

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 382**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2006 E 06735413 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1853729**

54 Título: **Métodos y sondas para detectar cáncer de esófago**

30 Prioridad:

18.02.2005 US 654742 P

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

09.02.2015

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (50.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US y
MAYO MEDICAL VENTURES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HALLING, KEVIN;
MORRISON, LARRY E. y
BRANKLEY, SHANNON**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 528 382 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

Métodos y sondas para detectar cáncer de esófago

Antecedentes de la invención

5 Se estima que durante el año 2004 habrá en los Estados Unidos 14.250 nuevos casos de cáncer de esófago y aproximadamente 13.300 muertes por cáncer de esófago. Aproximadamente el 80% de estos tumores serán adenocarcinoma esofágico (AE) y el 20% restante será carcinoma de células escamosas. La mayoría, si no todos, los AE se cree que surgen en pacientes con esófago de Barrett (EB), una afección preneoplásica causada por metaplasia de la mucosa escamosa normal del esófago distal, en mucosa intestinal especializada que contiene células caliciformes. El EB está causado por una enfermedad crónica por reflujo gastroesofágico (ERGE), un trastorno que afecta a más de 20 millones de estadounidenses cada día. De seis a catorce por ciento de las personas con ERGE crónica desarrollará EB. La incidencia de AE en pacientes con EB se ha notificado que es aproximadamente del 0,5% -1,0% por año y el riesgo de por vida de cáncer para los pacientes con EB es aproximadamente del 5%.

15 Las etapas histológicas que conducen al adenocarcinoma de esófago en pacientes con EB son las siguientes: 1) metaplasia intestinal (MI) del epitelio escamoso estratificado normal, 2) displasia de bajo grado (DBG), 3) displasia de alto grado (DAG) y 4) AE. Los pacientes con diagnóstico de EB deberían someterse a una vigilancia regular para el desarrollo de lesiones neoplásicas, incluyendo DBG, DAG y AE. Los pacientes con AE y DAG deben ser tratados de forma agresiva, ya sea con esofagectomía distal o terapias desarrolladas más recientemente, como la terapia fotodinámica u otras técnicas de ablación para prevenir la progresión a enfermedad metastásica e incurable. Los pacientes con DBG tienen el riesgo de evolucionar a DAG y, por lo tanto, requieren una vigilancia regular, pero no una esofagectomía. La supervivencia general de 5 años para los pacientes con AE es solo del 20%. Será necesaria una detección temprana y precisa y un tratamiento de los precursores neoplásicos de AE (es decir, MI, DBG y DAG) si va a haber un aumento en la tasa de supervivencia de pacientes con neoplasia asociada a EB.

25 Los resultados histológicos se consideran actualmente como la regla de oro para determinar si un paciente tiene displasia y/o AE. Actualmente se recomienda que en los pacientes con EB se vigile el desarrollo de DAG y AE mediante la realización de exámenes endoscópicos regulares del esófago y la obtención de biopsias en cuatro cuadrantes para cada 1-2 cm de esófago afectado. Sin embargo, esta recomendación no se sigue con frecuencia, debido principalmente a se requiere mucho tiempo para llevar a cabo este procedimiento, especialmente en pacientes con EB de segmento largo. Los problemas asociados con el uso de biopsias para el seguimiento del desarrollo de neoplasias en pacientes con Barrett, incluyen: 1) toma de muestras limitada de la mucosa afectada, 2) imposibilidad de tomar biopsias en cuatro cuadrantes cada 1-2 cm, y 3) mala reproducibilidad entre observadores de patologías para el diagnóstico de DBG y DAG. Se ha estimado que los protocolos de vigilancia endoscópica que utilizan biopsias en cuatro cuadrantes cada cm, solo toman muestras de aproximadamente el 1-2% de la mucosa afectada. Esta limitación de la toma de muestras puede dar lugar a resultados patológicos falsos negativos o una infraestadificación (p. ej., resultados patológicos que muestran solamente MI o DBG en un paciente que tiene DAG o AE). Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar los métodos y las composiciones para distinguir un paciente con DAG y AE de un paciente con DBG + MI + normal y un paciente con DBG de uno normal + MI.

40 Por ejemplo, Fahmy et al. (Modern Pathology: una revista oficial de la Academia de Patología de los Estados Unidos y Canadá, vol. 17, mayo 2004, páginas 588-596) describe el uso de FISH en muestras citológicas, es decir, biopsia de esófago de Barrett obtenida mediante citología endoscópica convencional por cepillado, utilizando sondas específicas del locus (LSI) para los loci 9p21 (gen p16) y 17p13.1 (gen p53), junto con su correspondiente CEP para diferenciar el esófago de Barrett con DAG/adenocarcinoma intramucoso de aquellos sin displasia.

Compendio de la invención

45 Es un objeto de la invención proporcionar un método como se define en la reivindicación 1, para la detección en un sujeto de un carcinoma de esófago o una lesión precursora. El método implica el uso de hibridación *in situ* para detectar anomalías cromosómicas asociadas con un carcinoma de esófago o una lesión precursora. En este método, un conjunto de sondas de ácidos nucleicos marcadas se hibridan con células esofágicas en una muestra para detectar selectivamente en la muestra un carcinoma de esófago y/o una lesión precursora. El patrón de hibridación de las sondas se evalúa entonces y a continuación se correlaciona con la presencia o ausencia de un carcinoma de esófago y/o una lesión precursora.

55 También se describe en el presente documento un conjunto de sondas de ácido nucleico para uso en el método de la presente invención. El conjunto de sondas se caracteriza por la capacidad de detectar selectivamente un carcinoma de esófago y/o una lesión precursora en la muestra biológica. El conjunto comprende sondas cromosómicas complementarias a regiones diana que son portadoras de anomalías cromosómicas asociadas con una displasia de bajo grado (DBG) o displasia de alto grado (DAG) y adenocarcinoma de esófago (AE). Se pueden utilizar conjuntos multisonda individuales, no solo para detectar DBG, DAG y AE, sino también para diferenciar DAG + AE de DBG + normal + MI y DBG de normal + MI.

5 Las sondas adecuadas para uso junto con la presente descripción incluyen sondas identificadoras de un locus específico y sondas de recuento de cromosomas. Un conjunto de sondas puede comprender sondas cromosómicas seleccionadas a partir del grupo que consiste en una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 20q13, una sonda de recuento o enumeración del cromosoma 9, una sonda de enumeración del cromosoma 7, una sonda específica del locus 5q21-22, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 17p13.1, una sonda de enumeración del cromosoma 17 y una sonda específica del locus 9p21. El conjunto de sondas puede comprender, además, una sonda de recuento del cromosoma Y.

10 Las combinaciones de sondas individuales dentro de un conjunto de sondas han de ser seleccionadas para que tengan una sensibilidad y especificidad combinadas cuando se utilizan en los métodos de la presente invención. Las sondas cromosómicas que detectan las pérdidas o ganancias cromosómicas más frecuentes, asociadas con un carcinoma y/o displasia de esófago, se deben elegir como sondas que se complementan entre sí, basándose en la sensibilidad, especificidad y detectabilidad. En esta invención, los conjuntos de sondas seleccionados para la identificación de DBG tendrán valores DFI que serán como máximo de aproximadamente 0,7. Los conjuntos de sondas seleccionados para la identificación de DAG + AE tendrán valores DFI que serán como máximo de aproximadamente 0,5. En cualquier caso, los valores de DFI de menos de 0,5 proporcionan por lo general incluso mejores resultados, mientras que los valores DFI como máximo de aproximadamente 0,35 proporcionan por lo general resultados incluso mejores.

20 La invención se refiere también a una composición según la reivindicación 8, para la detección de carcinoma de esófago o de una lesión precursora.

Breve descripción de las Figuras

Las Figuras 1A y 1B muestran los porcentajes promedio de células que muestran una ganancia o pérdida de locus, respectivamente, para cada categoría histológica.

25 La Figura 2 muestra curvas ROC que ilustran las relaciones entre la sensibilidad y la especificidad para la detección de especímenes de AE más DAG, en relación con el grupo colectivo de especímenes normal, MI y DBG para cuatro posibles combinaciones diferentes de sondas.

La Figura 3 muestra curvas ROC que ilustran las relaciones entre la sensibilidad y la especificidad para la detección de especímenes DBG en relación con especímenes normal + MI para cuatro posibles combinaciones diferentes de sondas.

30 La Figura 4 muestra curvas ROC que ilustran las relaciones entre la sensibilidad y la especificidad para la detección individual de especímenes AE, DAG, DBG y AE + DAG en relación con especímenes normales, así como para la detección de especímenes AE + DAG en relación con especímenes normal + MI + DBG, así como especímenes DBG en relación con especímenes normales + MI para un conjunto de sondas de 8q24.12-13, 9p21, 17q11.2-12 y 20q13.

35 La Figura 5 muestra el método utilizado para llevar a cabo un recuento de 100 células.

Descripción detallada de la invención

40 La presente descripción se basa en parte en el descubrimiento de que conjuntos de multisondas individuales son capaces de detectar un carcinoma de esófago o una lesión precursora con alta sensibilidad y especificidad. La presente descripción incluye composiciones y métodos para el uso de tales conjuntos de sondas, que comprenden sondas cromosómicas complementarias a regiones diana que son portadoras de anomalías cromosómicas en la displasia de bajo grado (DBG), displasia de alto grado (DAG) o adenocarcinoma esofágico (AE). Los conjuntos de multisondas individuales descritos en este documento proporcionan una mayor sensibilidad y especificidad que las sondas individuales y, por lo tanto, las sondas dentro de cada conjunto comprenden colectivamente un indicador mejor de un carcinoma de esófago o una lesión precursora que cada sonda individual contenida dentro del conjunto.

45 Un conjunto de sondas proporciona una distinción precisa de la displasia y/o del adenocarcinoma. Antes de la presente descripción, no se había informado de conjuntos de sondas con la capacidad de detectar selectivamente un carcinoma esofágico o lesiones precursoras con especificidad y sensibilidad elevadas.

50 Los conjuntos de multisondas individuales se pueden utilizar no solo para detectar DBG, DAG y AE, sino también para diferenciar DAG y AE de DBG + MI + normal, así como DBG de MI y normal. Los métodos y los conjuntos de sondas permiten una detección precoz y precisa de AE y/o de sus precursores neoplásicos. La distinción es una herramienta importante para determinar un tratamiento apropiado y la prevención de la progresión de la enfermedad hasta un estado incurable (véase Antecedentes de la invención).

55 La expresión "carcinoma de esófago" en el contexto de la presente invención se entiende que incluye carcinoma intramucoso y adenocarcinoma esofágico, o cáncer de esófago. La expresión "lesión precursora" se entiende que incluye displasia de bajo grado y de alto grado tal y como se determina mediante análisis histológico. La expresión "región diana" o "ácido nucleico diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos que reside en una localización

cromosómica específica, cuya pérdida o ganancia es indicativa de la presencia de un carcinoma de esófago y/o de una lesión precursora. La "región diana" o el "ácido nucleico diana" es reconocido específicamente por una sonda tal y como se describe en este documento y se hibrida con la misma en el método de la presente invención.

Sondas cromosómicas

5 Las sondas se van a utilizar junto con una tecnología de hibridación *in situ*, o más preferiblemente con tecnología de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), cuyos métodos son bien conocidos en la técnica. En esta tecnología, sondas de ácidos nucleicos marcados se hibridan *in situ* con sus dianas respectivas de ácido nucleico complementario en una muestra biológica en la que se desea la identificación de la presencia o ausencia de un carcinoma de esófago o de una lesión precursora. Una detección posterior de las sondas en la muestra se correlaciona después en el sujeto con un diagnóstico clínico de displasia o de cáncer.

10 La expresión "sonda cromosómica" o "composición de sonda cromosómica" se entiende que significa un polinucleótido o una mezcla de polinucleótidos con la capacidad de hibridarse específicamente con una región cromosómica. La región cromosómica, también denominada la diana de la sonda, puede variar en su longitud de una sonda a otra, estando típicamente en el intervalo desde aproximadamente 70.000 nucleótidos hasta aproximadamente 800.000 nucleótidos, aunque se han detectado dianas de sondas pequeñas como varios miles de nucleótidos, y algunas dianas de sondas que incluyen dianas de secuencias repetitivas, pueden operar con varias megabases de tamaño. Las sondas cromosómicas se componen frecuentemente de fragmentos de polinucleótidos que varían en tamaño desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, y solo están limitadas por su capacidad para detectar específicamente una región de interés. Las dianas de sondas específicas de un locus comprenden preferiblemente al menos 100.000 nucleótidos. Una sonda cromosómica de la presente descripción se ha combinado o asociado con restos individuales que permiten la detección.

15 Las sondas adecuadas para uso junto con la presente descripción incluyen sondas identificadoras específicas de un locus y sondas de recuento de cromosomas. Una sonda específica de un locus para hibridación *in situ* reconoce y se une a un locus específico no repetitivo, cuya aberración genética se correlaciona con AE y/o displasia. La sonda se puede dirigir a regiones codificadoras o no codificadoras, o a ambas, incluyendo exones, intrones y/o secuencias reguladoras que controlan la expresión de genes o el procesamiento de productos génicos de una región diana. Cuando se desea que un locus de un gen particular sea una diana, se prefieren sondas que se hibridan con toda la longitud del gen diana, aunque no sea necesario. Para las células de una muestra dada en relación con las de un testigo, los aumentos o disminuciones en el número de señales para una sonda, indican una ganancia o una pérdida, respectivamente, para la región correspondiente. Aunque no es necesario, una sonda específica de un locus puede incluir un oncogén o gen supresor tumoral, cuya aberración genética está correlacionada con un carcinoma de esófago o una displasia. Las sondas que se hibridan con regiones que comprenden tales loci, incluyen, por ejemplo, 8q24.12-13, 9p21, 17q11.2-12 y 20q13, que se hibridan respectivamente con *C-MYC*, *P16* (un gen supresor tumoral), *HER2* (un oncogén) y *ZNF217* (también un oncogén). Otras sondas específicas de locus de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, una sonda específica del locus 17p13.1 (*P53*), una sonda específica de locus 7p12 (*EGFR*), una sonda específica del locus 5q21-22 (*APC*) y una sonda específica del locus 5p15.

20 Una sonda de enumeración de cromosomas es cualquier sonda capaz de contar el número de cromosomas específicos en una célula. Una sonda de enumeración de cromosomas reconoce típicamente y se une a una región próxima al centrómero (en lo sucesivo "pericentromérica") o en el centrómero de un cromosoma específico, típicamente una secuencia de ADN repetitivo. El recuento de cromosomas es posible en este caso ya que la pérdida de una región centromérica casi siempre conduce a la pérdida de todo el cromosoma. La delección o la amplificación de una región cromosómica particular, se puede diferenciar de la pérdida o ganancia del cromosoma completo (aneusomía), dentro de la cual se encuentra normalmente, comparando el número de señales que se corresponden con el locus particular (número de copias), con el número de señales FISH para el centrómero correspondiente. Un método para realizar esta comparación es dividir el número de señales que representan el locus por el número de señales que representan el centrómero. Las proporciones menores de uno indican la delección del locus, y las proporciones mayores de uno indican la ganancia del locus. Del mismo modo, la comparación se puede realizar entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo, en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma. En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, un experto en la técnica reconocerá que una sonda para un brazo cromosómico se puede usar alternativamente para estimar la pérdida o ganancia total de cromosomas. Sin embargo, tales sondas no son tan precisas en el recuento de cromosomas, ya que la pérdida de señales para tales sondas puede no indicar siempre una pérdida de los cromosomas completos. Ejemplos de sondas de enumeración de cromosomas incluyen sondas CEP® (p. ej., las sondas CEP 12 y X/Y) disponibles comercialmente en Vysis, Inc., Downers Grove, IL.

25 Un conjunto de sondas puede comprender sondas cromosómicas seleccionadas a partir del grupo que consiste en una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 20q13, una sonda de enumeración para el cromosoma 9, una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 7, una sonda específica del locus 5q21-22, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 17p13.1, una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17 y una sonda específica del locus 9p21. El conjunto de sondas puede comprender además una sonda de

específica del locus 17p13.1; b) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; c) una sonda específica del locus 17q11.2-12; y d) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda para el cromosoma 17; b) una sonda específica del locus 20q13; c) una sonda específica del locus 17q11.2-12; y d) una sonda específica del locus 9p21. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 17p13.1; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda específica del locus 9p21; y d) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; y c) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda específica del locus 5p15; y d) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma Y. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; y d) una sonda específica del locus 9p21. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda específica del locus 9p21; and d) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 9. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda específica del locus 9p21; y d) una sonda específica del locus 5q21-22. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 17p13.1; b) una sonda específica del locus 20q13; c) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; y d) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; y d) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 20q13; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda específica del locus 5q21-22; y d) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 17p13.1; c) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; d) una sonda específica del locus 9p21; y e) una sonda específica del locus 8q24.12-13. El conjunto puede comprender a) una sonda específica del locus 17q11.2-12; b) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 9; c) una sonda específica del locus 5q21-22; y d) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; y c) una sonda específica del locus 5p15. El conjunto puede comprender a) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17; b) una sonda específica del locus 17q11.2-12; c) una sonda específica del locus 5p15; y d) una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma Y.

Las sondas de enumeración de cromosomas y las sondas identificadoras de un locus específico se pueden obtener comercialmente a partir de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Tales sondas también se pueden preparar usando métodos convencionales, que son conocidos en la técnica. Las sondas cromosómicas se pueden preparar, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), o a partir de ADN humano clonado, tal como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BACs) y cromosomas artificiales P1 (PACs) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Una región de interés se puede obtener a través de la amplificación con PCR o mediante clonación. Alternativamente, las sondas cromosómicas se pueden preparar sintéticamente.

La detección de sondas se puede realizar por cualquiera entre una serie de métodos, que son conocidos en la técnica, siempre y cuando después de la hibridación cada sonda dentro de un conjunto se pueda distinguir de otra. Los restos que contienen marcadores pueden estar asociados directa o indirectamente con sondas cromosómicas. La expresión "resto que contiene marcador" o "resto de detección" se refiere generalmente a un grupo o grupos moleculares asociados con una sonda cromosómica, ya sea directa o indirectamente, lo que permite la detección de esa sonda después de que se haya hibridado con su diana. Diferentes restos que contienen marcadores se deben elegir para cada sonda individual dentro de un conjunto particular, de forma que cada sonda hibridada se pueda distinguir visualmente de las otras después de la detección. Preferiblemente, se emplea la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y las sondas cromosómicas se marcan con restos que contienen distintos marcadores fluorescentes. Los fluoróforos, moléculas orgánicas que emiten fluorescencia después de la irradiación a una longitud de onda particular, pueden estar fijados directamente a las sondas cromosómicas. Se prefieren las sondas FISH para marcar directamente, ya que requieren menos tiempo de procesamiento que las sondas con marcado indirecto. Además, el gran número de fluoróforos que existen permite una visualización sencilla de muchas sondas diferentes dentro de la misma muestra. Un gran número de fluoróforos están disponibles comercialmente en formas reactivas susceptibles de marcar ADN que contiene grupos amino alifáticos.

La fijación de fluoróforos a sondas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se puede llevar a cabo mediante cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden fijar covalentemente a un nucleótido en particular, por ejemplo, y el nucleótido marcado se incorpora en la sonda utilizando técnicas convencionales, tales como la traducción nick, el cebado aleatorio y el marcado con PCR. Alternativamente, el fluoróforo se puede fijar covalentemente, a través de un enlazador, a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han transaminado. Los métodos para marcar sondas se describen en el documento de Patente de Estados Unidos nº 5.491.224 y en Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (2002), Y.-S. Fan, compilador, capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets", L. Morrison et al., pág. 21-40, Humana Press.

Los fluoróforos que se pueden utilizar junto con la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), TEXAS RED (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(y -6)-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-(y -6)-carboxifluoresceína; fluoresceín-5-isotiocianato (FITC); ácido 7-dietilaminocumarin-3-

carboxílico, tetrametilrodamin-5-(y -6)-isotiocianato; 5-(y -6)-carboxitetrametilrodamina; ácido 7-hidroxicumarin-3-carboxílico; 6-[fluoresceín-5-(y -6)-carboxamido]hexanoico; ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a diaza-3-indacenpropiónico; eosin-5-isotiocianato; eritrosin-5-isotiocianato; 5-(y -6)-carboxiroadamina 6G; y CASCADE blue acetil azida (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

5 Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar como restos que contienen marcador otros agentes luminiscentes o colorantes en lugar de fluoróforos. Otros agentes luminiscentes, que se pueden usar, incluyen, por ejemplo, restos que contienen marcadores radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Alternativamente, la hibridación *in situ* de sondas cromosómicas se puede emplear con el uso de restos de detección visualizados por medios indirectos. Las sondas se pueden marcar con biotina o digoxigenina, utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, y luego procesarlas adicionalmente para la detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr a través de la posterior unión de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en este caso, la visualización y la distinción de las sondas se puede conseguir tal y como se ha descrito anteriormente para FISH. Las sondas cromosómicas hibridadas con regiones diana se pueden visualizar alternativamente, mediante reacciones enzimáticas de restos de marcadores con sustratos adecuados para la producción de productos coloreados insolubles. Cada sonda se puede distinguir de otras sondas dentro del conjunto, mediante la elección de un resto marcador distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar a través de la incubación posterior con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitro azul tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que la diaminobencidina sirve como un sustrato para HRP.

En realizaciones en las que se utilizan sondas marcadas con fluoróforo o composiciones de sondas, el método de detección puede implicar microscopía de fluorescencia, citometría de flujo u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Se puede utilizar cualquier método adecuado de formación de imagen microscópica, junto con los métodos de la presente invención, para observar múltiples fluoróforos. En el caso en el que se emplea microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden observar con luz adecuada para estudiar la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros adecuados. Alternativamente, se pueden utilizar sistemas de formación de imágenes digitales automatizadas como MetaSystems o Applied Imaging.

Cualquier conjunto de sondas o conjuntos de sondas se puede envasar con otros reactivos, y opcionalmente con instrucciones, en forma de kits que se pueden utilizar en la puesta en práctica de los métodos de la presente invención. Los kits útiles pueden incluir uno o varios conjuntos de sondas que comprenden sondas cromosómicas seleccionadas a partir del grupo que consiste en una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 20q13, una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 9, una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 7, una sonda específica del locus 5q21-22, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 17p13.1, una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma 17 y una sonda específica del locus 9p21. El conjunto puede comprender además una sonda de enumeración cromosómica para el cromosoma Y.

Hibridación in situ

La expresión "in situ" se entiende que significa que los cromosomas de una célula procedente de una muestra biológica están expuestos desde el núcleo y son accesibles para sondas cromosómicas marcadas, sin una interrupción sustancial o una reubicación de los cromosomas entre sí. "Hibridación" o "hibridar" se entiende que se refiere a la formación de un híbrido específico entre una sonda y una región diana. Típicamente, un híbrido es una molécula que incluye una porción de cadena doble, configurada en forma helicoidal, compuesta por moléculas monocatenarias emparejadas de forma complementaria, una de las cuales comprende el ácido nucleico diana, y la otra es la secuencia de nucleótidos de ADN marcado de una sonda. La expresión "hibridación *in situ*" se entiende que significa la hibridación de una sonda con una diana que existe dentro de una muestra biológica que comprende una preparación o un espécimen citológico o histológico. Durante la hibridación *in situ*, se producen híbridos entre una sonda y una diana. La "hibridación *in situ*" puede incluir desnaturalizar antes de la hibridación y una detección de una sonda o un híbrido, posterior a la hibridación de una sonda con una diana. Una muestra biológica se puede adherir como una capa sobre un portaobjetos, y una muestra biológica puede comprender, por ejemplo, cromosomas individuales o regiones cromosómicas que han sido tratadas para conservar su morfología en condiciones desnaturalizantes, o condiciones tales como las que se encuentran típicamente en un procedimiento de detección de sondas.

Métodos de selección de sondas

Los conjuntos de sondas para uso en los métodos de la presente invención se pueden seleccionar empleando los principios descritos en los ejemplos. Las combinaciones de sondas cromosómicas dentro de un conjunto de sondas se seleccionan por la sensibilidad, especificidad y detectabilidad en relación con el carcinoma de esófago y la displasia de interés.

La sensibilidad se refiere a la capacidad de una prueba (p. ej., FISH) para detectar una enfermedad (p. ej., DBG, DAG o AE) cuando está presente. Más precisamente, la sensibilidad se define como positivos verdaderos /

(positivos verdaderos + falsos negativos). Una prueba con alta sensibilidad tiene pocos resultados falsos negativos, mientras que una prueba con baja sensibilidad tiene muchos resultados falsos negativos. La especificidad, por otro lado, se refiere a la capacidad de una prueba (p. ej., FISH) para proporcionar un resultado negativo cuando la enfermedad no está presente. Más precisamente, la especificidad se define como negativos verdaderos / (negativos verdaderos + falsos positivos). Una prueba con alta especificidad tiene pocos resultados falsos positivos, mientras que una prueba con baja especificidad tiene muchos resultados falsos positivos.

En general, se eligen los conjuntos de sondas cromosómicas con la mayor sensibilidad y especificidad combinadas, para la detección de DBG y/o DAG + AE. La sensibilidad y especificidad combinadas de un conjunto de sondas se puede representar mediante el parámetro distancia del ideal (DFI). Los valores de DFI varían desde 0 hasta 1,414, en donde 0 representa un conjunto de sondas que tiene 100% de sensibilidad y 100% de especificidad, y 1,414 representa un conjunto de sondas con 0% de sensibilidad y 0% de especificidad. En esta invención, los conjuntos de sondas seleccionados para la identificación de DBG tendrán valores de DFI que serán como máximo aproximadamente 0,7. En esta invención, los conjuntos de sondas elegidos para la identificación de DAG + AE tendrán valores de DFI que son como máximo de aproximadamente 0,5. Los valores de DFI que son menores de aproximadamente 0,5 suelen proporcionar resultados aún mejores. Los valores de DFI que son menores de aproximadamente 0,35 suelen proporcionar resultados aún mejores.

El número de sondas dentro de un conjunto que va a ser estudiado por un observador humano (y no con técnicas de formación de imágenes asistidas por ordenador) está limitado por el número de fluoróforos singulares que proporcionan señales distinguibles visualmente después de la hibridación. Por ejemplo, en el momento actual, es difícil tener más de cuatro fluoróforos singulares (que aparecen como señales en color rojo, verde, aguamarina y oro para el ojo humano) en un solo conjunto de sondas. La razón de esto es importante porque la sensibilidad de un ensayo generalmente aumenta a medida que se incrementa el número de sondas dentro de un conjunto. Sin embargo, los incrementos en la sensibilidad se van reduciendo con la adición de más sondas y, en algún momento, la inclusión de sondas adicionales en un conjunto de sondas no está asociada con aumentos significativos de la sensibilidad del ensayo ("rendimientos decrecientes"). También debe tenerse en cuenta que la inclusión de múltiples sondas en un conjunto de sondas tiene la capacidad de aumentar la especificidad del ensayo. Por estas razones, un conjunto de sondas comprende preferiblemente tres, o preferiblemente cuatro, sondas cromosómicas, ya que este número ofrece la sensibilidad y la especificidad deseadas para la detección.

Las sondas individuales se deben elegir para incluirlas en un conjunto de sondas en función de su capacidad para complementar otras sondas dentro del conjunto. Cada sonda debe identificar un marcador para un carcinoma de esófago o una lesión precursora que las otras sondas no logran identificar en algún momento. Un método para determinar qué sondas se complementan entre sí, es identificar primero las sondas individuales con los valores más bajos de DFI en un grupo de muestras tumorales. A continuación, se pueden someter a ensayo sondas adicionales sobre las muestras tumorales que la sonda inicial no identificó, y la sonda con el valor más bajo de DFI se añade al conjunto. Esto se puede repetir a continuación hasta que se consigue un conjunto completo de sondas cromosómicas con el valor de DFI deseado.

El análisis de discriminación es un método que se puede utilizar para determinar qué sondas son las mejor capacitadas para detectar AE y sus lesiones precursoras. Este método determina si las sondas individuales son capaces de detectar un porcentaje estadísticamente diferente de células anormales en especímenes del ensayo (p. ej., DBG, DAG y AE) en comparación con un grupo de especímenes testigo, tales como especímenes normales. La detección de células con ganancias cromosómicas (o de locus) o pérdidas cromosómicas (o de locus) se pueden utilizar para identificar células neoplásicas en pacientes con esófago de Barrett con DBG, DAG o AE. Sin embargo, las pérdidas cromosómicas a veces se producen como un artefacto en células normales, debido a la superposición aleatoria de señales y/o a una hibridación inadecuada. En consecuencia, las ganancias cromosómicas son en su mayor parte un indicador más fiable de la presencia de células neoplásicas.

Los valores de corte para las ganancias y pérdidas cromosómicas individuales deben ser determinados en el momento de elegir un conjunto de sondas. La expresión "valor de corte" se entiende que significa tanto el número absoluto como el porcentaje de células en una población que tiene aberraciones genéticas (es decir, pérdidas o ganancias de regiones diana) para una sonda particular o una combinación de sondas dentro de un conjunto, para realizar una determinación positiva. Si el número de células en la muestra que alberga las pérdidas o ganancias para una sonda particular, es mayor que el valor de corte, se determina que la muestra es positiva para la patología aplicable (p. ej., DBG, DAG o AE).

Las sondas se pueden seleccionar simplemente por su capacidad para detectar AE y sus lesiones precursoras. Sin embargo, la capacidad para detectar no solo colectivamente estas lesiones, sino también para distinguir una de otra (p. ej., la capacidad para distinguir DBG de DAG + AE) tiene una utilidad clínica potencial. Con este fin, se realizaron análisis para determinar los valores de DFI de diferentes conjuntos de sondas para distinguir muestras de DBG de muestras de MI y normales, y muestras de DAG y AE de muestras de DBG, MI y norma.

Detección y diagnóstico de pacientes con displasia y/o carcinoma de esófago

Este método comprende primero obtener una muestra biológica que comprende células del esófago de un sujeto sospechoso de tener un carcinoma esofágico o una lesión precursora. La muestra se pone en contacto a continuación con un conjunto de sondas cromosómicas para detectar selectivamente un carcinoma esofágico o una lesión precursora en la muestra, si lo hubiera, en condiciones para hibridar de forma específica las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra. Las sondas del conjunto se pueden hibridar a la vez o secuencialmente, fotografiando las imágenes de los resultados de cada hibridación, desprendiendo la sonda o sondas e hibridando después la muestra con la sonda o sondas restantes. Múltiples conjuntos de sondas también se pueden hibridar con la muestra de esta manera. El conjunto de sondas cromosómicas se selecciona de tal manera que dicho conjunto es capaz de detectar selectivamente un carcinoma de esófago o una lesión precursora en la muestra biológica. Cualquier conjunto de sondas descrito en esta memoria se puede utilizar junto con este método. Este método comprende además la detección de un patrón de hibridación del conjunto de sondas cromosómicas con la muestra biológica, en donde el patrón de hibridación es indicativo de la presencia o ausencia del carcinoma de esófago o la lesión precursora en el sujeto. En una realización preferida, el patrón de hibridación se detecta a través de FISH, tal y como se ha descrito anteriormente.

La expresión "muestra biológica" o "espécimen" se entiende que significa una muestra que comprende células esofágicas. La muestra biológica se puede obtener además a partir de un sujeto que ha sido diagnosticado con enfermedad crónica de reflujo gastroesofágico, esclerodermia, adenocarcinoma de esófago, antes de una extirpación esofágica, esófago de Barrett o una anomalía de la mucosa esofágica. La muestra biológica se puede obtener a partir del esófago proximal, medio o distal.

Las muestras biológicas se pueden obtener usando cualquiera entre una serie de métodos en la técnica. Normalmente, se tiene que quitar la capa mucosa del esófago de la mucosa esofágica con un agente mucolítico tal como n-acetil-cisteína, para poder adquirir muestras adecuadas. Ejemplos de muestras biológicas que comprenden células esofágicas incluyen las obtenidas a partir de biopsias, muestras citológicas y muestras extirpadas. Una muestra citológica puede ser una muestra endoscópica por cepillado o una muestra citológica mediante globo. Un espécimen biológico también puede estar incluido en parafina y seccionarlo para uso en el método de la presente invención. Típicamente, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se recogen y se procesan antes de la hibridación utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Tal procesamiento incluye típicamente la fijación, por ejemplo, en una solución de alcohol ácido, una solución de ácido y acetona o una solución de aldehído tal como formaldehído y glutaraldehído. Se utiliza normalmente una proporción de 3:1 de metanol:ácido acético glacial. Las células se pueden concentrar hasta tener una densidad deseada antes de la hibridación de la sonda.

Las condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico generalmente incluyen las combinaciones de condiciones que se pueden emplear en un procedimiento de hibridación dado, para producir híbridos específicos, cuyas condiciones pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Tales condiciones implican típicamente una temperatura controlada, una fase líquida y el contacto entre una sonda cromosómica y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores, incluyendo la concentración de la sonda, la longitud de la diana, el contenido en diana y sonda G-C, la concentración salina del tampón de hibridación, la composición del disolvente, la temperatura y la duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder a la puesta en contacto de las sondas con las dianas. Alternativamente, tanto la sonda como la diana de ácido nucleico se pueden someter a condiciones de desnaturalización junto con el posterior contacto de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede lograr con la posterior incubación de la sonda/muestra, por ejemplo, en una fase líquida de aproximadamente una mezcla con una relación en volumen de 50:50 de 2 - 4 x citrato sódico salino (SSC) y formamida, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 55°C durante un tiempo que está ilustrativamente en el intervalo desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 96 horas, o más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 32 a aproximadamente 40°C durante un espacio de un tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas. Con el fin de aumentar la especificidad, el uso de un agente de bloqueo tal como ácido nucleico de bloqueo no marcado como se describe en el documento de patente de EE.UU. n° 5.756.696, se puede utilizar junto con los métodos de la presente invención. Se pueden emplear sin problemas otras condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, como sería fácilmente evidente para un experto en la técnica.

Al término de un período de incubación adecuado, las sondas cromosómicas unidas no específicamente a la muestra de ADN, se pueden eliminar mediante una serie de lavados. La temperatura y las concentraciones de sal se eligen adecuadamente para un rigor deseado. El nivel de rigor requerido depende de la complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica, y se puede determinar mediante hibridación sistemática de sondas con muestras cuya composición genética es conocida. En general, los lavados con rigor elevado se pueden llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a aproximadamente 80°C con aproximadamente 0,2 x a aproximadamente 2 x SSC y aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de un detergente no iónico tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados con menor rigor, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura inferior con una concentración incrementada de sal.

Después de realizar la hibridación FISH, se evalúan los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados para determinar si hay células sobre el portaobjetos que tienen anomalías cromosómicas compatibles con un diagnóstico de neoplasia (que en esta invención se refiere a la presencia de células que tienen anomalías cromosómicas compatibles con un diagnóstico de DBG, DAG o AE). Este análisis microscópico se puede realizar ya sea mediante: 1) el recuento de los patrones de señales en un cierto número de células consecutivas (p. ej., 50 o 100 células), excluyendo de las células que claramente no son neoplásicas, tales como las células inflamatorias, o 2) la exploración del portaobjetos en busca de células que tienen características citológicas (p. ej., ampliación nuclear, irregularidad nuclear o tinción moteada de la cromatina) que sugieren que las células son neoplásicas y el recuento de los patrones de señales solo en esas células. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes y a veces puede ser necesaria una combinación de los dos.

La primera técnica de recuento de células consecutivas puede ser necesaria si se tiene que determinar el porcentaje exacto de células que contienen una cierta anomalía, para saber si el caso es positivo para la anomalía. Por ejemplo, para determinar si un caso que muestra una pérdida homocigota o hemocigota de 9p21 es de hecho positivo para DBG, se tendría que conocer el porcentaje de células que muestran la anomalía. La primera técnica también es necesaria si las células neoplásicas no presentan anomalías citológicas significativas, como es el caso de DBG. La desventaja de la primera técnica de recuento de células consecutivas es que dura bastante tiempo y por lo tanto solamente es práctica para contar un número relativamente pequeño de células (p. ej., 50 o 100 células). El problema relacionado con esto es que frecuentemente hay miles de células en el portaobjetos y a veces solo una fracción muy pequeña del número total de células son realmente células tumorales. En consecuencia, mediante el uso de la primera técnica se corre el riesgo de obtener resultados falsos negativos debido a un muestreo limitado.

Afortunadamente, una técnica de barrido (técnica número 2) que permite revisar rápidamente un gran número de células, se puede utilizar para ayudar a evitar resultados falsos negativos debido al muestreo limitado. Esta técnica (descrita en el documento de Pat. de EE.UU. n° 6.174.681) se lleva a cabo mediante el análisis visual del portaobjetos, por lo general el portaobjetos completo, en busca de células que tienen características citológicas sugerentes aunque no sea un diagnóstico absoluto de neoplasia. El barrido se lleva a cabo mediante la visualización de cada campo de visión microscópico sobre el portaobjetos con bastante rapidez, buscando solo las células que tienen anomalías nucleares que sugieren neoplasia. La persona que realiza el barrido trata de revisar todos los campos de visión sobre el portaobjetos, pero no pierde tiempo evaluando los patrones de señales de una célula o células en un campo de visión, a menos que la célula o células tengan rasgos citológicos anormales. (A veces se cuestiona por qué FISH es necesario si las características citológicas observadas con DAPI sugieren que las células son neoplásicas. La razón es que aunque las características son sugerentes, no son totalmente un diagnóstico de neoplasia). Como se ha señalado anteriormente, el barrido permite que el recuento se centre en la fracción de células generalmente pequeña que es propensa a tener anomalías cromosómicas compatibles con un diagnóstico de neoplasia. El barrido permite un análisis más rápido y aumenta la probabilidad de que no se pierda un resultado positivo. El barrido, aunque generalmente se realiza con un DAPI (diclorhidrato de 4,6-diamin-2-fenilindol), la contracoloración nuclear también se puede realizar con otros contracolores, tales como yoduro de propidio. El yoduro de propidio, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un colorante rojo fluorescente, específico de ADN que se puede observar a una longitud de onda de 614 nm con pico de emisión. DAPI, utilizado típicamente a una concentración desde aproximadamente 125 ng/ml hasta aproximadamente 1000 ng/ml, es un colorante azul fluorescente específico de ADN que se puede observar a una longitud de onda de 452 nm con pico de emisión. El patrón de hibridación para el conjunto de sondas cromosómicas se detecta y se registra para las células seleccionadas para una evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. La hibridación se detecta por la presencia o ausencia de las señales particulares generadas por cada una de las sondas cromosómicas. La expresión "patrón de hibridación" se entiende que se refiere a la cuantificación del número de señales de hibridación cromosómica para cada una de las señales de las sondas para las células elegidas para tal evaluación, a través de una de las dos técnicas descritas anteriormente. Una vez que se determina el número de regiones diana dentro de cada célula, según la evaluación de la cantidad de regiones que muestran una hibridación con cada sonda, las ganancias y/o las pérdidas cromosómicas relativas se pueden cuantificar. Para sondas que se hibridan con un autosoma, más de dos señales de la sonda por célula se considera una ganancia, mientras que menos de dos se considera una pérdida. Para una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma Y, más de una señal de la sonda por célula en los machos se considera una ganancia, mientras que menos de una señal de la sonda por célula se considera una pérdida. Los porcentajes de células con ganancia y/o pérdida (células anormales) se registrarán para cada locus. Una muestra se puede considerar positiva para una anomalía (p. ej., DBG, DAG o AE) si el porcentaje de células anormales con respecto cualquiera de los loci sometidos a ensayo, excede el valor de corte para ese locus.

No es posible determinar el porcentaje exacto de células que muestran anomalías con la técnica de barrido, ya que la persona que realiza el análisis no hace un seguimiento de la cantidad exacta de células en total que se han evaluado mediante el barrido (frecuentemente miles). Sin embargo, no es necesario conocer el número exacto de células visualizadas en el portaobjetos con la técnica de barrido, ya que las células que se están buscando (es decir, células que muestran anomalías cromosómicas marcadas, tales como polisomía) son prácticamente un diagnóstico de la presencia de neoplasia, independientemente del número total de células presentes en el portaobjetos. En otras palabras, cuando se utiliza la técnica de barrido, lo que se emplea es el número absoluto de células que muestran una anomalía en lugar del porcentaje de células que muestran una anomalía, para determinar si un caso es positivo

o negativo para neoplasia. Estudios previos realizados por nuestro grupo y otros han demostrado que tan solo cuatro células anormales (independientemente del número total de células de apariencia normal en el portaobjetos) con polisomía (es decir, una célula que muestra ganancias para dos o más sondas) son suficientes para que un caso se defina con seguridad como positivo para una anomalía (véase, Sokolova IA, et al., J. Molecular Diagnostics, 2000).

5 Como se ha señalado anteriormente, la inclusión de múltiples sondas en un solo conjunto de sondas, aumenta la sensibilidad del ensayo sobre la obtenida con una sola sonda. Sin embargo, este aumento de la sensibilidad puede estar acompañado por una pérdida de especificidad, ya que se incrementan las posibilidades de que cualquiera de las múltiples sondas proporcione un resultado de falsos positivos. Para conservar una especificidad elevada, se pueden desarrollar criterios de corte estrictos para células que muestran una anomalía en un solo locus. Por ejemplo, se podría prever que al menos 30% de las células tiene que mostrar una pérdida homocigota de 9p21 para que un caso se defina como positivo para la anomalía. Además, para los casos que no excedan estos puntos de corte para sondas individuales, se puede estipular que dos o más loci muestran ganancia o pérdida dentro de la misma célula, con el fin de considerar esa célula anormal, y un punto de corte apropiado se aplica luego para establecer si el espécimen era positivo o no. Por ejemplo, cuando las ganancias son indicativas de una neoplasia esofágica o una lesión precursora, una muestra se podría considerar positiva si contiene, por ejemplo, al menos cuatro células que muestran ganancias de al menos dos o más regiones diana (véase, Sokolova IA, et al, J. Molecular Diagnostics, 2000).

Más específicamente, por ejemplo, las muestras se consideraron positivas si cumplían los siguientes criterios:

- $\geq 13\%$ de las células que presentan pérdida de hemicigota y/o homocigota de 9p21 (se ajusta más con un diagnóstico de displasia de bajo grado)
- $\geq 4\%$ de las células que presentan ganancia de 8q24 (se ajusta más con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)
- $\geq 8\%$ de las células que presentan ganancia de 17q11 (se ajusta más con el diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)
- $\geq 12\%$ de las células que presentan ganancia de 20q13 (se ajusta más con el diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma). • En una realización más preferida, $\geq 16\%$ de las células que presentan ganancia de 20q13 (se ajusta más con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)
- $\geq 3\%$ de las células que presentan polisomía (se ajusta más con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)

30 Los números y las sondas proporcionadas anteriormente son solamente ejemplos. Una persona con experiencia en la técnica verá que los niveles menores o mayores de sensibilidad y especificidad se pueden tener en función de los criterios y el conjunto de sondas utilizados para el ensayo en particular que se está ejecutando. Por ejemplo, una sensibilidad menor, pero una mayor especificidad se podrían obtener si un porcentaje mayor de células con "polisomía" (p. ej., $\geq 5\%$) se utilizara como punto de corte para una anomalía.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Selección de sondas

Conjuntos de sondas FISH

40 FISH se realizó con tres conjuntos de sondas singulares. Cada conjunto de sondas contenía cuatro sondas para la enumeración de cromosomas (CEP®) o identificadores específicos de locus (LSI®) para centrómeros o loci específicos de cromosomas que habían mostrado estar alterados con frecuencia en pacientes con neoplasia asociada a EB (Tabla 1). Las sondas CEP 7, CEP 9 y CEP 17 fueron incluidas para determinar la ganancia o pérdida alélica de las correspondientes sondas LSI en esos cromosomas (p. ej., 9p21 en el cromosoma 9) o aneusomía de esos cromosomas.

45 Tabla 1: Sondas para FISH y ubicaciones de dianas génicas utilizadas para la selección de sondas

Conjunto de sondas	Rojo	Verde	Aguamarina	Oro
I	LSI 9p21 (P16)	LSI 5p15	CEP 9	LSI 5q21-22 (APC)
II	CEP Y	LSI 17q11.2-12 (HER2/NEU)	CEP 17	LSI 17p13.1 (P53)
III	LSI 20q13.2	LSI 8q24.12-13 (C-MYC)	CEP 7	LSI 7p12 (EGFR)

Con la excepción de la sonda LSI[®] 5q21-22 (APC), las sondas LSI[®] y CEP[®] están disponibles comercialmente en Vysis, Inc. (Downers Grove, IL, www.vysis.com) marcadas con SpectrumOrange[®]. En lugar de marcar con SpectrumOrange[®], el material de partida de ácido nucleico se transaminó y luego se marcó químicamente utilizando Texas Red (rojo), ácido 6-[fluoresceín-5-(y 6-)-carboxamido]hexanoico (verde), ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico (aguamarina) y 5-(y 6-)-carboxiroadamina 6G (oro). El proceso de transaminación y marcado se describe en Bittner, et al., documento de patente de Patente de Estados Unidos n° 5.491.224.

La sonda LSI[®] 5q21-22 (APC) se preparó a partir de dos clones BAC (núm. de identificación RPC111-60p20 y RPC111-141i11 obtenidos de Invitrogen). El tamaño del cóntigo era de aproximadamente 246 kb y el gen APC se localizó en aproximadamente el centro del cóntigo. La sonda se transaminó y se marcó como se ha descrito anteriormente.

Población de estudio

La aprobación de la Junta de revisión institucional (IRB) se obtuvo para este estudio y se obtuvo el consentimiento de todos los pacientes incluidos. El estudio incluía 174 pacientes atendidos en la Clínica Mayo, Rochester, desde 2002 hasta 2003. Los pacientes fueron incluidos en el estudio si tenían EB comprobada patológicamente identificada previamente o EB comprobada patológicamente, en el momento de entrar en el estudio. Se estudiaron 17 mujeres y 153 varones de edades comprendidas entre 31 a 87.

Muestras y hallazgos patológicos

Se obtuvieron muestras citológicas por cepillado mediante el barrido con un cepillo de vaina gastrointestinal (Hobbs Medical Inc., Stafford Springs, Connecticut) sobre la superficie de la zona sospechosa de MI, neoplasia asociada con EB, o la ubicación de EB diagnosticado previamente después de eliminar inicialmente la capa de moco con un aerosol de N-acetil-cisteína. El cepillo se colocó inmediatamente en una botella que contenía solución PreservCyt[®] (Cytoc Corporation, Boxborough, MA) y se entregó al laboratorio FISH para el procesamiento.

Los hallazgos patológicos de muestras endoscópicas por cepillado que contenían un número de células suficiente para el recuento, superior a 50 células para al menos uno de los tres conjuntos de sondas, se pudo contar en 170 de las 174 muestras, fueron los siguientes: normal (N = 34), MI (N = 28), DBG (N = 24), DAG (N = 67) y AE (N = 17). Las muestras que tenían más de un resultado patológico en el momento del cepillado, debido a múltiples biopsias o resección de la end mucosa (EMR), se clasificaron de acuerdo con la categoría histológica más avanzada observada (p. ej., si un paciente tenía dos biopsias, una era MI y la otra era DAG, la muestra se colocaría en la clasificación de DAG).

Aislamiento de células para el análisis FISH

Las muestras fueron procesadas hasta 72 horas después de su recogida. Las células se retiraron del cepillo lavando el cepillo con 10 ml de solución 3:1 de solución fijadora metanol:ácido acético glacial, cuatro veces y transfiriendo la mezcla a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación a 800 x g durante ocho minutos. Se eliminó el material sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de solución 3:1 de metanol:ácido acético. La suspensión celular se centrifugó después a 300 x g durante ocho minutos. Dependiendo del tamaño del sedimento celular, a continuación se retiró todo pero aproximadamente 50-150 µl del material sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió después mediante agitación suave y se almacenó a -4°C para su uso posterior.

Preparación de portaobjetos para el análisis FISH

Una porción de la suspensión celular (por lo general aproximadamente 10-50 µl) se dejó caer gota a gota en tres pocillos (un pocillo para cada uno de los tres conjuntos de sondas) con una micropipeta. La celularidad (es decir, la densidad de las células en el pocillo) se evaluó con un microscopio de contraste de fase. Si la celularidad era demasiado baja, se añadieron porciones adicionales del sedimento celular al pocillo hasta que se alcanzó la celularidad deseada (es decir, el mayor número de células por mancha con un solapamiento celular mínimo) o el sedimento celular se había agotado.

Hibridación FISH

FISH se realizó de la siguiente manera: los portaobjetos se incubaron en 2X solución salina y citrato de sodio convencional (SSC) a 37°C durante 13 minutos, 0,05 mg/ml de pepsina en HCl 10 mM a 37°C durante 14 minutos, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente (RT) durante cinco minutos, 1% de formaldehído a temperatura ambiente durante cinco minutos y PBS a temperatura ambiente durante cinco minutos. Los portaobjetos se colocaron entonces a RT en soluciones de etanol al 70%, 85% y 100% durante dos minutos en cada una y se dejaron secar al aire. Después de este pretratamiento, se aplicaron 5 µl (1,5 µl de sonda, 3,5 µl de tampón de hibridación LSI/WCP) de la mezcla de sondas apropiada, en la zona designada. Los portaobjetos se cubrieron entonces con cubreobjetos, los bordes del cubreobjetos se sellaron con pegamento de caucho y se colocaron en un sistema de desnaturalización/hibridación de Vysis HYBrite[®] en donde la sonda y el ADN diana se codesnaturalizaron a 73°C durante tres minutos y luego se incubaron a 37°C durante aproximadamente 15 horas.

Después de la hibridación durante la noche, los portaobjetos se lavaron en 2X SSC/0,1% de NP-40 a 73°C durante 40 segundos y se enjuagaron en 2X SSC/0,1% de NP-40 a temperatura ambiente durante varios minutos. A continuación, se aplicaron 10 µl de contratinción DAPI I a cada área hibridada y los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos.

5 Recuento de las señales de FISH

Los portaobjetos se analizaron con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros de paso de banda individuales para la contratinción DAPI, Spectrum Aqua® y Spectrum Gold®, junto con un filtro de paso dual para FITC/Texas Red. El recuento de la señal de FISH se realizó sin conocimiento de los resultados clínicos o histológicos del paciente. La muestra se analizó contando y registrando el número de señales para cada sonda en 50-100 células consecutivas, no escamosas, no escamosas. Las células escamosas se contaron solo para el caso aislado en el que ningún otro tipo de célula estuviera presente. Se tuvo cuidado de no contar las células superpuestas. Se contó un centenar de células por hibridación, cuando fue posible. Era necesario un recuento de al menos 50 células para que el caso se incluyera en el análisis de datos.

Análisis del recuento de datos

15 Cada una de las células 50-100 analizadas por muestra se clasificó con respecto a los 11 loci sobre autosomas por tener el complemento normal del locus (dos señales de FISH), ganancia del locus (más de dos señales de FISH) o pérdida del locus (menos de dos señales de FISH). Para CEP Y, una copia de la secuencia centromérica era normal, 2 o más señales indicaban ganancia y cero señales indicaban pérdida. Para múltiples loci en el mismo cromosoma (p. ej., CEP 17, 17p13.1 y 17q11.2-12) la ganancia o pérdida relativa de un locus con respecto al otro también se registró para cada célula. La ganancia relativa de un locus se indicaba mediante una relación de las señales de FISH en ese locus con las señales de FISH de un segundo locus que era mayor que uno. La proporción era menor de uno para la pérdida relativa. Los porcentajes de células con ganancia y pérdida se indicaron en forma de tabla para cada locus en cada muestra y las medias (x) y las desviaciones estándar (s) de los porcentajes de células se calcularon para cada grupo de diagnóstico (normal, MI, DBG, DAG, AE; véanse las Tablas 2 y 3), excepto las muestras con una
 20 calidad de la señal insuficiente para el recuento.
 25

Tabla 2. Media y desviación estándar de los porcentajes de células con ganancia o pérdida en muestras normales.

MUESTRA	Conjunto de muestras normales				
	N	Porcentaje medio de células con ganancia	SD - Porcentaje de células con ganancia	Porcentaje medio de células con pérdida	SD - Porcentaje de células con pérdida
5p15	33	0,21	0,42	1,93	1,93
5q21-22	33	0,35	0,56	2,31	3,27
CEP7	31	0,45	0,72	2,06	1,21
7p12	31	0,57	0,74	1,81	1,64
8q24.12-13	31	0,48	0,72	1,81	1,18
CEP 9	33	0,18	0,46	2,67	2,05
9p21	33	0,61	0,86	3,53	3,13
CEP 17	32	0,16	0,51	5,13	2,93
17p13.1	32	0,64	1,13	4,72	3,01
17q11.2-12	32	0,84	1,32	3,88	2,43
20q13	31	0,74	1,21	1,68	1,49
CEPY	28	0,36	0,74	1,90	3,19
5p15/5q21-22	33	2,10	3,03	1,86	1,79
7p12/CEP 7	31	1,95	1,23	1,55	1,65
9p21/CEP 9	33	2,97	2,12	3,38	3,15
17p13.1/CEP 17	32	4,30	2,37	3,38	2,09
17q11.2-12/CEP17	32	5,30	2,81	3,39	2,44
17q11.2-	32	4,63	3,19	3,68	2,42

MUESTRA	Conjunto de muestras normales				
	N	Porcentaje medio de células con ganancia	SD - Porcentaje de células con ganancia	Porcentaje medio de células con pérdida	SD - Porcentaje de células con pérdida
12/17p13.1					

- El valor discriminante (VD), definido como $(x_1 - x_2)^2 / (s_1^2 + s_2^2)$, en donde x_1 y s_1 se refieren a uno de los grupos de MI, displasia o cáncer, y x_2 y s_2 se refieren al grupo de los especímenes normales, se utilizó como una medida de la capacidad de ganar o perder un locus para distinguir entre una muestra procedente del grupo de pacientes que tienen DBG, DAG o AE y una muestra procedente del grupo de pacientes que no presentan una de estas anomalías (es decir, grupo de pacientes MI y normal). Valores de VD más elevados son indicativos de una mayor capacidad para distinguir entre los dos grupos de pacientes. Como otra medida de la discriminación, la prueba t de Student se aplicó a los porcentajes de células anormales de dos grupos de muestras diferentes, para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas (probabilidades <0,05 se consideraron significativas).
- Las sensibilidades y las especificidades se calcularon aplicando puntos de corte para los porcentajes de células que mostraban ganancias o pérdidas para cada uno de los 12 loci. Una muestra se consideraba positiva para la ganancia o pérdida de un locus, si el porcentaje de células con la ganancia o pérdida correspondiente excedía el punto de corte para ese locus. La sensibilidad para la detección de muestras con un diagnóstico particular era igual a la fracción de muestras en ese grupo que eran positivas. Las muestras que no proporcionaron al menos 50 células con señales de FISH de calidad suficiente para el recuento, fueron excluidas del cálculo. La especificidad en relación con un grupo testigo se calculó como uno menos la fracción de las muestras del grupo testigo que eran positivas empleando los mismos criterios (falsos positivos). Para combinaciones de sondas, se aplicaron puntos de corte a cada locus que era diana de forma independiente. Si alguno de los loci que era diana para la combinación de sondas, era positivo para el punto de corte respectivo, entonces la muestra se consideró positiva. El parámetro "distancia del ideal" (DFI), que incorpora tanto la sensibilidad como la especificidad, se utilizó para evaluar el rendimiento relativo de cada sonda o combinación de sondas. DFI se define como $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$. DFI es 0 para un ensayo con un rendimiento del 100% de sensibilidad y 100% de especificidad y se incrementa a 1,414 para un ensayo con 0% de especificidad y 0% de sensibilidad.
- La complementación de las sondas se evaluó mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores DFI para todas las combinaciones posibles de sondas hasta combinaciones de cuatro sondas, sobre una amplia gama de valores de corte. Solo las sondas que proporcionaban valores de p menores de 0,05 en el análisis de discriminación (Tabla 4), se utilizaron en estos cálculos a fin de reducir la probabilidad de que valores de DFI bajos fueran el resultado de la combinación de eventos aleatorios, y para reducir el tiempo de cálculo. Los valores de corte se calcularon entre 0 y 100% de células anormales en incrementos del 1% para cada sonda individual. Dado que cada sonda en una combinación puede tener un valor de corte óptimo diferente, los valores de corte variaron independientemente de cada sonda en una combinación particular. La variación independiente de los valores de corte entre 0 y 100% y 1% de incrementos de células no era práctica para las combinaciones de sondas, por lo que se calcularon primero los valores de corte basados en las desviaciones estándar del porcentaje medio de células anormales para cada locus y cada grupo de diagnóstico. Los valores de corte se generaron como $x + n*s$, en donde x y s son la media y la desviación estándar para un locus determinado en el grupo de muestras testigo (x y s para DBG se utilizaron para distinguir AE + DAG, y x y s para MI se utilizaron para distinguir DBG), y n es un multiplicador típicamente en el intervalo desde -1 a 5 en incrementos de 0,2. Para las combinaciones de sondas se calculó el valor de corte utilizando x y s para cada sonda en la combinación de forma individual, pero utilizando el mismo valor de n. Este procedimiento proporcionó valores de corte ajustados a cada sonda, basándose en el nivel de anomalía y el grado de variación en el grupo testigo. Para una primera aproximación, basándose en valores de corte en x y múltiplos comunes de s, se establece una especificidad similar con respecto al grupo testigo para cada sonda en la combinación de un conjunto particular de valores de corte (suponiendo una distribución normal del porcentaje de células anormales dentro del grupo testigo). Las sondas y combinaciones de sondas en cada valor de corte o conjunto de valores de corte se ordenaron de menor a mayor DFI, con el fin de identificar los mejores rendimientos. Los valores de corte óptimos para las combinaciones de sondas con mejor rendimiento (valores DFI más bajos) se refinaron adicionalmente mediante puntos de corte que variaban independientemente en incrementos del 1% de células anormales que flanqueaban los puntos de corte óptimos establecidos empleando x y s del grupo de muestras testigo.
- Las gráficas de característica operativa del receptor (Receiver Operator Characteristics, ROC) se generaron mediante el trazado de la sensibilidad frente a 1 - especificidad para una sonda particular o una combinación de sondas en el intervalo de valores de corte examinados (véase más arriba). Puesto que los valores de corte variados de forma independiente en las combinaciones de sondas generan múltiples valores de sensibilidad para cada valor de especificidad, solo el valor de la sensibilidad más elevada se trazó en cada valor de especificidad, lo que representaba la combinación óptima de valores de corte para cada especificidad. El rendimiento relativo de una sonda o una combinación de sondas se pudo evaluar a partir de estas curvas por las áreas bajo las curvas (mejor

rendimiento indicado por áreas más grandes) o por la distancia de máxima aproximación al punto (0,1) en el gráfico (100% de especificidad, 100% de sensibilidad). Obsérvese que la distancia de cualquier punto en las curvas al punto (0, 1) es igual al valor de DFI, y combinaciones de sondas con valores más bajos de DFI tienen mejor rendimiento que las que tienen valores más altos de DFI. Los valores de corte de células asociados con valores más bajos de DFI, se pueden utilizar a continuación como base para establecer valores de corte óptimos del ensayo, a pesar de que se pueden seleccionar puntos en la curva ROC con valores de DFI algo inferiores, después de considerar la importancia clínica relativa de la sensibilidad y la especificidad. Por ejemplo, un punto en la curva con una sensibilidad ligeramente superior, pero menor especificidad, podría ser elegido en vez de otro punto en la curva que tiene una sensibilidad menor y especificidad mayor, dependiendo de la necesidad médica.

10 Resultados

Análisis de la discriminación

La capacidad de cada sonda FISH para distinguir entre el grupo de pacientes que tiene DBG, DAG y AE y los pacientes que no tienen estas anomalías (es decir, los pacientes con diagnóstico "normal" o MI) se examinó inicialmente comparando la frecuencia de células anormales (no disómicas) dentro de cada categoría histológica. La Tabla 2 indica el número de muestras evaluadas (N), el porcentaje medio de células con ganancia o pérdida y la desviación estándar del porcentaje de células con ganancia o pérdida para cada locus y la proporción de locus dentro del grupo de muestras normales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada una de las categorías histológicas, pero por razones de brevedad, solo se indican los valores para DAG en la Tabla 3. La Tabla 3 también muestra los VDs y valores de p, cantidades que reflejan la capacidad de las sondas particulares o proporciones de sondas para diferenciar entre muestras DAG y normales. Los VDs y valores de p para todos los grupos histológicos en comparación con el grupo de muestras normales se indican en la Tabla 4. Los VDs y valores de p eran compatibles porque los valores de p más inferiores estaban acompañados por VD mayores. Las entradas de NA en la Tabla 4 para VD y los valores de p indican que la media del grupo de diagnóstico era menor que la del grupo normal.

25 Tabla 3. Porcentaje medio de células, desviación estándar, valor discriminante y valor de p de sondas para la ganancia o pérdida en muestras de DAG.

MUESTRA	Conjunto de muestras de DAG								
	N	Porcentaje medio de células con ganancia	SD - Porcentaje de células con ganancia	VD- Ganancia	Valor p - Ganancia	Porcentaje medio de células con pérdida	SD - Porcentaje de células con pérdida	VD- Pérdida	Valor p - Pérdida
5p15	66	9,69	21,26	0,20	< 0,01	5,52	10,91	0,11	0,01
5q21-22	66	5,45	11,46	0,20	< 0,01	5,27	10,29	0,08	0,04
CEP 7	67	17,08	26,03	0,41	< 0,01	2,27	1,84	0,01	0,49
7p12	67	17,40	25,85	0,42	< 0,01	1,99	2,30	< 0,01	0,65
8q24.12-13	67	21,64	27,44	0,59	< 0,01	1,63	1,65	0,01	0,54
CEP 9	66	7,79	15,34	0,25	< 0,01	4,33	8,44	0,04	0,13
9p21	66	1,95	3,48	0,14	0,01	27,20	30,26	0,61	< 0,01
CEP 17	67	9,85	19,29	0,25	< 0,01	5,72	4,33	0,01	0,43
17p13.1	67	1,56	2,34	0,13	0,01	12,82	16,46	0,23	< 0,01
17q11.2-12	67	14,99	23,88	0,35	< 0,01	3,08	3,27	0,04	0,17
20q13	67	18,18	24,84	0,49	< 0,01	1,85	1,82	0,01	0,62
CEP Y	62	2,03	10,45	0,03	0,22	27,39	31,64	0,64	< 0,01
5p15/5q21-22	66	9,82	19,58	0,15	< 0,01	4,90	10,64	0,08	0,03
7p12/CEP7	67	3,68	3,92	0,18	< 0,01	2,86	4,79	0,07	0,05
9p21/CEP9	66	2,08	2,28	0,08	0,06	26,69	30,16	0,59	< 0,01
17p13.1/CEP 17	67	4,06	2,91	< 0,01	0,67	18,95	23,81	0,42	< 0,01
17q11.2-12/CEP17	67	11,99	15,53	0,18	< 0,01	3,86	3,63	0,01	0,45

ES 2 528 382 T3

MUESTRA	Conjunto de muestras de DAG								
	N	Porcentaje medio de células con ganancia	SD - Porcentaje de células con ganancia	VD- Ganancia	Valor p - Ganancia	Porcentaje medio de células con pérdida	SD - Porcentaje de células con pérdida	VD- Pérdida	Valor p - Pérdida
17q11.2-12/17p13.1	67	24,15	26,80	0,52	< 0,01	2,41	1,84	0,18	0,01

Tabla 4. Valor discriminante y valor de p de la ganancia y pérdida por tipo de muestra histológica.

MUESTRA	Muestras de MI			Muestras de DBG			Muestras de DAG			Muestras de AE					
	VD, ganancia	p, ganancia	VD, pérdida	p, ganancia	VD, pérdida	p, pérdida	VD, ganancia	p, ganancia	VD, pérdida	p, pérdida	VD, ganancia	p, ganancia	VD, pérdida	p, pérdida	
5p15	0,12	0,08	< 0,01	0,94	0,27	0,02	< 0,01	0,74	0,20	0,11	0,01	0,45	0,02	0,08	0,26
5q21-22	0,03	0,35	N/A	N/A	0,07	0,20	N/A	N/A	0,20	0,08	0,04	0,43	0,02	0,31	0,03
CEP 7	0,23	0,02	< 0,01	0,62	0,08	0,19	0,05	0,25	0,41	< 0,01	0,49	0,52	0,01	0,03	0,44
7p12	0,12	0,08	0,04	0,31	0,08	0,19	0,04	0,31	0,42	< 0,01	0,65	0,70	< 0,01	N/A	N/A
8q24.12-13	0,11	0,08	0,12	0,07	0,09	0,16	0,02	0,50	0,59	N/A	N/A	0,54	< 0,01	0,06	0,29
CEP 9	0,06	0,20	N/A	N/A	0,09	0,16	N/A	N/A	0,25	0,04	0,13	0,49	0,01	N/A	N/A
9p21	< 0,01	1,00	0,15	0,05	0,05	0,26	0,49	< 0,01	0,14	0,61	< 0,01	0,28	0,05	0,51	0,01
CEP 17	0,17	0,05	0,02	0,45	0,06	0,24	0,04	0,31	0,25	0,01	0,43	0,72	< 0,01	N/A	N/A
17p13.1	< 0,01	0,96	0,06	0,22	< 0,01	0,71	0,06	0,25	0,13	0,23	< 0,01	0,26	0,06	0,15	0,14
17q11.2-12	N/A	N/A	< 0,01	0,75	0,06	0,26	N/A	N/A	0,35	N/A	N/A	0,69	< 0,01	N/A	N/A
20q13	0,10	0,10	0,09	0,12	0,09	0,17	< 0,01	0,89	0,49	< 0,01	0,62	0,54	< 0,01	N/A	N/A
CEP Y	0,04	0,33	0,05	0,28	N/A	N/A	0,19	0,08	0,03	0,64	< 0,01	0,06	0,35	0,83	< 0,01
5p/5q	0,01	0,98	N/A	N/A	N/A	N/A	0,04	0,32	0,15	0,08	0,03	0,41	0,02	0,04	0,44
7p/CEP7	0,03	0,41	< 0,01	0,79	0,01	0,57	N/A	N/A	0,18	0,07	0,05	0,25	0,07	N/A	N/A
9p/CEP9	N/A	N/A	0,15	0,05	N/A	N/A	0,48	< 0,01	N/A	0,59	< 0,01	N/A	N/A	0,60	< 0,01
17p/CEP17	0,01	0,58	0,09	0,14	0,02	0,47	0,13	0,09	N/A	0,42	< 0,01	N/A	N/A	0,51	0,01
17q/CEP17	0,02	0,51	0,04	0,31	0,10	0,13	< 0,01	0,62	0,18	0,01	0,45	0,40	0,02	N/A	N/A
17q/17p	0,06	0,24	0,01	0,74	0,11	0,12	N/A	N/A	0,52	N/A	N/A	0,54	< 0,01	N/A	N/A

- Los valores de p que figuran en la Tabla 4 indican que las ganancias de los centrómeros de los cromosomas 7 y 17 se producen en un porcentaje de células significativamente mayor en muestras de MI que en las muestras normales. Además, la pérdida del locus 9p21 se produce en un porcentaje de células significativamente mayor para muestras de MI que para las muestras normales. Para las muestras de DBG, la pérdida del locus 9p21, medida ya sea por el número de señales por célula o en relación con el número de señales CEP 9, era significativa. Valores de p menores y VDs mayores para las muestras de DBG, en comparación con las muestras de MI, indican que la pérdida del locus 9p21 puede distinguir mejor las muestras de DBG que las muestras de MI de las muestras normales. La ganancia del locus 5p15 era significativamente más frecuente en el grupo de muestras de DBG que en el grupo de muestras normales.
- El número de loci anormales era considerablemente mayor para las muestras de DAG que para muestras de MI o DBG (Tablas 3 y 4), mostrando todos los loci individuales y las relaciones de loci, ganancias significativamente elevadas en relación con el grupo normal, excepto para CEP Y y las relaciones de 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17. Niveles significativamente más elevados de pérdida eran evidentes para 5p15, 5q21-22, 9p21, 17p13.1, CEP Y, 5p15/5q21-22, 7p12/CEP 7, 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17.
- De manera similar a las muestras de DAG, muchas las muestras de AE (Tabla 4) mostraron un aumento significativo de los porcentajes de células con ganancia, en relación con las muestras normales, incluyendo todos los loci y relaciones de loci analizados excepto 17p13.1, CEP Y, 7p12/CEP 7, 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17. Un aumento significativo de los porcentajes de células con pérdida se encontró para 5q21-22, 9p21, CEP Y, 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17.
- Anomalía frente a progresión histológica
- Las Figuras 1A y 1B muestran el porcentaje medio de células que muestran ganancias o pérdidas, respectivamente en cada locus o proporción de loci para cada categoría histológica. Para un locus determinado o una relación de loci, los porcentajes medios de células con ganancia de locus, normalmente aumentaban con la progresión de normal a AE, teniendo lugar los incrementos máximos en las transiciones de DBG a DAG y DAG a AE. Las únicas desviaciones claras de esta tendencia fueron ganancia de CEP Y y las relaciones de 9p/CEP 9 y 17p/CEP 17. El mayor incremento en el número de células que mostraba ganancia de CEP Y se produjo en la transición de normal a MI, mientras que el nivel de ganancia era bastante insensible al estadio histológico para las relaciones de 9p/CEP 9 y 17p/CEP 17.
- El aumento más señalado en los porcentajes de células con ganancia de locus ocurrió generalmente en la transición de DBG a DAG. Esto era cierto para 5p15, CEP 7, 7p12, 8q24, CEP 9, CEP 17, 17q, 20q, 5p/5q y 17q/17p. Para 9p21, 17p, 7p/CEP 7 y 17q/CEP 17 el mayor aumento en el porcentaje de células que mostraban ganancia llegó con la progresión de DAG a AE, mientras que CEP Y era el único locus que mostraba el mayor incremento en la transición de normal a MI.
- Solo 9p21, 17p, CEP Y, 9p/CEP 9 y 17p/CEP 17 mostraron claramente el aumento de los niveles de pérdida con la progresión de la categoría histológica normal a AE. Para 9p21 y su relación con CEP 9, el aumento más acusado en el porcentaje de células que mostraban estas anomalías, se observó en la transición de MI a DBG, mientras que para 17p, 17p/CEP 17 y CEP Y el mayor aumento fue en la transición de DBG a DAG.
- Valores de las sensibilidades, especificidades y DFI para sondas individuales
- Se calcularon los valores de las sensibilidades, especificidades y DFI para sondas individuales en un intervalo de valores de corte. Para los grupos combinados de AE y DAG frente a los grupos de normal hasta DBG, los mejores valores de DFI (es decir, los valores más bajos de DFI) se obtuvieron por pérdida de CEP Y y ganancia de 8q24.12-13, 17q11.2-12, CEP 17, 7p12 y 20q13. De estas sondas, la pérdida de CEP Y y la ganancia de 8q24.12-13, 7p12 y 20q13 fueron identificadas acordemente por los diferentes métodos de evaluación del rendimiento de una sonda individual, en lo que se refiere a la transición de DBG a DAG. Además, las ganancias de 17q11.2-12, 17q11.2-12/CEP 17 y 17q11.2-12/17p12, todas destacaron con los diferentes métodos de análisis.
- Un análisis similar para el grupo de DBG frente a los grupos normal y MI combinados, reveló los mejores valores de DFI (es decir, los valores más bajos de DFI) para 9p21, 9p21/CEP 9, 5p15, CEP Y y CEP 17, así como la ganancia de 8q24.12-13 y 20q13. De estas sondas, 9p21 y 9p21/CEP 9 y en menor medida 5p15, fueron identificadas acordemente por los diferentes métodos de evaluación del rendimiento de sondas individuales, en lo que se refiere a la transición de MI a DBG.
- Análisis de complementación
- Con el fin de determinar qué sondas funcionan mejor en combinación, se realizó un análisis de complementación. Se calcularon los valores de las sensibilidades, especificidades y DFI para todas las posibles combinaciones de sondas para cada una de las categorías de diagnóstico. Se analizaron combinaciones de hasta 4 sondas, ya que cuatro sondas se combinan fácilmente en un conjunto de sondas multicolor, adecuado para el visionado a través del microscopio (marcadores que emiten luz visible). En el análisis inicial, los valores de corte se generaron como la media más múltiplos (n) de las desviaciones estándar de los porcentajes de células con ganancia o pérdida del

grupo menos anormal de los dos grupos de muestras que se estaban comparando (por ejemplo, muestras de normal + MI cuando se comparaban con muestras de DBG). La Tabla 5A muestra las combinaciones con mejor rendimiento de 4 sondas basadas en la DFI del adenocarcinoma + grupos de DAG, en relación con los grupos de normal + MI + DBG con los valores correspondientes de n, DFI, sensibilidad y especificidad. La Tabla 6A muestra las combinaciones con mejor rendimiento de 4 sondas basadas en la DFI del grupo de DBG frente a los grupos de normal + MI. Las Tablas 5C y 6C muestran las combinaciones de cuatro sondas y sus respectivos valores de DFI para DBG frente a normal + MI (meta), DAG frente a normal + MI + DBG, AE frente a normal + MI + DBG + DAG, y AE + DAG frente a normal + MI + DBG.

Para muchas de las combinaciones de sondas con mejores rendimientos mostradas en las Tablas 5A y 6A, siendo todas ellas combinaciones de sondas de la invención, los valores de corte óptimos se perfeccionaron aún más mediante la variación de forma independiente de los valores de corte en incrementos del 1% de células anormales para cada sonda en cada combinación, en un intervalo pequeño (por ejemplo, 10-20%) sobre valores de corte basados en los valores de n en las Tablas 5A y 6A. Los valores de corte óptimos perfeccionados y los valores de DFI para este proceso se muestran en las Tablas 5B y 6B.

Curvas Operativas del Receptor

Los diagramas ROC se generaron utilizando una cantidad de combinaciones de cuatro sondas, seleccionadas a partir del análisis de complementación. Las curvas ROC para algunas de las mejores combinaciones de cuatro sondas, a juzgar por los valores de DFI más bajos, se representan gráficamente en las Figuras 2 y 3. Las curvas ROC en la Figura 2 ilustran las relaciones entre la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras con AE más DAG en relación con el grupo colectivo de muestras normal, MI y DBG. La región de cada una de estas curvas que más se acerca el punto ideal de (0, 1) se produce cerca de valores con la misma sensibilidad y especificidad. Los puntos en estas curvas en donde la sensibilidad y la especificidad son iguales, están en un intervalo desde aproximadamente 77% a 80% (DFI = 0,32 a 0,28). Por lo tanto, de forma funcional, las combinaciones de sondas con mejor rendimiento pueden ser consideradas como aquellas combinaciones de sondas que pueden proporcionar valores de DFI inferiores a 0,33. Sin embargo, las combinaciones de sondas con valores de DFI > 0,33 todavía pueden ser valiosas. Se estima que la sensibilidad y la especificidad de una endoscopia corriente con biopsia son aproximadamente del 70% para distinguir AE + DAG de normal + MI + DBG. Esto se corresponde a un valor de DFI de 0,42. Por lo tanto, las combinaciones de sondas que proporcionan valores de DFI menores de 0,42, proporcionarían una mejora del rendimiento sobre la metodología existente, mientras que al mismo tiempo proporcionan un muestreo más simple y rápido durante la endoscopia. Las sondas que se han encontrado que son útiles en diversas combinaciones para detectar AE más DAG frente a normal hasta DBG, incluyen 5p15, 8q24.12-13, 7p12, 5q21-22, 9p21, CEP 17, 17p13.1, 17q11.2-12 y 20q13. 2 (ganancia en cada locus).

Las curvas ROC que se muestran en la Figura 3 ilustran las relaciones entre la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras de DBG en relación con muestras de normal + MI. Los puntos con la misma sensibilidad y especificidad están en el intervalo desde aproximadamente 55% a 70% (DFI = 0,64 a 0,42). Por lo tanto, combinaciones de sondas de acuerdo con su función que proporcionan valores de DFI inferiores a 0,64, se pueden considerar que son los mejores rendimientos. Las combinaciones de sondas que obtuvieron buenos resultados en la detección de AE + DAG y también mostraron la mejor utilidad en la detección de DBG frente a normal + MI, incluían 9p21 en la combinación de sondas. Obsérvese que para proporcionar la sensibilidad óptima para la detección de AE más DAG, se utilizó ganancia de 9p21 en los cálculos de la sensibilidad y especificidad, mientras que la pérdida de 9p21 fue óptima para la detección de DBG.

Tabla 5A. Valores de corte basados en medias (x) y múltiplos (n) de desviaciones estándar (s) del grupo de muestras de DBG y características del rendimiento resultante de combinaciones de 4 sondas para distinguir el grupo combinado de muestras de AE + DAG del grupo combinado de muestras de normal, MI y DBG.

				V/C	MI		DBG		DAG		AE		AE + DAG					
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	N	N	Sens	N	Sens	N	Sens	N	Sens	N	Sens	muest frente a norm	DFI frente a norm	espec frente a norm-DBG	DFI frente a norm-DBG
gan de 20q	gan de CEP 9	gan de 7p	gan de 5q	-	28	0,29	23	0,30	67	0,81	16	0,94	83	0,83	0,90	0,20	0,78	0,28
pérd de 17p	gan de 17q	gan de CEP 9	gan de 5p	0,0	26	0,15	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,94	0,25	0,84	0,29
pérd de 17p	gan de 20q	gan de 17q	gan de 5p	0,0	26	0,19	23	0,30	67	0,73	16	0,94	83	0,77	0,93	0,24	0,82	0,29
gan de	gan de	gan de	gan de	-	28	0,29	23	0,43	67	0,81	16	0,94	83	0,83	0,93	0,18	0,75	0,30

ES 2 528 382 T3

				V/C	MI		DBG		DAG		AE		AE + DAG					
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	N	N	Sens	N	Sens	N	Sens	N	Sens	N	Sens	muest frente a norm	DFI frente a norm	espec frente a norm-DBG	DFI frente a norm-DBG
CEP 9	8q	7p	5q	0,2														
gan de CEP 9	gan de 7p	gan de 5q	gan de 5p	- 0,2	28	0,29	23	0,35	67	0,76	17	0,88	84	0,79	0,97	0,22	0,79	0,30
pérd de 17p	gan de 17q	gan de 5q	gan de 5p	0,0	26	0,15	23	0,30	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,94	0,26	0,84	0,30
pérd de 17p	gan de 20q	gan de 17q	gan de 9p	0,2	25	0,08	23	0,30	67	0,70	15	0,93	82	0,74	0,86	0,29	0,83	0,31
pérd de 17p	gan de 17q	gan de CEP 17	gan de 5p	0,0	26	0,19	23	0,35	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,97	0,26	0,82	0,31
pérd de 17p	gan de 17q	gan de 8q	gan de 5p	0,0	26	0,27	23	0,30	67	0,73	16	0,94	83	0,77	0,93	0,24	0,79	0,31
pérd de 17p	gan de 17q	gan de 7p	gan de 5	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,93	0,25	0,81	0,31
pérd de 17p	gan de 17q	gan de CEP 7	gan de 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,93	0,25	0,81	0,31
gan de 20q	gan de 17q	gan de 8q	gan de 5p	0,0	26	0,27	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,96	0,24	0,81	0,31
gan de 20q	gan de 17q	gan de 9p	gan de 8q	0,0	25	0,20	23	0,26	67	0,73	15	0,93	82	0,77	0,83	0,29	0,79	0,31
pérd de 17p	gan de 20q	gan de 17q	gan de 9p	0,0	25	0,16	23	0,30	67	0,75	15	0,93	82	0,78	0,79	0,30	0,78	0,31
gan de 20q	gan de 17q	gan de 7p	gan de 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,96	0,26	0,82	0,31
gan de 20q	gan de 17q	gan de CEP 7	gan de 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,96	0,26	0,82	0,31

Tabla 5B. Valores de corte perfeccionados y características del rendimiento de las combinaciones de 4 sondas para distinguir el grupo combinado de muestras de AE y DAG del grupo combinado de muestras normal, MI y DBG.

Sondas				Valores de corte del porcentaje celular				Rendimiento		
1	2	3	4	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Sens	espec frente a norm-DBG	DFI frente a norm-DBG
gan de 20q	gan de CEP 9	gan de 7p	gan de 5q	11	1	2	1	0,82	0,81	0,26
pérd de 17p	gan de 17q	gan de CEP 9	gan de 5p	14	4	4	1	0,76	0,85	0,28
pérd de 17p	gan de 20q	gan de 17q	gan de 5p	13	14	4	1	0,77	0,84	0,28
gan de CEP 9	gan de 8q	gan de 7p	gan de 5q	1	3	2	2	0,81	0,80	0,28
gan de CEP 9	gan de 7p	gan de 5q	gan de 5p	1	2	1	2	0,79	0,81	0,28
pérd de 17p	gan de 17q	gan de 5q	gan de 5p	15	4	2	1	0,76	0,85	0,28
pérd de 17p	gan de 20q	gan de 17q	gan de 9p	15	12	4	1	0,78	0,83	0,28

ES 2 528 382 T3

Sondas				Valores de corte del porcentaje celular				Rendimiento		
1	2	3	4	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Sens	espec frente a norm-DBG	DFI frente a norm-DBG
pérd 17p	de gan 17q	de gan de CEP 17	de gan de 5p	15	4	10	1	0,75	0,85	0,29
pérd 17p	de gan 17q	de gan de 8q	de gan de 5p	15	7	3	1	0,81	0,79	0,28
pérd 17p	de gan 17q	de gan de 7p	de gan de 5p	17	6	2	1	0,80	0,79	0,29
pérd 17p	de gan 17q	de gan de CEP 7	de gan de 5p	15	4	17	1	0,76	0,84	0,29
gan 20q	de gan 17q	de gan de 8q	de gan de 5p	12	7	3	1	0,80	0,79	0,29
gan 20q	de gan 17q	de gan de 9p	de gan de 8q	15	7	1	3	0,80	0,79	0,29
pérd 17p	de gan 20q	de gan de 17q	de gan de 9p	15	12	4	1	0,78	0,83	0,28
gan 20q	de gan 17q	de gan de 7p	de gan de 5p	11	10	2	1	0,80	0,79	0,29
gan 20q	de gan 17q	de gan de CEP 7	de gan de 5p	14	4	14	1	0,84	0,75	0,30

Tabla 6A. Valores de corte basados en las medias (x) y múltiplos (n) de desviaciones estándar (s) del grupo de muestras de MI y características del rendimiento resultante de combinaciones de 4 sondas para distinguir muestras de DBG del grupo combinado de muestras de normal y MI.

				V/C		MI		DBG				DAG		AE		AE + DAG		
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	N	Sens	N	Sens	muest frente a norm	DFI frente a norm	espec frente a norm-MI	DFI frente a norm-MI	N	Sens	N	Sens	N	Sens	
pérd de 9p	pérd de CEP Y	gan de CEP 9	pérd de CEP 7	1,2	25	0,24	20	0,70	0,96	0,30	0,86	0,33	65	0,66	15	0,80	80	0,69
pérd de CEP Y	pérd de 9p	pérd de CEP 7	gan de 5q	1,2	25	0,24	20	0,70	0,96	0,30	0,86	0,33	64	0,67	15	0,80	79	0,70
pérd de CEP Y	pérd de 17q	pérd de 9p	pérd de CEP 7	1,2	25	0,28	18	0,72	0,88	0,30	0,80	0,34	63	0,57	14	0,57	77	0,57
pérd de CEP Y	gan de 20q	pérd de 9p	pérd de CEP 7	1,4	25	0,32	20	0,70	0,96	0,30	0,82	0,35	65	0,66	15	0,67	80	0,66
pérd de CEP Y	pérd de 9p	pérd de 7p	pérd de CEP 7	1,2	25	0,28	19	0,68	0,96	0,32	0,84	0,36	63	0,56	14	0,57	77	0,56
pérd de CEP Y	pérd de 9p	gan de 8q	pérd de CEP 7	1,2	25	0,24	18	0,67	0,96	0,34	0,86	0,36	64	0,56	15	0,60	79	0,57
gan de 20q	gan de 17q	pérd de 9p	gan de 8q	0,2	26	0,35	23	0,61	0,76	0,46	0,71	0,49	67	0,85	17	0,94	84	0,87

5 Tabla 6B. Valores de corte perfeccionados y características del rendimiento de combinaciones de 4 sondas para distinguir muestras de DBG del grupo combinado de muestras de normal y MI.

Sondas				Valores de corte del porcentaje celular				Rendimiento		
1	2	3	4	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Sens	espec frente a norm-MI	DFI frente a norm-MI
pérd de 9p	pérd de CEP Y	gan de CEP 9	pérd de CEP 7	14	13	1	4	0,80	0,80	0,29
pérd de CEP Y	pérd de 9p	pérd de CEP 7	gan de 5q	13	13	4	2	0,75	0,82	0,31
pérd de CEP Y	pérd de 17q	pérd de 9p	pérd de CEP 7	4	6	12	4	0,75	0,76	0,35
pérd de CEP Y	gan de 20q	pérd de 9p	pérd de CEP 7							
pérd de CEP Y	pérd de 9p	pérd de 7p	pérd de CEP 7							
pérd de CEP Y	pérd de 9p	gan de 8q	pérd de CEP 7							
gan de 20q	gan de 17q	pérd de 9p	gan de 8q	1	6	12	7	0,70	0,73	0,41

Tabla 6C

Sonda 1	Sonda 2	Sonda 3	Sonda 4	Punto corte (SD+media)	Normal		normal+metaplasia		normal+metaplasia+DBG		Barretts-no displasia		DBG		DAG		Adenocarcinoma		Adenocarcinoma+DAG										
					N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad	N	Especificidad					
9p/CEP9	perd CEP Y	perd CEP 9	gan CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,857	69	0,696	25	0,240	0,761	20	0,700	0,303	0,332	65	0,662	0,341	0,455	15	0,800	0,204	0,518	80	0,688	0,315	0,436
CEPY	perd 9p21	perd CEP 9	gan CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,857	69	0,696	25	0,240	0,761	20	0,700	0,303	0,332	65	0,662	0,341	0,455	15	0,800	0,204	0,518	80	0,688	0,315	0,436
CEPY	perd 9p21	perd CEP 7	perd 5q21-22	gan 1,20	24	0,958	49	0,857	69	0,696	25	0,240	0,761	20	0,700	0,303	0,332	64	0,672	0,331	0,448	15	0,800	0,204	0,521	79	0,696	0,307	0,430
CEPY	perd 9p21	perd CEP 7	perd 5p15	gan 1,20	24	0,958	49	0,857	69	0,696	25	0,240	0,761	20	0,700	0,303	0,332	64	0,672	0,331	0,448	15	0,800	0,204	0,518	80	0,700	0,303	0,427
CEPY	perd 17q11,2-12	perd 9p21	perd CEP 7	perd 1,20	24	0,875	49	0,788	69	0,657	25	0,280	0,731	18	0,722	0,306	0,345	63	0,571	0,446	0,549	14	0,571	0,446	0,624	77	0,671	0,448	0,549
CEPY	perd 20q13	gan 9p21	perd CEP 7	perd 1,40	24	0,958	49	0,816	68	0,657	25	0,320	0,681	20	0,700	0,303	0,332	65	0,662	0,341	0,475	15	0,687	0,338	0,585	80	0,663	0,340	0,474
CEPY	perd 9p21	perd 7p12	perd CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,837	68	0,691	25	0,280	0,721	19	0,684	0,319	0,355	63	0,558	0,446	0,541	14	0,571	0,431	0,605	77	0,658	0,444	0,539
CEPY	perd 9p21	perd CEP 7	perd CEP 7	gan 1,40	24	0,958	49	0,837	68	0,691	25	0,280	0,721	19	0,684	0,319	0,355	66	0,621	0,381	0,489	15	0,687	0,338	0,570	81	0,630	0,373	0,462
CEPY	perd CEP 17	perd 9p21	perd CEP 7	perd 1,20	24	0,875	49	0,755	68	0,618	25	0,380	0,652	19	0,737	0,219	0,358	64	0,683	0,455	0,581	14	0,571	0,448	0,656	78	0,664	0,453	0,580
9p/CEP9	perd CEP Y	perd 9p21	perd CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,857	67	0,718	25	0,240	0,761	18	0,667	0,338	0,363	63	0,506	0,494	0,588	14	0,571	0,431	0,581	77	0,619	0,482	0,558
7p/CEP7	gan CEP Y	perd 9p21	perd CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,857	67	0,718	25	0,240	0,761	18	0,667	0,338	0,363	63	0,506	0,494	0,588	15	0,733	0,270	0,474	78	0,651	0,451	0,531
CEPY	perd 17p13.1	perd 9p21	perd CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,857	67	0,718	25	0,240	0,761	18	0,667	0,338	0,363	63	0,540	0,482	0,541	14	0,571	0,431	0,662	77	0,645	0,456	0,538
CEPY	perd 9p21	perd 9p24,12-13	gan CEP 7	perd 1,20	24	0,958	49	0,857	67	0,718	25	0,240	0,761	18	0,667	0,338	0,363	64	0,583	0,439	0,521	15	0,800	0,402	0,580	79	0,570	0,432	0,515

Conjunto de sondas 8q24.12-13, 9p21, 17q11.2-12 y 20q13

Uno de los conjuntos de sondas con mejor rendimiento en las Figuras 2 y 3 es el conjunto de 8q24.12-13, 9p21, 17q11.2-12 y 20q13. Las curvas ROC solo para esta combinación de sondas se muestran en la Figura 4. Estas curvas ROC incluyen las especificidades y sensibilidades para la detección de AE, DAG y DBG individualmente frente a muestras normales, así como muestras de AE + DAG frente a muestras normales. Una igualdad en la sensibilidad y especificidad se produce a aproximadamente el 80% (DFI = 0,29) para muestras de AE + DAG frente a muestras de normal + MI + DBG, y a aproximadamente el 70% (DFI = 0,42) para muestras de DBG frente a muestras de normal + MI. Los valores de corte utilizados para lograr estos valores de DFI se muestran en las Tablas 5 y 6 (valores de corte perfeccionados). Las curvas ROC para la detección de muestras de AE frente a muestras normales mostraron un mejor rendimiento que curvas similares para muestras de DAG frente a muestras normales, y las curvas ROC para muestras de DAG frente a muestras normales mostraron un mejor rendimiento que las curvas para DBG frente a normal. Esto se espera ya que las muestras de AE en promedio tienen mayores porcentajes de células anormales que las muestras de DAG, y las muestras de DAG tienen mayores porcentajes de células anormales que las muestras de DBG (véanse las Figuras 1A y 1B), lo que permite el uso de valores de corte más elevados para mejorar la especificidad, mientras que la sensibilidad disminuye de forma mínima. El rendimiento es menor para muestras de AE + DAG frente a muestras de normal + MI + DBG que para muestras de AE + DAG frente a solo muestras normales. Esto no es sorprendente, ya que es probable que algunos de los pacientes del grupo de DBG en particular, tenían lesiones DAG que no se sometieron a biopsia pero que se sometieron al ensayo FISH. Estos casos podrían aparecer como resultados falsos positivos mediante FISH y, por consiguiente, aparecieron como falsos positivos en nuestros análisis (véase más abajo).

Casos positivos anticipados

"Los resultados de FISH "falsos positivos" (es decir, un resultado positivo de FISH para un paciente con un resultado patológico negativo) se esperaban y se observaron a lo largo del estudio. Las posibles explicaciones para los resultados de FISH "falsos positivos" incluyen: 1) el resultado de FISH es verdaderamente falso positivo para una anomalía, 2) FISH está detectando una lesión que no se había sometido a biopsia debido a la toma de muestras incompleta realizada por el endoscopista, 3) la biopsia fue interpretada erróneamente como normal por el patólogo, o 4) FISH está detectando cambios genéticos antes de que se puedan identificar los cambios histológicos. Una proporción significativa de los resultados "falsos positivos" de FISH no se cree que sean resultados verdaderamente falsos positivos, sino que cree que representan casos en los que FISH ha detectado una anomalía que no se había detectado por la "regla de oro" (es decir, biopsia). Este fenómeno se ha observado previamente cuando se utiliza FISH para detectar cáncer de vejiga recurrente en pacientes en los que se está vigilando la recurrencia del tumor. El seguimiento a largo plazo de estos pacientes ha mostrado que una alta proporción de estos pacientes con resultados de FISH de falsos positivos evidentes, desarrollan eventualmente un tumor demostrado por biopsia. Por esta razón, los resultados "falsos positivos" se denominan a veces resultados positivos anticipados de FISH, ya que con frecuencia representan casos en los que se ha detectado el tumor antes de que se pueda identificar por otros medios. Se necesita el seguimiento de los datos para determinar si los resultados "falsos positivos" de FISH observados con los conjuntos de sondas para esófago de Barrett, son realmente positivos anticipados.

Ejemplo 2

Detección de cáncer de esófago

A modo de ejemplificación no limitante de la presente invención, el conjunto de sondas de cuatro colores 8q24.12-13, 9p21, 17q11.2-12 y 20q13, descrito en el Ejemplo 1 anterior, se utilizó para evaluar en las muestras de esófago por cepillado, la presencia de células que tienen anomalías cromosómicas acordes con un diagnóstico de DBG, DAG o AE. Las muestras se prepararon para una hibridación FISH y se sometieron a hibridación con el conjunto de sondas tal y como se ha descrito en el estudio de selección de sondas (Ejemplo 1, más arriba) y tal como se describe a continuación. Para los casos en los que el recuento inicial de 100 células era negativo para polisomía, el resto del portaobjetos se analizó en busca de células morfológicamente anormales (p. ej., ampliación nuclear, irregularidad nuclear y tinción moteada de la cromatina) y se registraron también los patrones de hibridación FISH de estas células.

Recogida de células

Un tubo de centrifuga de 50 ml y un tubo de microcentrifuga de 1,8 ml fueron marcados con identificadores de pacientes apropiados. El recipiente de la muestra (recipiente de la solución PreservCyt® que contenía el cepillo esofágico) se agitó vigorosamente de forma manual para volver a suspender las células. La solución en el recipiente de la muestra fue transferida al tubo de centrifuga de 50 ml, asegurándose de dejar el cepillo citológico en el recipiente de la muestra. Veinte ml de fijador metanol: ácido acético 3:1 se añadió al recipiente de la muestra. El contenido del recipiente de la muestra (fijador y cepillo) se transfirieron luego a una placa Petri. El cepillo se raspó manualmente con un escalpelo en el fijador y la solución en la placa Petri se puso a continuación de nuevo en el recipiente de la muestra. El cepillo se retiró. Después, la solución en el recipiente de la muestra se transfirió al tubo de 50 ml marcado. Diez ml de fijador metanol:ácido acético 3:1 se añadieron al recipiente de la muestra. El

recipiente de la muestra se agitó fuertemente a mano para eliminar cualquier célula residual y se transfirió al tubo de 50 ml. El recipiente de la muestra se retiró.

5 La solución en el tubo de 50 ml se centrifugó a 800 g durante ocho minutos. Todo menos aproximadamente 5 ml del material sobrenadante se eliminó por aspiración al vacío. Diez ml de metanol:ácido acético 3:1 se añadieron al tubo de 50 ml y el sedimento celular se resuspendió suavemente. Después, la solución se centrifugó a 300 g durante ocho minutos. El material sobrenadante se aspiró después, asegurándose de dejar aproximadamente 2 ml de la solución en la parte superior del sedimento. El sedimento se resuspendió de nuevo. La muestra se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,8 ml marcado previamente, usando una pipeta desechable y se almacenó a 4°C. Para la conservación a largo plazo, la muestra se almacenó en el mismo tubo de microcentrífuga de 1,8 ml a -70°C, asegurándose de que el tubo se llenaba hasta la parte superior con fijador metanol:ácido acético 3:1 antes del almacenamiento.

Preparación de portaobjetos

15 El tubo de microcentrífuga de 1,8 ml que contenía la muestra deseada, se colocó en una centrífuga equilibrada y se centrifugó a 800 g durante dos minutos. Una pipeta desechable se utilizó para eliminar la mayor parte de la capa superior de fijador, por lo general hasta la línea de 0,25 ml. Un portaobjetos marcado con identificadores de un paciente adecuado se colocó sobre una placa caliente a 45°C. Una pipeta se utilizó para volver a suspender el sedimento celular y se pipetearon 10 µl de la solución en un anillo impreso de 10 mm del portaobjetos. El portaobjetos se examinó a continuación con un microscopio de contraste de fases para evaluar la celularidad (es decir, la densidad de las células). Si la celularidad era inadecuada, cantidades adicionales del sedimento se añadieron gota a gota en el portaobjetos 10 µl hasta un momento en el que se logró la celularidad adecuada (el mayor número de células por anillo con superposición celular mínima). Si la celularidad era demasiado elevada, el sedimento de la muestra se diluyó con fijador metanol:ácido acético 3:1 y el proceso anterior se repitió sobre un nuevo anillo impreso.

Pretratamiento

25 Si un portaobjetos se había preparado el mismo día de la hibridación, el portaobjetos se colocó sobre una placa caliente a 45°C durante 15 minutos; de lo contrario el portaobjetos no requería esta etapa. Los productos químicos y los portaobjetos se cargaron en un procesador VP2000 y los portaobjetos se hicieron pasar a través de las siguientes soluciones: 1) 37°C, 2,0x SSC (citrato sódico y solución salina) durante 10 minutos; 2) 37°C, solución de trabajo de pepsina al 0,005% (pH 2,0) durante 13 minutos; 3) temperatura ambiente, PBS, solución de formaldehído al 1% y luego PBS de nuevo aporte a temperatura ambiente, durante cinco minutos cada una; 4) temperatura ambiente, etanol al 70%, etanol al 85% y luego etanol al 100% durante dos minutos cada uno. Los portaobjetos se dejaron secar al aire.

Desnaturalización/hibridación

35 Cuatro µl de la mezcla de sondas se colocaron en el anillo impreso sobre el portaobjetos que contenía las células a las que se iban a hibridar las sondas. Un cubreobjetos circular de 12 mm se colocó sobre el área de la hibridación y los bordes del cubreobjetos se sellaron con un lecho continuo de pegamento de caucho. El portaobjetos se colocó en un sistema de desnaturalización/hibridación HyBrite® y los canales se llenaron con agua. Los portaobjetos se calentaron a 73°C durante tres minutos y luego se mantuvieron a 37°C durante un mínimo de ocho horas.

Lavado y contratinción

40 Los portaobjetos se sacaron del HyBrite® y se retiró el pegamento de caucho. Si el cubreobjetos no se había desprendido con la eliminación del pegamento de caucho, los portaobjetos se sumergieron a temperatura ambiente en 0,1% de NP-40/2,0 x SSC hasta que el cubreobjetos se separó por sí mismo. Los portaobjetos se colocaron a continuación en un tarro de tinción Coplin que contenía a 73°C, 0,1% de NP-40/2, 0x SSC durante un mínimo de dos minutos. Los portaobjetos se colocaron después a temperatura ambiente en 0,1% de NP-40/2,0x SSC durante un mínimo de cinco minutos. Empleando una pipeta, se aplicaron 10 µl de contratinción DAPI-I (1000 ng de DAPI/ml en solución de montaje antifade) al anillo de hibridación. Un cubreobjetos de 24 x 50 se colocó encima de cada portaobjetos. Un papel absorbente se colocó en la parte superior del cubreobjetos para eliminar cualquier exceso de líquido. Con el extremo de plástico de la pipeta se presionó ligeramente a través del cubreobjetos para eliminar las burbujas de aire. La parte posterior de cada portaobjetos se limpió con un papel absorbente y se colocó en una bandeja para el análisis.

Análisis

55 Una gota de aceite de inmersión se colocó directamente en el cubreobjetos por encima del anillo hibridado. Los portaobjetos fueron evaluados con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros para ver la contratinción DAPI, los fluoróforos Spectrum-Red/Spectrum-Green®, Spectrum-Red®, Spectrum-Green®, Spectrum-Aqua® y Spectrum-Gold®. Se realizó una exploración inicial rápida del portaobjetos para evaluar la calidad de la señal y para determinar si la hibridación había tenido éxito. El portaobjetos se analizó después microscópicamente empezando en un borde del anillo de hibridación y procediendo de una manera sistemática hacia el extremo opuesto del anillo,

utilizando un objetivo de 40x o 63x (Figura 5). Los patrones de las señales para cada una de las cuatro sondas (p. ej., 8q24, 9p21, 17q11, 20q13) se registraron a continuación para un centenar de células consecutivas no escamosas, no inflamatorias. En los casos en los que solo se observaban células escamosas, los patrones de las señales se contaron en estas células, asegurándose de que solo se observaron células escamosas. Si se observan cinco o más células con polisomía (es decir, ganancias de dos o más de las cuatro sondas) en el recuento inicial de 100 células, no se requiere un análisis más a fondo. Sin embargo, si se observan menos de cinco células con polisomía, el resto del portaobjetos se puede analizar en busca de células que tienen características morfológicas nucleares sospechosas de neoplasia (p. ej., ampliación nuclear, irregularidad nuclear, tinción moteada de la cromatina) y los patrones de las señales de esas células se registraron señalando que se habían observado mediante barrido y no como parte del recuento de 100 células. Obsérvese que este proceso de barrido es esencialmente idéntico al descrito en los documentos de Patente de Estados Unidos n° 6.376.188 y 6.17468, que se incorporan en este documento como referencia.

Después de completar el recuento de las 100 células, los recuentos celulares se evaluaron para determinar si había una o varias anomalías cromosómicas presentes que eran acordes con un diagnóstico de displasia o AE. Las alteraciones cromosómicas que se observaron y que eran acordes con un diagnóstico de displasia o adenocarcinoma, incluyen: polisomía (es decir, ganancias de dos o más señales), tetrasomía, ganancias de una sola señal, amplificación (p. ej., amplificación de HER-2) y deleciones (p. ej., delección de 9p21).

Criterios para el diagnóstico.

Las muestras se consideraron positivas si cumplían los siguientes criterios:

- $\geq 13\%$ de las células que presentan pérdida hemicigota y/o homocigota de 9p21 (más compatible con un diagnóstico de displasia de bajo grado)
- $\geq 4\%$ de las células que presentan ganancia de 8q24 (más compatible con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)
- $\geq 8\%$ de las células que presentan ganancia de 17q11 (más compatible con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)
- $\geq 16\%$ de las células que presentan ganancia de 20q13 (más compatible con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma).
- $\geq 3\%$ de las células que presentan polisomía (más compatible con un diagnóstico de displasia de alto grado/adenocarcinoma)

Los siguientes ejemplos representativos muestran resultados de recuento FISH (es decir, recuentos de 100 células) y su interpretación para cuatro pacientes, utilizando la mezcla FISH de cuatro sondas que contiene sondas para 8q24, 9p21, 17q11 y 20q13. Estos ejemplos ilustran cómo se puede utilizar el conjunto de sondas para detectar displasia y adenocarcinoma en pacientes con esófago de Barrett.

Paciente 1

Los resultados del recuento de cien células para este paciente se muestran a continuación (Tabla 7). Las células con patrones de señales anormales (es decir, células cuyos patrones de señales no mostraban dos copias para cada una de las cuatro sondas) se muestran primero. Los resultados del recuento muestran que 41 de las células (las 41 primeras mostradas en la tabla) mostraron polisomía (es decir, ganancias de dos o más de las cuatro sondas). Las 59 células restantes se consideraron normales. Las dos células (células 42 y 43) que no tenían el patrón normal esperado de dos señales por loci, no se consideraron anormales ya que no se alcanzó el valor de corte para este tipo de anomalía. Esta muestra del paciente se consideró positiva para tumor y los resultados son más acordes con el diagnóstico de DAG/AE.

TABLA 7 – Muestra del paciente considerada positiva para DAG/AE

Cél.	nº de señales				Cél.	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	4	6	5	7	51	2	2	2	2
2	4	6	5	8	52	2	2	2	2
3	4	5	4	8	53	2	2	2	2
4	4	5	5	8	54	2	2	2	2
5	4	4	5	8	55	2	2	2	2
6	4	4	5	8	56	2	2	2	2
7	3	4	5	6	57	2	2	2	2
8	3	3	5	6	58	2	2	2	2
9	3	3	6	5	59	2	2	2	2
10	3	5	4	6	60	2	2	2	2
11	3	5	4	6	61	2	2	2	2
12	3	5	4	6	62	2	2	2	2
13	3	4	4	6	63	2	2	2	2
14	3	4	4	5	64	2	2	2	2
15	3	4	4	5	65	2	2	2	2
16	3	4	4	5	66	2	2	2	2
17	3	4	4	5	67	2	2	2	2
18	3	4	4	5	68	2	2	2	2
19	3	4	4	4	69	2	2	2	2
20	2	4	4	6	70	2	2	2	2
21	3	3	4	6	71	2	2	2	2
22	3	3	4	6	72	2	2	2	2
23	3	3	4	6	73	2	2	2	2
24	3	3	4	6	74	2	2	2	2
25	3	3	4	6	75	2	2	2	2
26	3	3	4	6	76	2	2	2	2
27	3	3	4	5	77	2	2	2	2
28	3	2	4	6	78	2	2	2	2
29	3	2	4	6	79	2	2	2	2
30	3	2	4	6	80	2	2	2	2

31	3	2	4	4	81	2	2	2	2
32	2	2	3	6	82	2	2	2	2
33	2	2	4	6	83	2	2	2	2
34	2	2	4	4	84	2	2	2	2
35	2	2	4	4	85	2	2	2	2
36	1	2	4	4	86	2	2	2	2
37	1	2	4	4	87	2	2	2	2
38	1	2	4	4	88	2	2	2	2
39	1	2	4	4	89	2	2	2	2
40	2	2	3	5	90	2	2	2	2
41	2	2	4	4	91	2	2	2	2
42	1	2	2	2	92	2	2	2	2
43	2	1	2	2	93	2	2	2	2
44	2	2	2	2	94	2	2	2	2
45	2	2	2	2	95	2	2	2	2
46	2	2	2	2	96	2	2	2	2
47	2	2	2	2	97	2	2	2	2
48	2	2	2	2	98	2	2	2	2
49	2	2	2	2	99	2	2	2	2
50	2	2	2	2	100	2	2	2	2

* Las células polisómicas están en negrita

Paciente 2

5 Los resultados del recuento de cien células para este paciente se muestran a continuación (Tabla 8). Las células con patrones de señales anormales (es decir, células cuyos patrones de señales no mostraban dos copias para cada una de las cuatro sondas) se muestran primero. Los resultados del recuento muestran 23 células con una ganancia de 8q24. Las 77 células restantes se consideraron normales. Esta muestra del paciente se consideró positiva y los resultados son más acordes con el diagnóstico de DAG/AE.

TABLA 8 – Muestra del paciente considerada positiva para DAG/AE

Cél.	nº de señales				Cél.	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	1	2	5	2	51	2	2	2	2

2	1	2	4	2
3	2	2	4	2
4	2	2	4	2
5	1	2	3	2
6	2	1	3	2
7	2	2	3	2
8	2	2	3	2
9	2	2	3	2
10	2	2	3	2
11	2	2	3	2
12	2	2	3	2
13	2	2	3	2
14	2	2	3	2
15	2	2	3	2
16	2	2	3	2
17	2	2	3	2
18	2	2	3	2
19	2	2	3	2
20	2	2	3	2
21	2	2	3	2
22	2	2	3	2
23	2	2	3	2
24	2	2	2	2
25	2	2	2	2
26	2	2	2	2
27	2	2	2	2
28	2	2	2	2
29	2	2	2	2
30	2	2	2	2
31	2	2	2	2
32	2	2	2	2
33	2	2	2	2
34	2	2	2	2
35	2	2	2	2
36	2	2	2	2
37	2	2	2	2
38	2	2	2	2
39	2	2	2	2
40	2	2	2	2
41	2	2	2	2
42	2	2	2	2

52	2	2	2	2
53	2	2	2	2
54	2	2	2	2
55	2	2	2	2
56	2	2	2	2
57	2	2	2	2
58	2	2	2	2
59	2	2	2	2
60	2	2	2	2
61	2	2	2	2
62	2	2	2	2
63	2	2	2	2
64	2	2	2	2
65	2	2	2	2
66	2	2	2	2
67	2	2	2	2
68	2	2	2	2
69	2	2	2	2
70	2	2	2	2
71	2	2	2	2
72	2	2	2	2
73	2	2	2	2
74	2	2	2	2
75	2	2	2	2
76	2	2	2	2
77	2	2	2	2
78	2	2	2	2
79	2	2	2	2
80	2	2	2	2
81	2	2	2	2
82	2	2	2	2
83	2	2	2	2
84	2	2	2	2
85	2	2	2	2
86	2	2	2	2
87	2	2	2	2
88	2	2	2	2
89	2	2	2	2
90	2	2	2	2
91	2	2	2	2
92	2	2	2	2

43	2	2	2	2
44	2	2	2	2
45	2	2	2	2
46	2	2	2	2
47	2	2	2	2
48	2	2	2	2
49	2	2	2	2
50	2	2	2	2

93	2	2	2	2
94	2	2	2	2
95	2	2	2	2
96	2	2	2	2
97	2	2	2	2
98	2	2	2	2
99	2	2	2	2
100	2	2	2	2

* Las células con una ganancia de la sonda 8q24 están en negrita.

Paciente 3

5 Los resultados del recuento de cien células para este paciente se muestran a continuación (Tabla 9). Las células con patrones de señales anormales (es decir, células cuyos patrones de señales no mostraban dos copias para cada una de las cuatro sondas) se muestran primero. Los resultados de recuento muestran que 52 de las células (las 52 primeras que se muestran en la tabla) mostraron pérdida homocigota o hemicigota de 9p21. Las 48 células restantes se consideraron normales. La célula 53, que tenía un patrón de señales de 2,2,1,2 no tenía el patrón normal esperado de dos señales por loci, pero se consideró normal ya que no se alcanzó el valor de corte para este tipo de anomalía (es decir, monosomía 8q24). Esta muestra del paciente se consideró positiva y los resultados son más
10 acordes con el diagnóstico de DBG.

TABLA 9 – Muestra de paciente considerada positiva para DBG

Cél.	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13
1	0	1	2	2
2	0	2	2	2
3	0	2	2	2
4	0	2	2	2
5	0	2	2	2
6	0	2	2	2
7	0	2	2	2

Cél.	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13
51	1	2	2	2
52	1	2	2	2
53	2	2	1	2
54	2	2	2	2
55	2	2	2	2
56	2	2	2	2
57	2	2	2	2

8	0	2	2	2
9	0	2	2	2
10	0	2	2	2
11	0	2	2	2
12	0	2	2	2
13	0	2	2	2
14	0	2	2	2
15	0	2	2	2
16	1	1	2	2
17	1	2	1	2
18	1	2	2	2
19	1	2	2	2
20	1	2	2	2
21	1	2	2	2
22	1	2	2	2
23	1	2	2	2
24	1	2	2	2
25	1	2	2	2
26	1	2	2	2
27	1	2	2	2
28	1	2	2	2
29	1	2	2	2
30	1	2	2	2
31	1	2	2	2
32	1	2	2	2
33	1	2	2	2
34	1	2	2	2
35	1	2	2	2
36	1	2	2	2
37	1	2	2	2
38	1	2	2	2
39	1	2	2	2
40	1	2	2	2
41	1	2	2	2
42	1	2	2	2
43	1	2	2	2
44	1	2	2	2
45	1	2	2	2
46	1	2	2	2
47	1	2	2	2
48	1	2	2	2

58	2	2	2	2
59	2	2	2	2
60	2	2	2	2
61	2	2	2	2
62	2	2	2	2
63	2	2	2	2
64	2	2	2	2
65	2	2	2	2
66	2	2	2	2
67	2	2	2	2
68	2	2	2	2
69	2	2	2	2
70	2	2	2	2
71	2	2	2	2
72	2	2	2	2
73	2	2	2	2
74	2	2	2	2
75	2	2	2	2
76	2	2	2	2
77	2	2	2	2
78	2	2	2	2
79	2	2	2	2
80	2	2	2	2
81	2	2	2	2
82	2	2	2	2
83	2	2	2	2
84	2	2	2	2
85	2	2	2	2
86	2	2	2	2
87	2	2	2	2
88	2	2	2	2
89	2	2	2	2
90	2	2	2	2
91	2	2	2	2
92	2	2	2	2
93	2	2	2	2
94	2	2	2	2
95	2	2	2	2
96	2	2	2	2
97	2	2	2	2
98	2	2	2	2

49	1	2	2	2
50	1	2	2	2

99	2	2	2	2
100	2	2	2	2

* Las células con una ganancia de la sonda 8q24 están en negrita.

Paciente 4

5 Los resultados del recuento de cien células para este paciente se muestran a continuación (Tabla 10). Las células con patrones de señales anormales (es decir, células cuyos patrones de señales no mostraban dos copias para cada una de las cuatro sondas) se muestran primero. Los resultados del recuento muestran tres células (células 1-3) que no tenían el patrón normal esperado de dos señales por loci, sin embargo estas células no fueron consideradas anormales, ya que no se alcanzó al valor de corte para cualquier anomalía. Esta muestra del paciente se consideró negativa.

TABLA 10 – Muestra de paciente considerada negativa

Cél.	nº de señales				Cél.	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	1	1	2	2	51	2	2	2	2
2	2	1	2	2	52	2	2	2	2
3	2	2	2	1	53	2	2	2	2
4	2	2	2	2	54	2	2	2	2
5	2	2	2	2	55	2	2	2	2
6	2	2	2	2	56	2	2	2	2
7	2	2	2	2	57	2	2	2	2
8	2	2	2	2	58	2	2	2	2
9	2	2	2	2	59	2	2	2	2
10	2	2	2	2	60	2	2	2	2
11	2	2	2	2	61	2	2	2	2
12	2	2	2	2	62	2	2	2	2
13	2	2	2	2	63	2	2	2	2
14	2	2	2	2	64	2	2	2	2
15	2	2	2	2	65	2	2	2	2
16	2	2	2	2	66	2	2	2	2
17	2	2	2	2	67	2	2	2	2
18	2	2	2	2	68	2	2	2	2
19	2	2	2	2	69	2	2	2	2
20	2	2	2	2	70	2	2	2	2

21	2	2	2	2
22	2	2	2	2
23	2	2	2	2
24	2	2	2	2
25	2	2	2	2
26	2	2	2	2
27	2	2	2	2
28	2	2	2	2
29	2	2	2	2
30	2	2	2	2
31	2	2	2	2
32	2	2	2	2
33	2	2	2	2
34	2	2	2	2
35	2	2	2	2
36	2	2	2	2
37	2	2	2	2
38	2	2	2	2
39	2	2	2	2
40	2	2	2	2
41	2	2	2	2
42	2	2	2	2
43	2	2	2	2
44	2	2	2	2
45	2	2	2	2
46	2	2	2	2
47	2	2	2	2
48	2	2	2	2
49	2	2	2	2
50	2	2	2	2

71	2	2	2	2
72	2	2	2	2
73	2	2	2	2
74	2	2	2	2
75	2	2	2	2
76	2	2	2	2
77	2	2	2	2
78	2	2	2	2
79	2	2	2	2
80	2	2	2	2
81	2	2	2	2
82	2	2	2	2
83	2	2	2	2
84	2	2	2	2
85	2	2	2	2
86	2	2	2	2
87	2	2	2	2
88	2	2	2	2
89	2	2	2	2
90	2	2	2	2
91	2	2	2	2
92	2	2	2	2
93	2	2	2	2
94	2	2	2	2
95	2	2	2	2
96	2	2	2	2
97	2	2	2	2
98	2	2	2	2
99	2	2	2	2
100	2	2	2	2

Otras realizaciones

Se ha de entender que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones de la invención están dentro del alcance de las reivindicaciones expuestas a continuación.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un carcinoma de esófago o una lesión precursora en un sujeto, comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células del esófago procedentes del sujeto con un conjunto de sondas cromosómicas, en donde dicho conjunto consiste en una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 20q13 y una sonda específica del locus 9p21; y
- 10 b) detectar un patrón de hibridación para el conjunto de sondas cromosómicas con la muestra biológica, en donde el patrón de hibridación es indicativo de la presencia o ausencia de un carcinoma de esófago o de una lesión precursora.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la lesión precursora de carcinoma detectada selectivamente es o bien:
- a) displasia de bajo grado (DBG), o
- b) se selecciona entre el grupo que consiste en displasia de alto grado (DAG) y adenocarcinoma de esófago (AE).
- 15 3. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra biológica comprende células obtenidas a partir de una muestra seleccionada a partir del grupo que consiste en una biopsia, una muestra citológica y una muestra extirpada; y en cuyo caso opcionalmente la muestra biológica comprende un espécimen citológico por cepillado.
4. El método según la reivindicación 1, en el que las sondas cromosómicas están marcadas con fluorescencia.
- 20 5. El método según la reivindicación 1, en el que el sujeto ha sido diagnosticado con una afección seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedad crónica por reflujo gastroesofágico y esófago de Barrett.
6. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica está incluida en parafina.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el patrón de hibridación o bien:
- a) se detecta en células que proceden de la muestra biológica que se han seleccionado previamente basándose en anomalías en el tamaño del núcleo, la forma del núcleo o la tinción del núcleo; o
- 25 b) se evalúa por las ganancias y las pérdidas.
8. Una composición que comprende un conjunto de sondas cromosómicas, en donde el conjunto de sondas cromosómicas es capaz de detectar selectivamente un carcinoma de esófago o una lesión precursora en una muestra biológica y el conjunto de sondas consiste en una sonda específica del locus 20q13, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 9p21 y una sonda específica del locus 8q24.12-13.
- 30 9. La composición según la reivindicación 8, en donde la lesión precursora de carcinoma es o bien displasia de bajo grado (DBG) o se selecciona entre el grupo que consiste en displasia de alto grado (DAG) y adenocarcinoma de esófago (AE).

Figura 1A. Porcentaje medio de células con ganancia en cada locus y proporción de loci para cada categoría histológica

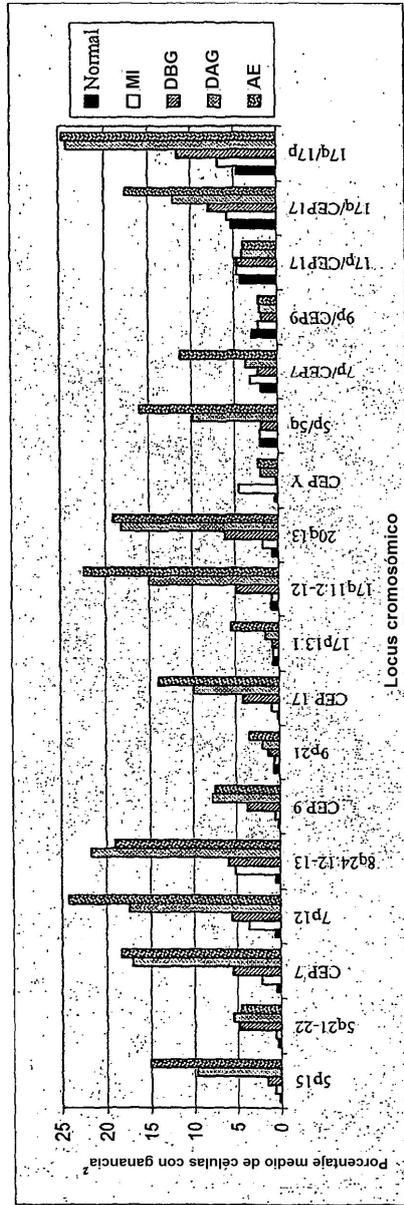


FIG. 1A

Figura 1B. Porcentaje medio de células con pérdida en cada locus y proporción de loci para cada categoría histológica.

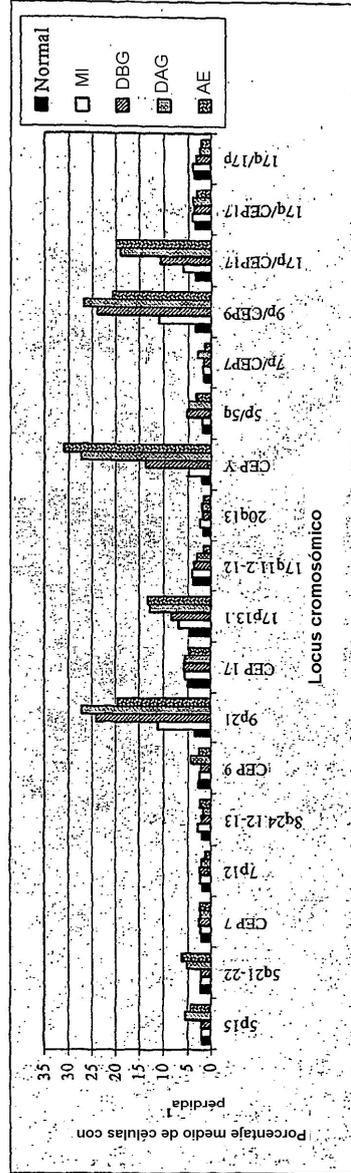


FIG. 1B

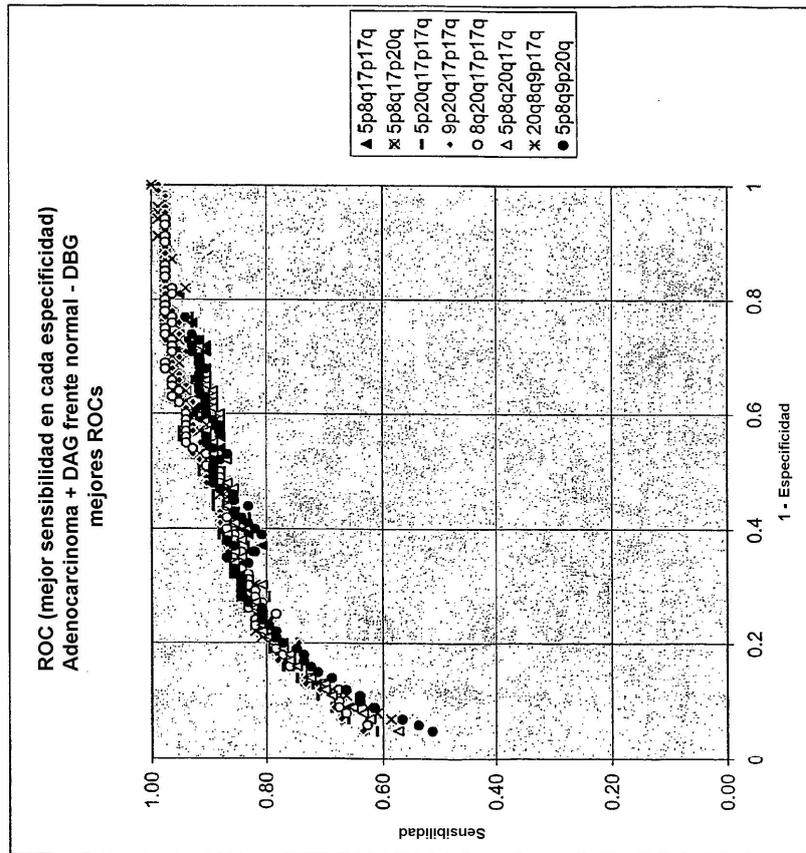


FIG. 2

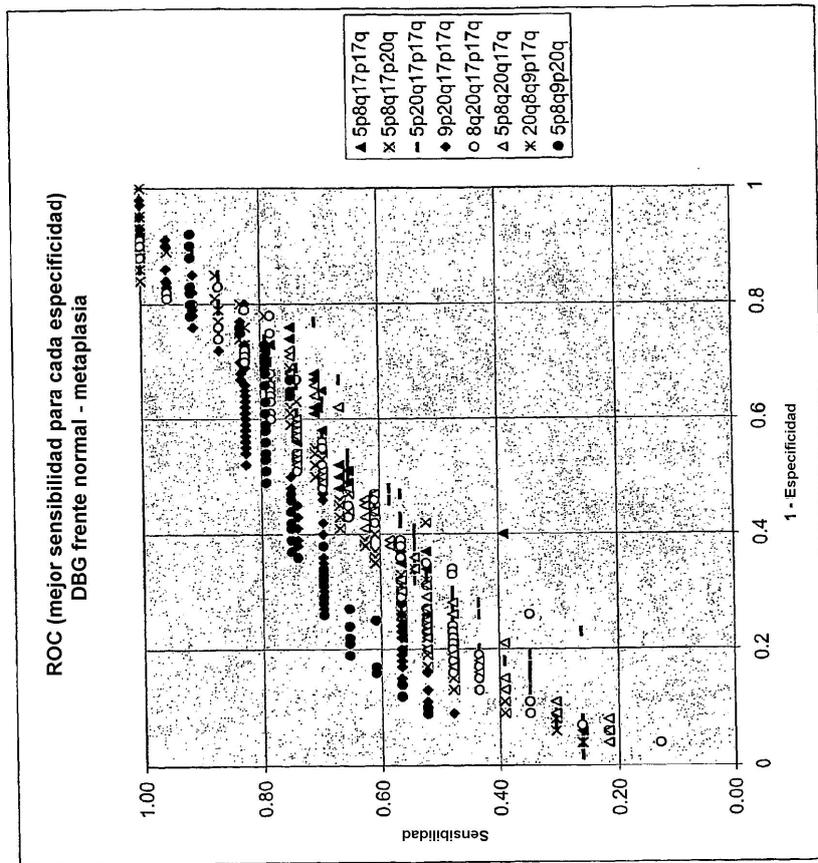


FIG. 3

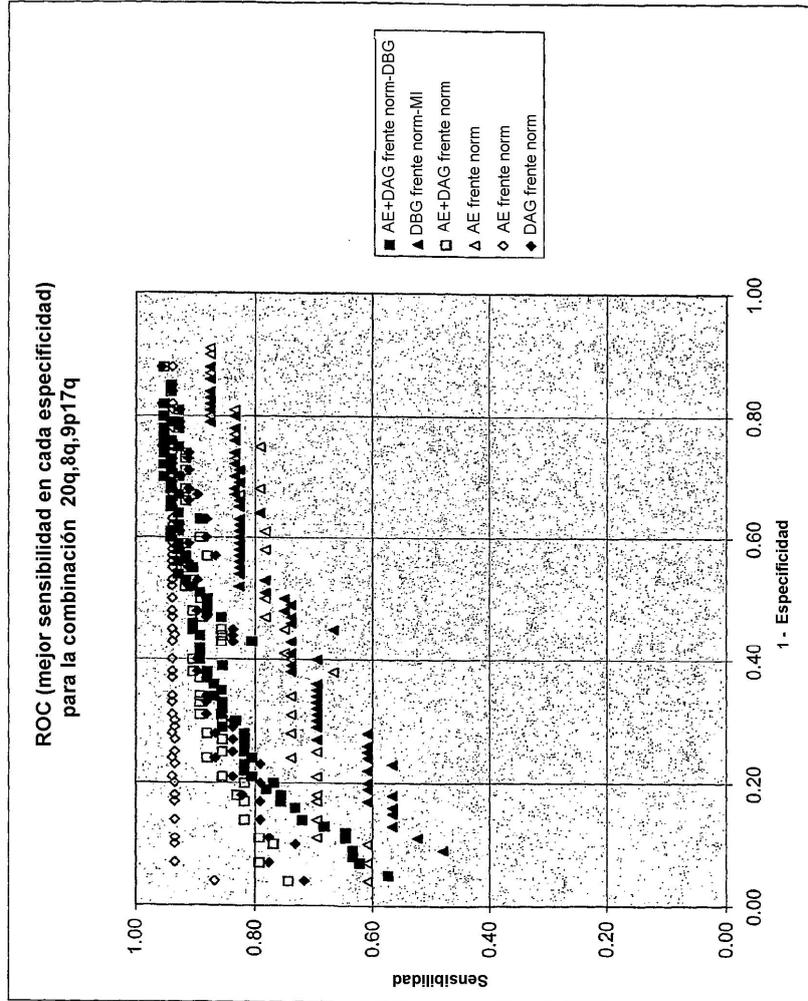
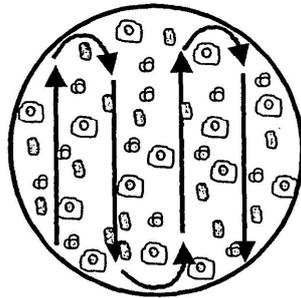


FIG. 4



-  Células que parecen escamosas (no contar)
-  Células que parecen inflamatorias (no contar)
-  Células que parecen columnares (contar)

FIG. 5