397/DKFZp5.r1	SEQ ID NO: 95	ATGCAGTCGGTCCCTTCCT	19
DKFZp586M0723	AL050227	S4398/DKFZpS.p1	SEQ ID NO: 96	TTGCTTCCAGGGCCTGCACAAAA	23
DR5	NM_003842	S2551/DR5.f2	SEQ ID NO: 97	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACT	24
DR5	NM_003842	S2552/DR5.r2	SEQ ID NO: 98	CCATGAGGCCCAACTTCCT	19
DR5	NM_003842	S4979/DR5.p2	SEQ ID NO: 99	CAGACTTGGTGCCCTTTGACTCC	23
EpCAM	NM_002354	S1807/EpCAM.f1	SEQ ID NO: 100	GGGCCCTCCAGAACAATGAT	20
EpCAM	NM_002354	S1808/EpCAM.r1	SEQ ID NO: 101	TGCACTGCTTGGCCTTAAAGA	21
EpCAM	NM_002354	S4984/EpCAM.p1	SEQ ID NO: 102	CCGCTCTCATCGCAGTCAGGATCAT	25
EstR1	NM_000125	S0115/EstR1.f1	SEQ ID NO: 103	CGTGGTGCCCTCTATGAC	19
EstR1	NM_000125	S0111/EstR1.r1	SEQ ID NO: 104	GGCTAGTGGGCGCATGTAG	19
EstR1	NM_000125	S4737/EstR1.p1	SEQ ID NO: 105	CTGGAGATGCTGGACGCC	19
FGFR1	NM_023109	S0818/FGFR1.f3	SEQ ID NO: 106	CACGGGACATTACACATC	20
FGFR1	NM_023109	S0819/FGFR1.r3	SEQ ID NO: 107	GGGTGCCATCCACTTCACA	19
FGFR1	NM_023109	S4816/FGFR1.p3	SEQ ID NO: 108	ATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGC	27
FOXM1	NM_021953	S2006/FOXM1.f1	SEQ ID NO: 109	CCACCCGAGCAAATCTGT	19
FOXM1	NM_021953	S2007/FOXM1.r1	SEQ ID NO: 110	AAATCCAGTCCCCCTACTTTGG	22
FOXM1	NM_021953	S4757/FOXM1.p1	SEQ ID NO: 111	CCTGAATCCTGGAGGCTCACGCC	23
GRB7	NM_005310	S0130/GRB7.f2	SEQ ID NO: 112	ccatctgcatccatctgft	20
GRB7	NM_005310	S0132/GRB7.r2	SEQ ID NO: 113	ggccaccagggtattatctg	20
GRB7	NM_005310	S4726/GRB7.p2	SEQ ID NO: 114	ctccccacccttgagaagtgct	23
GSTM1	NM_000561	S2026/GSTM1.r1	SEQ ID NO: 115	GGCCCAGCTTGAATTTTCA	20
GSTM1	NM_000561	S2027/GSTM1.f1	SEQ ID NO: 116	AAGCTATGAGGAAAAGAAGTACACGAT	27
GSTM1	NM_000561	S4739/GSTM1.p1	SEQ ID NO: 117	TCAGCCACTGGCTTCTGTGATAATCAGGAG	30
GSTM3	NM_000849	S2038/GSTM3.f2	SEQ ID NO: 118	CAATGCCATCTTGCGCTACAT	21
GSTM3	NM_000849	S2039/GSTM3.r2	SEQ ID NO: 119	GTCCACTCGAATCTTTTCTTCTCA	25
GSTM3	NM_000849	S5064/GSTM3.p2	SEQ ID NO: 120	CTCGCAAGCACAAACATGTGTGGTGAGA	27
HER2	NM_004448	S0142/HER2.f3	SEQ ID NO: 121	CGGTGTGAGAAGTGACGCAA	20
HER2	NM_004448	S0144/HER2.r3	SEQ ID NO: 122	CCTCTCGCAAGTGCTCCAT	19
HER2	NM_004448	S4729/HER2.p3	SEQ ID NO: 123	CCAGACCATAGCACACTCGGGCAC	24
HNRPAB	NM_004499	S4510/HNRPAB.f3	SEQ ID NO: 124	CAAGGGAGCGACCAACTGA	19
HNRPAB	NM_004499	S4511/HNRPAB.r3	SEQ ID NO: 125	GTTTGCCAAGTTAAATTTGGTACATAAT	28
HNRPAB	NM_004499	S4512/HNRPAB.p3	SEQ ID NO: 126	CTCCATATCCAAACAAAGCATGTGTGCG	28
ID1	NM_002165	S0820/ID1.f1	SEQ ID NO: 127	AGAACCGCAAGGTGAGCAA	19
ID1	NM_002165	S0821/ID1.r1	SEQ ID NO: 128	TCCAACCTGAAGGTCCCTGATG	21

ES 2 488 845 T3

ID1	NM_002165	S4832/ID1.pi	SEQ ID NO: 129	TGGAGATTCTCCAGCACGTCATCGAC	26
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	SEQ ID NO: 130	GCATGGTAGCCGAAGATTTCA	21
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	SEQ ID NO: 131	TTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30
IGF1R	NM_000875	S4895/IGF1R.p3	SEQ ID NO: 132	CGCGTCATACCAAAATCTCCGATTTTGA	28
ITGA7	NM_002206	S0859/ITGA7.f1	SEQ ID NO: 133	GATATGATTGGTCGCTGCTTTG	22
ITGA7	NM_002206	S0920/ITGA7.r1	SEQ ID NO: 134	AGAACTTCCATTCCCCACCAT	21
ITGA7	NM_002206	S4795/ITGA7.p1	SEQ ID NO: 135	CAGCCAGGACCTGGCCATCCG	21
KI-67	NM_002417	S0436/KI-67.f2	SEQ ID NO: 136	CGGACTTTGGGTGCGACTT	19
KI-67	NM_002417	S0437/KI-67.r2	SEQ ID NO: 137	TTACAACCTCTTCCACTGGGACGAT	24
KI-67	NM_002417	S4741/KI-67.p2	SEQ ID NO: 138	CCACTTGTGCAACCACCGCTCGT	23
KLK10	NM_002776	S2624/KLK10.f3	SEQ ID NO: 139	GCCCAGAGGCTCCATCGT	18
KLK10	NM_002776	S2625/KLK10.r3	SEQ ID NO: 140	CAGAGGTTTGAACAGTGCAGACA	23
KLK10	NM_002776	S4978/KLK10.p3	SEQ ID NO: 141	CCTCTTCTCCCCAGTCGGCTGA	23
KNSL2	BC000712	S4432/KNSL2.f2	SEQ ID NO: 142	CCACCTCGCCATGATTTTTTC	20
KNSL2	BC000712	S4433/KNSL2.r2	SEQ ID NO: 143	GCAATCTCTTCAAACACTTCATCCT	25
KNSL2	BC000712	S4434/KNSL2.p2	SEQ ID NO: 144	TTTGACCGGGTATTCCCACCAGGAA	25
KRT5	NM_000424	S0175/KRT5.f3	SEQ ID NO: 145	tcagtgaggagaaggagtggga	20
KRT5	NM_000424	S0177/KRT5.r3	SEQ ID NO: 146	tgccatccagaggaaaca	20
KRT5	NM_000424	S5015/KRT5.p3	SEQ ID NO: 147	ccagtcacatctctgtgtcacaagca	28
LMNB1	NM_005573	S4477/LMNB1.f1	SEQ ID NO: 148	TGCAAACGCTGGTGTACACA	19
LMNB1	NM_005573	S4478/LMNB1.r1	SEQ ID NO: 149	CCCCACGAGTTCTGGTTCTTC	21
LMNB1	NM_005573	S4479/LMNB1.p1	SEQ ID NO: 150	CAGCCCCCAACTGACCTCATC	22
MCM2	NM_004526	S1602/MCM2.f2	SEQ ID NO: 151	GACTTTTGCCCGCTACCTTTC	21
MCM2	NM_004526	S1603/MCM2.r2	SEQ ID NO: 152	GCCACTAACTGCTTCAGTATGAAGAG	26
MCM2	NM_004526	S4900/MCM2.p2	SEQ ID NO: 153	ACAGCTCATTGTTGTACGCCGGA	24
MCM6	NM_005915	S1704/MCM6.f3	SEQ ID NO: 154	TGATGGTCCTATGTGTACATTCA	24
MCM6	NM_005915	S1705/MCM6.r3	SEQ ID NO: 155	TGGGACAGGAAACACACCAA	20
MCM6	NM_005915	S4919/MCM6.p3	SEQ ID NO: 156	CAGGTTTCATACCAACACAGGCTTCAGCAC	30
MELK	NM_014791	S4318/MELK.f1	SEQ ID NO: 157	AACCCGGCGATCGAAAAG	18
MELK	NM_014791	S4319/MELK.r1	SEQ ID NO: 158	GGGCCTGCTGTCTCTGAGA	18
MELK	NM_014791	S4320/MELK.p1	SEQ ID NO: 159	TCTTAGGAACGCCGTACCAGCCGC	24
MMP12	NM_002426	S4381/MMP12.f2	SEQ ID NO: 160	CCAACGCTTGCCAAATCCT	19
MMP12	NM_002426	S4382/MMP12.r2	SEQ ID NO: 161	ACGGTAGTGACAGCATCAAACTC	24
MMP12	NM_002426	S4383/MMP12.p2	SEQ ID NO: 162	AACCAGCTCTCTGTGACCCCAATT	24
MMP9	NM_004994	S0656/MMP9.f1	SEQ ID NO: 163	GAGAACCAATCTCACCGACA	20
MMP9	NM_004994	S0657/MMP9.r1	SEQ ID NO: 164	CACCCGAGTGTAACCATAGC	20
MMP9	NM_004994	S4760/MMP9.p1	SEQ ID NO: 165	ACAGGTATTCCTCTGCCAGCTGCC	24
MYBL2	NM_002466	S3270/MYBL2.f1	SEQ ID NO: 166	GCCGAGATCGCCAAGATG	18
MYBL2	NM_002466	S3271/MYBL2.r1	SEQ ID NO: 167	CTTTTGATGGTAGAGTCCAGTGATTC	27
MYBL2	NM_002466	S4742/MYBL2.p1	SEQ ID NO: 168	CAGCATTGTCTGTCTCCCTGGCA	24
NEK2	NM_002497	S4327/NEK2.f1	SEQ ID NO: 169	GTGAGGCAGCGCGACTCT	18
NEK2	NM_002497	S4328/NEK2.r1	SEQ ID NO: 170	TGCCAATGGTGTACAACACTTCA	23

ES 2 488 845 T3

NEK2	NM_002497	S4329/NEK2.p1	SEQ ID NO: 171	TGCCTTCCCGGGCTGAGGACT	21
NME1	NM_000269	S2526/NME1.f3	SEQ ID NO: 172	CCAACCCTGCAGACTCCAA	19
NME1	NM_000269	S2527/NME1.r3	SEQ ID NO: 173	ATGTATAATGTTCTGCAACTTGATG	28
NME1	NM_000269	S4949/NME1.p3	SEQ ID NO: 174	CCTGGGACCATCCGTGGAGACTTCT	25
NPD009	NM_020686	S4474/NPD009.f3	SEQ ID NO: 175	GGCTGTGGCTGAGGCTGTAG	20
NPD009	NM_020686	S4475/NPD009.r3	SEQ ID NO: 176	GGAGCATTGAGGTCAAATCA	21
NPD009	NM_020686	S4476/NPD009.p3	SEQ ID NO: 177	TCCCAGAGTGTCTCACCTCCAGCAGAG	28
PCNA	NM_002592	S0447/PCNA.f2	SEQ ID NO: 178	GAAGGTGTTGGAGGCACTCAAG	22
PCNA	NM_002592	S0448/PCNA.r2	SEQ ID NO: 179	GGTTTACACCGCTGGAGCTAA	21
PCNA	NM_002592	S4784/PCNA.p2	SEQ ID NO: 180	ATCCCAGCAGGCCTCGTTGATGAG	24
PR	NM_000926	S1336/PR.f6	SEQ ID NO: 181	GCATCAGGCTGTCAATTATGG	20
PR	NM_000926	S1337/PR.r6	SEQ ID NO: 182	AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC	20
PR	NM_000926	S4743/PR.p6	SEQ ID NO: 183	TGTCCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTC	28
PREP	NM_002726	S1771/PREP.f1	SEQ ID NO: 184	GGGACGGTGTTACATTCAAG	21
PREP	NM_002726	S1772/PREP.r1	SEQ ID NO: 185	CAGGATCCCAGAAGTCAATGTTG	23
PREP	NM_002726	S4929/PREP.p1	SEQ ID NO: 186	TCGCCAGTCTCCCACTATCGCGT	24
PTTG1	NM_004219	S4525/PTTG1.f2	SEQ ID NO: 187	GGCTACTCTGATCTATGTTGATAAGGAA	28
PTTG1	NM_004219	S4526/PTTG1.r2	SEQ ID NO: 188	GCTTCAGCCCATCCTTAGCA	20
PTTG1	NM_004219	S4527/PTTG1.p2	SEQ ID NO: 189	CACACGGGTGCCTGGTTCTCCA	22
RPLPO	NM_001002	S0256/RPLPO.f2	SEQ ID NO: 190	CCATTCTATCATCAACGGGTACAA	24
RPLPO	NM_001002	S0258/RPLPO.r2	SEQ ID NO: 191	TCAGCAAGTGGGAAGGTGTAATC	23
RPLPO	NM_001002	S4744/RPLPO.p2	SEQ ID NO: 192	TCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCG	25
SNRPF	NM_003095	S4489/SNRPF.f2	SEQ ID NO: 193	GGCTGGTCGGCAGAGAGTAG	20
SNRPF	NM_003095	S4490/SNRPF.r2	SEQ ID NO: 194	TGAGGAAAGGTTTGGGATTGA	21
SNRPF	NM_003095	S4491/SNRPF.p2	SEQ ID NO: 195	AAACTCATGTAAACCACGCCGAATGTTG	29
Src	NM_004383	S1820/Src.f2	SEQ ID NO: 196	CCTGAACATGAAGGAGCTGA	20
Src	NM_004383	S1821/Src.r2	SEQ ID NO: 197	CATCACGTCTCCGAAGTCC	19
Src	NM_004383	S5034/Src.p2	SEQ ID NO: 198	TCCCGATGGTCTGCAGCAGCT	21
STK15	NM_003600	S0794/STK15.f2	SEQ ID NO: 199	CATCTTCCAGGAGGACCACT	20
STK15	NM_003600	S0795/STK15.r2	SEQ ID NO: 200	TCCGACCTTCAATCATTTCA	20
STK15	NM_003600	S4745/STK15.p2	SEQ ID NO: 201	CTCTGTGGCACCCTGGACTACCTG	24
STMY3	NM_005940	S2067/STMY3.f3	SEQ ID NO: 202	CCTGGAGGCTGCAACATACC	20
STMY3	NM_005940	S2068/STMY3.r3	SEQ ID NO: 203	TACAAATGGCTTTGGAGGATAGCA	23
STMY3	NM_005940	S4746/STMY3.p3	SEQ ID NO: 204	ATCCTCCTGAAGCCCTTTTCGCAGC	25
SURV	NM_001168	S02591/SURV.f2	SEQ ID NO: 205	TGTTTTGATTCCCGGGCTTA	20
SURV	NM_001168	S0261/SURV.r2	SEQ ID NO: 206	CAAAGCTGTCAGCTCTAGCAAAG	24
SURV	NM_001168	S4747/SURV.p2	SEQ ID NO: 207	TGCCTTCTTCTCCTCACTTCTCACCT	28
TFRC	NM_003234	S1352/TFRC.f3	SEQ ID NO: 208	GCCAAGTGTCTTCATTTGTG	20
TFRC	NM_003234	S1353/TFRC.r3	SEQ ID NO: 209	ACTCAGGCCCATTTCTTTA	20
TFRC	NM_003234	S4748/TFRC.p3	SEQ ID NO: 210	AGGGATCTGAACCAATACAGAGCAGACA	28
TOP2A	NM_001067	S02711/TOP2A.f4	SEQ ID NO: 211	AATCCAAGGGGAGAGTGAT	20
TOP2A	NM_001067	S0273/TOP2A.r4	SEQ ID NO: 212	GTACAGATTTTGCCCGAGGA	20

TOP2A	NM_001067	S4777/TOP2A.p4	SEQ ID NO: 213	CATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGC	26
TS	NM_001071	S0280/TS.f1	SEQ ID NO: 214	GCCTCGGTGTGCCTTTCA	18
TS	NM_001071	S0282/TS.r1	SEQ ID NO: 215	CGTGATGTGCGCAATCATG	19
TS	NM_001071	S4780/TS.p1	SEQ ID NO: 216	CATCGCCAGCTACGCCCTGCTC	22

Lista de secuencias

5 <110> BAKER, Joffre BRYANT, John L. PAIK, Soonmyung SHAK, Steven
 <120> Predicción de la probabilidad de recidiva de cáncer
 <130> 39740-0012 US
 <140> por asignar
 <141> 17-06-2004
 <150> Documento US 60/482.339
 10 <151> 24-06-2003
 <160> 216
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
 <210> 1
 <211> 80
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 1
 ggctcttgtg cgtactgtcc ttcgggctgg tgacagggaa gacatcactg agcctgccat 60
 20 ctgtgctctt cgtcatctga 80
 <210> 2
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 2
 cgttgctcagc acttggaata caagatgggt gccgggtcat gttaattggg aaaaagaaca 60
 gtccacagga agagggtgaa c 81
 <210> 3
 30 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 35 <400> 3
 cctgcaaaag ggaacaagag cccttcgcct ccagatggct cccctgccgc ccccccgag 60
 atcagagtca accacg 76
 <210> 4
 <211> 68
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 4
 ccgagggttaa tccagcacgt atggggccaa gtgtaggctc ccagcaggaa ctgagagcgc 60
 catgtctt 68
 45 <210> 5
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Amplicón de PCR
 <400> 5
 tcagctgtga gctgcggata ccgcccggca atgggacctg ctcttaacct caaacctagg 60
 accgt 65
 <210> 6

<211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Amplicón de PCR
 <400> 6
 ttcagggttgt tgcaggagac catgtacatg actgtctcca ttattgatcg gttcatgcag 60
 aataattgtg tgcccaagaa gatg 84
 <210> 7
 <211> 82
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 7
 atgctgtggc tccttcctaa ctggggcctt cttgacatgt aggttgcttg gtaataacct 60
 ttttgtatat cacaatttgg gt 82
 <210> 8
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 8
 tggattggag ttctgggaat gtactggccg tggcactgga caacagtgtg tacctgtgga 60
 gtgcaagc 68
 <210> 9
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 30 <400> 9
 tgagtgtccc ccggtatctt ccccgccctg ccaatcccga tgaaattgga aattttattg 60
 atgaaaatct gaaagcggct g 81
 <210> 10
 <211> 77
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 10
 tgacaatcag cacacctgca ttcaccgctc ggaagagggc ctgagctgca tgaataagga 60
 tcacggctgt agtcaca 77
 <210> 11
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Amplicón de PCR
 <400> 11
 tgcctgtggt gggaagctca gtaactggga accaaaggat gatgctatgt cagaacaccg 60
 gaggcatttt cc 72
 <210> 12
 <211> 84
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 12
 tccctccact cggaaggact atcctgctgc caagagggtc aagttggaca gtgtcagagt 60
 cctgagacag atcagcaaca accg 84
 <210> 13
 <211> 67

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 5 <400> 13
tgtctcactg agcgagcaga atctggtgga ctgttcgcgt cctcaaggca atcagggctg 60
caatggt 67
 <210> 14
 <211> 74
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 14
tccattttct acctgttaac cttcatcatt ttgtgcaggc cctggaagca aagagaggaa 60
gggaccgact gcat 74
 <210> 15
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 20 <400> 15
ctctgagaca gtgcttcgat gactttgcag acttggtgcc ctttgactcc tgggagccgc 60
tcatgaggaa gttgggcctc atgg 84
 <210> 16
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 30 <400> 16
gggccctcca gaacaatgat gggctttatg atcctgactg cgatgagagc gggctcttta 60
aggccaagca gtgca 75
 <210> 17
 <211> 68
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 17
cgtggtgccc ctctatgacc tgctgctgga gatgctggac gccaccgcc tacatgcgcc 60
cactagcc 68
 <210> 18
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 45 <400> 18
cacgggacat tcaccacatc gactactata aaaagacaac caacggccga ctgcctgtga 60
agtggatggc accc 74
 <210> 19
 <211> 82
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 19
ccaccccgag caaatctgtc ctccccagaa cccctgaatc ctggaggctc acgccccag 60
ccaaagtagg gggactggat tt 82
 <210> 20
 <211> 67

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 5 <400> 20
 ccattctgcat ccattctgtt tgggctcccc acccttgaga agtgcctcag ataataccct 60
 ggtggcc 67
 <210> 21
 <211> 86
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 21
 aagctatgag gaaaagaagt acacgatggg ggacgctcct gattatgaca gaagccagtg 60
 gctgaatgaa aaattcaagc tgggcc 86
 <210> 22
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 20 <400> 22
 caatgccatc ttgcgctaca tcgctcgcaa gcacaacatg tgtggtgaga ctgaagaaga 60
 aaagattcga gtggac 76
 <210> 23
 <211> 70
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 23
 cgggtgtgaga agtgcagcaa gccctgtgcc cgagtgtgct atggtctggg catggagcac 60
 30 ttgcgagagg 70
 <210> 24
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 24
 caagggagcg accaactgat cgcacacatg ctttgtttgg atatggagtg aacacaatta 60
 40 tgtaccaaatt ttaacttggc aaac 84
 <210> 25
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 45 <400> 25
 agaaccgcaa ggtgagcaag gtggagattc tccagcacgt catcgactac atcagggacc 60
 50 ttcagttgga 70
 <210> 26
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 26
 gcatggtagc cgaagatttc acagtcaaaa tcggagattt tggatatgacg cgagatatct 60
 55 atgagacaga ctattaccgg aaa 83
 <210> 27
 <211> 79
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 27
 5 gatatgattg gtcgctgctt tgtgctcagc caggacctgg ccatccggga tgagttggat 60
 ggtggggaat ggaagttct 79
 <210> 28
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 28
 cggactttgg gtgcgacttg acgagcgggtg gttcgacaag tggccttgcg ggccggatcg 60
 tcccagtgga agagttgtaa 80
 <210> 29
 15 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 20 <400> 29
 gcccagaggc tccatcgctc atcctcttcc tcccagtcg gctgaactct ccccttgctc 60
 gcactgttca aacctctg 78
 <210> 30
 <211> 77
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 30
 ccacctcgcc atgatttttc ctttgaccgg gtattccac caggaagtgg acaggatgaa 60
 gtgtttgaag agattgc 77
 30 <210> 31
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Amplicón de PCR
 <400> 31
 tcagtggaga aggagttgga ccagtcaaca tctctgttgt cacaagcagt gtttcctctg 60
 gatattggca 69
 <210> 32
 <211> 66
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 32
 tgcaaacgct ggtgtcacag ccagcccccc aactgacctc atctggaaga accagaactc 60
 gtgggg 66
 <210> 33
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 33
 gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat gagctgttgc tcttcatact 60
 gaagcagtta gtggc 75
 <210> 34
 55 <211> 82
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 34
 5 **tgatggtcct atgtgtcaca ttcattcacag gtttcataacc aacacaggct tcagcacttc** 60
 ctttgggtgtg tttcctgtcc ca 82
 <210> 35
 <211> 65
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 35
 aacccggcga tcgaaaagat tcttaggaac gccgtaccag ccgcgtctct caggacagca 60
 ggccc 65
 <210> 36
 15 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 20 <400> 36
 ccaacgcttg ccaaattcctg acaattcaga accagctctc tgtgacccca atttgagttt 60
 tgatgctgtc actaccgt 78
 <210> 37
 <211> 67
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 37
 gagaaccaat ctcaccgaca ggcagctggc agaggaatac ctgtaccgct atggttacac 60
 tcgggtg 67
 <210> 38
 30 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Amplicón de PCR
 <400> 38
 gccgagatcg ccaagatggt gccagggagg acagacaatg ctgtgaagaa tcaactggaac 60
 tctaccatca aaag 74
 <210> 39
 <211> 79
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 39
 gtgaggcagc gcgactctgg cgactggccg gccatgcctt cccgggctga ggactatgaa 60
 45 **gtgttgatca ccattggca** 79
 <210> 40
 <211> 74
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 40
 ccaaccctgc agactccaag cctggggacca tccgtggaga cttctgcata caagttggca 60
 ggaacattat acat 74
 <210> 41
 55 <211> 73
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 41
 5 ggctgtggct gaggctgtag catctctgct ggagggtgaga cactctggga actgatttga 60
 cctcgaatgc tcc 73
 <210> 42
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 42
 gaagggtgttg gaggcactca aggacctcat caacgaggcc tgctgggata ttagctccag 60
 cgggtgtaaac c 71
 <210> 43
 15 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 20 <400> 43
 gcatcaggct gtcattatgg tgtccttacc tgtgggagct gtaaggctctt cttaagagg 60
 gcaatggaag ggcagcaca ctact 85
 <210> 44
 <211> 76
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 44
 gggacgggtgt tcacattcaa gacgaatcgc cagtctccca actatcgcgt gatcaacatt 60
 gacttctggg atcctg 76
 30 <210> 45
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Amplicón de PCR
 <400> 45
 ggctactctg atctatgttg ataaggaaaa tggagaacca ggcacccgtg tggttgctaa 60
 ggatgggctg aagc 74
 <210> 46
 <211> 75
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 46
 ccattctatc atcaacgggt acaaacgagt cctggccttg tctgtggaga cggattacac 60
 cttccactt gctga 75
 <210> 47
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 47
 ggctggtcgg cagagagtag cctgcaacat tcggccgtgg ttacatgag ttaccacctc 60
 aatcccaaac ctttctca 79
 <210> 48
 55 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 48
 cctgaacatg aaggagctga agctgctgca gaccatcggg aagggggagt tcggagacgt 60
 gatg 64
 5 <210> 49
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Amplicón de PCR
 <400> 49
 catcttccag gaggaccact ctctgtggca ccctggacta cctgccccct gaaatgattg 60
 aaggtcgga 69
 <210> 50
 <211> 90
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 50
 cctggagggt gcaacatacc tcaatcctgt cccaggccgg atcctcctga agcccttttc 60
 gcagcactgc taccctccaa agccattgta 90
 <210> 51
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 51
 tgttttgatt cccgggctta ccagggtgaga agtgaggag gaagaaggca gtgtcccttt 60
 tgctagagct gacagcttg 79
 <210> 52
 30 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 35 <400> 52
 gccaaactgct ttcatttgtg agggatctga accaatacag agcagacata aaggaaatgg 60
 gcctgagt 68
 <210> 53
 <211> 72
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Amplicón de PCR
 <400> 53
 aatccaaggg ggagagtgat gacttccata tggactttga ctgagctgtg gctcctcggg 60
 caaaatctgt ac 72
 <210> 54
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Amplicón de PCR
 <400> 54
 gcctcgggtg gcctttcaac atcgccagct acgccctgct cacgtacatg attgcgcaca 60
 tcacg 65
 <210> 55
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 55
 ggctctgtg cgtactgtcc tt 22
 <210> 56
 5 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 10 <400> 56
 tcagatgacg aagagcacag atg 23
 <210> 57
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 57
 aggctcagtg atgtctccc tgcaccag 29
 20 <210> 58
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 58
 cgtgtgcagc acttgaata caa 23
 <210> 59
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 59
 35 gttcaacctc ttctgtgga ctgt 24
 <210> 60
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 60
 cccaattaac atgacccggc aaccat 26
 <210> 61
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 50 <400> 61
 cctgcaaaag ggaacaagag 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 62
 cgtggtgac tctgatctcg 20
 60 <210> 63
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 63

cttcgcctcc agatggctcc c 21
 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 64
 ccgagggttaa tccagcacgt a 21
 10 <210> 65
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 65
 aagacatggc gctctcagtt c 21
 <210> 66
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 66
 25 tgctgggagc ctacactgg ccc 23
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 67
 tcagctgtga gctgcggata 20
 <210> 68
 35 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 40 <400> 68
 acggtcctag gttgaggtt aaga 24
 <210> 69
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 69
 caggtcccat tgccgggcg 19
 50 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 70
 ttcaggttgt tgcaggagac 20
 <210> 71
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 71
 65 catcttcttg ggcacacaat 20
 <210> 72

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 72
 tgtctccatt attgatcggt tcatgca 27
 <210> 73
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 73
 15 atgctgtggc tccttcctaa ct 22
 <210> 74
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 74
 acccaaattg tgatatacaa aaaggtt 27
 <210> 75
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 30 <400> 75
 taccaagcaa cctacatgct aagaaagccc 30
 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 76
 tggattggag ttctgggaat g 21
 40 <210> 77
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 77
 gcttgactc cacaggtaca ca 22
 <210> 78
 <211> 23
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 78
 55 actggccgtg gcactggaca aca 23
 <210> 79
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 79
 tgagtgtccc ccggtatctt c 21
 <210> 80
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 80
 5 cagccgcttt cagatttca t 21
 <210> 81
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 81
 tgccaatccc gatgaaattg gaaattt 27
 <210> 82
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 20 <400> 82
 tgacaatcag cacacctgca t 21
 <210> 83
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 83
 tgtgactaca gccgtgatcc tta 23
 30 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 84
 caggccctct tccgagcgg 20
 <210> 85
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 85
 45 tgcctgtggt gggaagct 18
 <210> 86
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 86
 ggaaaatgcc tccggtgtt 19
 <210> 87
 55 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 60 <400> 87
 tgacatagca tcatccttg gttcccagtt 30
 <210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 88
 tccctccact cggaaggact a 21
 <210> 89
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 10 <400> 89
 cggttgttc tgatctgtct ca 22
 <210> 90
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 90
 tctgacactg tccaactga ccctctt 27
 20 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 91
 tgtctcactg agcgagcaga a 21
 <210> 92
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 92
 35 accattgcag ccctgattg 19
 <210> 93
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 93
 ctgaggacg cgaacagtcc acca 24
 <210> 94
 45 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 50 <400> 94
 tccattttct acctgttaac ctcatc 27
 <210> 95
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 95
 atgcagtcgg tcccttct 19
 60 <210> 96
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 96

ttgcttcag gccctgcaca aaa 23
 <210> 97
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 97
 ctctgagaca gtgcttcgat gact 24
 10 <210> 98
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 98
 ccatgaggcc caacttcct 19
 <210> 99
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 99
 25 cagacttgtt gcccttgac tcc 23
 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 100
 gggccctcca gaacaatgat 20
 <210> 101
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 40 <400> 101
 tgcactgctt ggccttaaag a 21
 <210> 102
 <211> 25
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 102
 ccgctctcat cgcagtcagg atcat 25
 50 <210> 103
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 103
 cgtggtgccc ctctatgac 19
 <210> 104
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 104
 65 ggctagtggg cgcattgat 19
 <210> 105

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 105
 ctggagatgc tggacgccc 19
 <210> 106
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 106
 15 cacgggacat tcaccacatc 20
 <210> 107
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 107
 gggtgccatc cacttcaca 19
 <210> 108
 25 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 30 <400> 108
 ataaaaagac aaccaacggc cgactgc 27
 <210> 109
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 109
 ccaccccgag caaatctgt 19
 40 <210> 110
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 110
 aaatccagtc ccctacttt gg 22
 <210> 111
 <211> 23
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 111
 55 cctgaatcct ggaggctcac gcc 23
 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 112
 ccatctgcat ccatcttgtt 20
 <210> 113
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 113
 5 ggccaccagg gtattatctg 20
 <210> 114
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 114
 ctccccaccc ttgagaagt cct 23
 <210> 115
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 20 <400> 115
 ggcccagctt gaattttca 20
 <210> 116
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 116
 aagctatgag gaaaagaagt acacgat 27
 30 <210> 117
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 117
 tcagccactg gcttctgtca taatcaggag 30
 <210> 118
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 118
 45 caatgccatc ttgcgctaca t 21
 <210> 119
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 119
 gtccactcga atcttttctt ctca 25
 <210> 120
 55 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 60 <400> 120
 ctcgcaagca caacatgtgt ggtgaga 27
 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 121
 cgggtgtgaga agtgcagcaa 20
 <210> 122
 5 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 10 <400> 122
 cctctcgcaa gtgctccat 19
 <210> 123
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 123
 ccagaccata gcacactcgg gcac 24
 20 <210> 124
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 124
 caaggagcg accaactga 19
 <210> 125
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 125
 35 gtttgccaag ttaaatttg tacataat 28
 <210> 126
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 126
 ctccatatcc aaacaaagca tgtgtgcg 28
 <210> 127
 45 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 50 <400> 127
 agaaccgcaa ggtgagcaa 19
 <210> 128
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 128
 tccaactgaa ggtccctgat g 21
 60 <210> 129
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 129

tggagattct ccagcacgtc atcgac 26
 <210> 130
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 130
 gcatggtagc cgaagatttc a 21
 10 <210> 131
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 131
 ttcccggtaa tagtctgtct catagatatc 30
 <210> 132
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCRs
 <400> 132
 25 cgcgtcatac caaaatctcc gatttga 28
 <210> 133
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 133
 gatatgattg gtcgctgctt tg 22
 <210> 134
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 40 <400> 134
 agaactcca ttccccacca t 21
 <210> 135
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 135
 cagccaggac ctggccatcc g 21
 50 <210> 136
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 136
 cggactttgg gtgcgactt 19
 <210> 137
 <211> 24
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 137
 65 ttacaactct tccactggga cgat 24
 <210> 138

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 138
 ccactgtcg aaccaccgct cgt 23
 <210> 139
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 139
 15 gccagaggc tccatcgt 18
 <210> 140
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 140
 cagaggttg aacagtgcag aca 23
 <210> 141
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 30 <400> 141
 cctctctc cccagtcggc tga 23
 <210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 142
 ccacctgcc atgattttc 20
 40 <210> 143
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 143
 gcaatctct caaacacttc atcct 25
 <210> 144
 <211> 25
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 144
 55 ttgaccggg tattcccacc aggaa 25
 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 145
 tcagtggaga aggagttgga 20
 <210> 146
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 146
 5 tgccatatcc agaggaaaca 20
 <210> 147
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 147
 ccagtcaaca tctctgtgt cacaagca 28
 <210> 148
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 20 <400> 148
 tgcaaacgct ggtgtcaca 19
 <210> 149
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 149
 ccccacgagt tctggtctt c 21
 30 <210> 150
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 150
 cagcccccca actgacctca tc 22
 <210> 151
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 151
 45 gacttttgcc cgctacctt c 21
 <210> 152
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 152
 gccactaact gttcagtat gaagag 26
 <210> 153
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 60 <400> 153
 acagtcatt gttgtcacgc cgga 24
 <210> 154
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 154
 tgatggtcct atgtgtcaca ttca 24
 <210> 155
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 10 <400> 155
 tgggacagga aacacaccaa 20
 <210> 156
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 156
 caggttcat accaacacag gcttcagcac 30
 20 <210> 157
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 157
 aacccggcga tcgaaaag 18
 <210> 158
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 158
 35 gggcctgctg tcctgaga 18
 <210> 159
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 159
 tcttaggaac gccgtaccag ccgc 24
 <210> 160
 45 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 50 <400> 160
 ccaacgcttg ccaaattcct 19
 <210> 161
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 161
 acggtagtga cagcatcaaa actc 24
 60 <210> 162
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 162

aaccagctct ctgtgacccc aatt 24
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 163
 gagaaccaat ctcaccgaca 20
 10 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 164
 caccgcgagtg taaccatagc 20
 <210> 165
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 165
 25 acaggtattc ctctgccagc tgcc 24
 <210> 166
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 166
 gccgagatcg ccaagatg 18
 <210> 167
 35 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 40 <400> 167
 cttttgatgg tagagttcca gtgattc 27
 <210> 168
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 168
 cagcattgtc tgcctccct ggca 24
 50 <210> 169
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 169
 gtgaggcagc gcgactct 18
 <210> 170
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 170
 65 tgccaatgggt gtacaacact tca 23
 <210> 171

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 171
 tgccttcccg ggctgaggac t 21
 <210> 172
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 172
 15 ccaaccctgc agactcaa 19
 <210> 173
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 173
 atgtataatg ttctgcca ctgtatg 28
 <210> 174
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 30 <400> 174
 cctgggacca tccgtggaga ctct 25
 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 175
 ggctgtggct gaggctgtag 20
 40 <210> 176
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 176
 ggagcattcg aggtcaaac a 21
 <210> 177
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 177
 55 ttccagagt gtctacctc cagcagag 28
 <210> 178
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 178
 gaaggtgttg gaggcactca ag 22
 <210> 179
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 179
 5 ggtttacacc gctggagcta a 21
 <210> 180
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 180
 atcccagcag gcctcgttga tgag 24
 <210> 181
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 20 <400> 181
 gcatcaggct gtcattatgg 20
 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 182
 agtagttgtg ctgcccttc 20
 30 <210> 183
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 183
 tgtccttacc tgtgggagct gtaaggct 28
 <210> 184
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 184
 45 gggacggtgt tcacattcaa g 21
 <210> 185
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 185
 caggatccca gaagtcaatg ttg 23
 <210> 186
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 60 <400> 186
 tcgccagtct cccaactatc gcgt 24
 <210> 187
 <211> 28
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 187
 ggctactctg atctatgttg ataaggaa 28
 <210> 188
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 10 <400> 188
 gcttcagccc atccttagca 20
 <210> 189
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 189
 cacacgggtg cctggtctc ca 22
 20 <210> 190
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 190
 ccattctatc atcaacgggt acaa 24
 <210> 191
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 191
 35 tcagcaagtg ggaaggtga atc 23
 <210> 192
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 192
 tctccacaga caaggccagg actcg 25
 <210> 193
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 50 <400> 193
 ggctggtcgg cagagagtag 20
 <210> 194
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 194
 tgaggaaagg ttgggattg a 21
 60 <210> 195
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 195

aaactcatgt aaaccacggc cgaatgtg 29
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 196
 cctgaacatg aaggagctga 20
 10 <210> 197
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 197
 catcacgtct ccgaactcc 19
 <210> 198
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 198
 25 tcccgatggt ctgcagcagc t 21
 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 199
 catcttccag gaggaccact 20
 <210> 200
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 40 <400> 200
 tccgaccttc aatcatttca 20
 <210> 201
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 201
 ctctgtggca ccctggacta cctg 24
 50 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 202
 cctggaggct gcaacatacc 20
 <210> 203
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 203
 65 tacaatggct ttggaggata gca 23
 <210> 204

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 204
 atcctcctga agccctttc gcagc 25
 <210> 205
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 205
 15 tgttttgatt cccgggctta 20
 <210> 206
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 206
 caaagctgtc agctctagca aaag 24
 <210> 207
 25 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 30 <400> 207
 tgccttcttc ctccctcact tctcacct 28
 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 208
 gccaaactgct ttcatttgat 20
 40 <210> 209
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 209
 actcaggccc attccttta 20
 <210> 210
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 210
 55 agggatctga accaatacag agcagaca 28
 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 211
 aatccaaggg ggagagtgat 20
 <210> 212
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 212
 5 gtacagattt tgcccgagga 20
 <210> 213
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 213
 catatggact ttgactcagc tgtggc 26
 <210> 214
 15 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 20 <400> 214
 gcctcgggtgt gccttca 18
 <210> 215
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 215
 cgtgatgtgc gcaatcatg 19
 30 <210> 216
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador-sonda de PCR
 <400> 216
 catcgccagc tacgccctgc tc 22

REIVINDICACIONES

1. Método de predicción de la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad de un paciente con cáncer de mama ductal invasivo, de ganglios negativos, positivo para ER, que comprende determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN de STMY3 en una muestra de célula o tejido de cáncer de mama obtenida del paciente, normalizado frente al nivel de expresión de un conjunto de referencia de transcritos de ARN, comparar el nivel de expresión normalizado de STMY3 del paciente con un nivel de expresión normalizado de STMY3 en un conjunto de referencia de tejido de cáncer de mama que comprende pacientes que (a) estaban vivos sin recidiva de cáncer de mama local, regional o distante, (b) estaban vivos con recidiva de cáncer de mama contralateral, (c) estaban vivos con un segundo cáncer primario distinto de mama, o (d) murieron antes de la recidiva de cáncer de mama, en el que un nivel de expresión normalizado aumentado de STMY3 del paciente indica una probabilidad reducida de supervivencia libre de enfermedad.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ARN comprende ARN intrónico.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho ARN se aísla de una muestra de tejido de cáncer de mama incrustada en cera, fijado, de dicho paciente.
4. Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que dicho ARN se aísla de tejido de biopsia con aguja gruesa.
5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho ARN se aísla de células de aspirado con aguja fina.
6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el nivel de expresión de dicho transcrito de ARN se determina mediante el uso de una matriz que comprende un polinucleótido que se hibrida con el gen inmovilizado sobre una superficie sólida.
7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el nivel de expresión de dicho transcrito de ARN se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).
8. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN está fragmentado.
9. Método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además crear un informe que resume los datos obtenidos mediante dicho análisis de expresión génica.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el informe incluye una predicción de la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad.
11. Método según la reivindicación 9 ó 10, en el que el informe incluye una recomendación para una modalidad de tratamiento de dicho paciente.