

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 812**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2011 PCT/US2011/000834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11142818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2011 E 11780917 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2569624**

54 Título: **Detección de anomalías cromosómicas asociadas con el cáncer endometrial**

30 Prioridad:

10.05.2010 US 395303 P

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

05.07.2017

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)
200 First Street S.W
Rochester, MN 55905, US y
ABBOTT MOLECULAR INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PESTOVA, EKATERINA;
MORRISON, LARRY;
VOSS, JESSE;
PETERSON, LISA y
HALLING, KEVIN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 621 812 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

Detección de anomalías cromosómicas asociadas con el cáncer endometrial

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al ámbito de la detección, el diagnóstico y control del carcinoma e hiperplasia endometrial.

10 Antecedentes de la invención

El cáncer uterino es la cuarta enfermedad maligna más común diagnosticada entre las mujeres estadounidenses (se estimaron unos 42 000 casos en 2009) y la séptima causa más común de muerte por cáncer en este mismo grupo. Más del 95% de todos los cánceres uterinos son cánceres de endometrio (mucosa que recubre el cuerpo del útero). La probabilidad de desarrollar un cáncer de útero a lo largo de la vida es de 1:40 (EE. UU.). El 35-50% de las mujeres de entre 35 y 70 años presentan uno o más factores de riesgo de padecer cáncer endometrial.

Se reconocen dos subtipos clinicopatológicos diferentes en base a su aspecto bajo la luz del microscopio, su comportamiento clínico y la epidemiología: el tipo relacionado con estrógenos (endometriode, tipo I) y el tipo no relacionado con estrógenos (no endometriode, tipo II, como el seroso papilar y de células claras). A pesar de su agresividad, el cáncer endometrial resulta difícil de diagnosticar, por lo que muchas pacientes presentan los síntomas del cáncer en un estadio avanzado.

Sonoda *et al.*, Genes, Chromosomes and Cancer, vol. 18, n.º 2, 1998, páginas 115 - 125, describe el uso de la hibridación genómica para analizar desequilibrios cromosómicos en muestras de tumor primario congeladas de pacientes con carcinoma endometrial, y detecta una ganancia en una serie de cromosomas.

Konig *et al.*, Human Pathology, vol. 27, n.º 7, 1996, páginas 720-727, investiga las ganancias y pérdidas de una serie de cromosomas en los cánceres de próstata, cuyos métodos utilizan una combinación de sondas.

30

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar la presencia de carcinoma endometrial en una muestra biológica de un sujeto. El método implica poner en contacto la muestra con una o más sondas para una o más regiones o subregiones cromosómicas, o combinaciones de las mismas, seleccionadas del grupo compuesto por: la región centromérica del cromosoma 18, 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 7p, 8p, 8q, 9p, 9q, la región centromérica del cromosoma 10, 10q, 15q, 16q, 17p, 18q, 19p, 20q, y 22q, donde dicha sonda o sondas con las que se pone en contacto la muestra incluyen una sonda para la región centromérica del cromosoma 18. La sonda o sondas se incuban con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos de su región cromosómica o cromosoma diana para formar un complejo de hibridación estable. Se detecta la hibridación de una o más sondas, donde un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 es indicativo de carcinoma endometrial.

En determinadas realizaciones, un patrón de hibridación que muestra una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 y al menos una ganancia o pérdida o desequilibrio en la región cromosómica a la que se dirigen una o más de las demás sondas es indicativo de cáncer endometrial. En determinadas realizaciones, un patrón de hibridación que muestra una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 y una ganancia en una o más regiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por: 1q, 2p, 3q, 8q, 10q, y 20q es indicativo de carcinoma endometrial. En realizaciones específicas, un patrón de hibridación que muestra una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 y una ganancia en una o más regiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por: 1q, 10p, y 10q es indicativo de carcinoma endometrial. En otras realizaciones específicas, un patrón de hibridación que muestra una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 y una ganancia en una o más regiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por: 3q, 8q, 18q, y 20q es indicativo de carcinoma no endometrial.

55

En determinadas realizaciones, la sonda o sondas son para una o más subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por: 1q25, 2p24, 2q26, 3p21, 3q27-q29, 7p21, 8p11, 8q24, 9q34, la región centromérica del cromosoma 10, 10q23, 10q26, 15q11-q13, 16q24, la región centromérica del cromosoma 18, 18q21, 20q12 y 20q13, y una de las sondas es para la región centromérica del cromosoma 18.

60

En realizaciones concretas de la divulgación, la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos tres sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

65 1q25, 8q24, 15q11-q13;
1q25, 10q26, 15q11-q13;
1q25, 2p24, 8q24

ES 2 621 812 T3

- 1q25, 8q24, 10q26;
1q25, 8p11, 15q11-q13;
1q25, 2p24, 8p11;
1q25, 8p11, 10q26;
5 1q25, 8p11, 8q24;
1q25, 2p24, 10q26;
1q25, 2p24, 15q11-q13;
8q24, 10q26, 15q11-q13;
10 1q25, 8p11, 20q13;
1q25, 8q24, 20q13;
1q25, 15q11-q13, 20q13;
1q25, 10q26, 20q13;
8p11, 10q26, 15q11-q13;
15 1q25, 2p24, 20q13;
2p24, 8p11, 10q26;
2p24, 8q24, 10q26;
2p24, 10q26, 15q11-q13;
2p24, 8q24, 15q11-q13;
20 10q26, 15q11-q13, 20q13;
1q25, 8p11, 18q21;
1q25, 8q24, 18q21;
1q25, 10q26, 18q21;
1q25, 15q11-q13, 18q21;
25 8p11, 8q24, 10q26;
8q24, 10q26, 20q13;
1q25, 2p24, 18q21;
2p24, 8p11, 8q24;
2p24, 8p11, 15q11-q13;
30 8p11, 8q24, 15q11-q13;
2p24, 10q26, 20q13;
8p11, 10q26, 20q13;
2p24, 8p11, 20q13;
2p24, 8q24, 20q13;
35 8q24, 15q11-q13, 20q13; y
8p11, 15q11-q13, 20q13.

En determinadas realizaciones de la divulgación, la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos tres sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 40 1q25, 18q21, CEP18, 8q24;
2p24, 2q26, 10q26, 2q13; y
10q23, CEP10, y 8p11.

En realizaciones concretas de la divulgación, la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos dos sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 45 18q21, 1q24, 8q24, CEP18;
1q24, 8q24, 10q26, CEP18;
18q21, 1q24, 10q26, CEP18;
50 1q24, 8q24, CEP18, 3q27-q29;
18q21, 1q24, 8q24, 10q26;
1q24, 2p24, 10q26, CEP18;
1q24, 10q26, CEP18, 3q27-q29;
1q24, 10q26, CEP18, 3q27-q29;
55 1q24, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
1q24, 2p24, CEP18, 3q27-q29;
18q21, 1q24, 10q26, 20q13;
1q24, 8q24, CEP18;
18q21, 1q24, CEP18; y
60 1q24, CEP18.

En realizaciones ilustrativas de la divulgación, la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos cuatro sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 65 1q24, 8q24, CEP18, 20q13;
1q24, CEP18, 3q27-q29, 20q13;

ES 2 621 812 T3

- 1q24, CEP18, 20q13, 10q26;
CEP10, 8q24, CEP18, 1q24;
10q26, CEP 10, 1q24, 8q24;
8q24, 1q24, 20q13, CEP18; 10q26;
5 20q13, CEP 10, 1q24, 10q26,

donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en una o más de estas subregiones cromosómicas es indicativo de carcinoma endometrial.

- 10 En realizaciones concretas, una ganancia en CEP 18, y opcionalmente una o más de una ganancia en una o más de 1q24, 8q24, y 20q13, es indicativo de carcinoma endometrial. En realizaciones concretas alternativas de la divulgación, una o más de una ganancia en 20q13, una ganancia en 1q24, un desequilibrio en CEP 10, y una ganancia en 10q26 son indicativos de carcinoma endometrial.
- 15 En realizaciones concretas de la divulgación, la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos dos sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 18q21, 1q25, 8q24, CEP18;
1q25, 8q24, 10q26, CEP18;
20 18q21, 1q25, 10q26, CEP18;
1q25, 8q24, CEP18, 3q27-q29;
18q21, 1q25, 8q24, 10q26;
1q25, 2p24, 10q26, CEP18;
1q25, 10q26, CEP18, 3q27-q29;
25 1q25, 10q26, CEP18, 20q13;
1q25, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
1q25, 2p24, CEP18, 3q27-q29;
18q21, 1q25, 10q26, 20q13;
1q25, 8q24, CEP18;
30 18q21, 1q25, CEP18; y
1q25, CEP18.

En realizaciones ilustrativas de la divulgación, la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos cuatro sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 35 1q25, 8q24, CEP18, 20q13;
1q25, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
1q25, CEP18, 20q13, 10q26;
CEP 10, 8q24, CEP18, 1q25;
40 10q26, CEP 10, 1q25, 8q24;
8q24, 1q25, 20q13, CEP18; 10q26;
20q13, CEP 10, 1q25, 10q26,

- 45 donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en una o más de estas subregiones cromosómicas es indicativo de carcinoma endometrial.

- 50 En realizaciones concretas, una ganancia en CEP18, y opcionalmente una o más ganancias en una o más de 1q25, 8q24, y 20q13, es indicativa de carcinoma endometrial. En realizaciones concretas alternativas de la divulgación, una o más de una ganancia en 20q13, una ganancia en 1q25, un desequilibrio en CEP10, y una ganancia en 10q26 son indicativos de carcinoma endometrial.

- 55 En variaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores, la combinación de sondas puede distinguir muestras que contienen carcinoma endometrial de muestras que no contienen carcinoma endometrial con una sensibilidad de al menos el 93% y una especificidad de al menos el 90%. Por ejemplo, la sensibilidad puede ser al menos del 95% y la especificidad puede ser al menos del 90,4%. En realizaciones concretas, la sensibilidad es al menos del 96% y la especificidad es al menos del 91%.

- 60 En variaciones de cualquiera de las realizaciones precedentes, la combinación de sondas puede incluir entre 2 y 10 sondas. En realizaciones concretas, la combinación de sondas incluye entre tres y ocho sondas. En una realización ilustrativa, la combinación de sondas incluye cuatro sondas.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el método se puede realizar por array de hibridación genómica comparada (aCGH) con sondas inmovilizadas sobre un sustrato.

- 65 Alternativamente, el método se puede realizar mediante hibridación in situ con fluorescencia y cada sonda de la combinación de sondas se puede etiquetar con un fluoróforo diferente.

En cualquiera de las realizaciones precedentes, la muestra puede ser una muestra tomada por raspado endometrial o una muestra de biopsia endometrial.

5 La divulgación también proporciona, en determinadas realizaciones, una combinación de sondas que incluyen entre 2 y 10 sondas seleccionadas de cualquiera de los grupos anteriormente indicados, donde la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos el 93% y una especificidad de al menos el 90% para distinguir las muestras con carcinoma endometrial de las muestras sin carcinoma endometrial. En realizaciones concretas, la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos el 95% y una especificidad de al menos el 90,4%. En realizaciones ilustrativas, la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos el 96% y una especificidad de al menos el 91%. En diversas realizaciones, la combinación de sondas incluye entre 3 y 8 sondas, por ejemplo, 4 sondas.

15 Otro aspecto de la divulgación incluye un kit de diagnóstico de carcinoma endometrial, donde el kit incluye una combinación de sondas que incluyen entre 2 y 10 sondas seleccionadas de cualquiera de los grupos anteriormente indicados, donde la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos el 93% y una especificidad de al menos el 90% para distinguir las muestras con carcinoma endometrial de las muestras sin carcinoma endometrial. En realizaciones concretas, la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos el 95% y una especificidad de al menos el 90,4%. En realizaciones ilustrativas, la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos el 96% y una especificidad de al menos el 91%. En diversas realizaciones, la combinación de sondas incluye entre 3 y 8 sondas, por ejemplo, 4 sondas.

20 En diversas realizaciones de la divulgación, una ganancia, una pérdida o un desequilibrio detectado por al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sondas es indicativo de carcinoma endometrial.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Figura 1A-C: La frecuencia de los cambios genómicos en todos los cánceres según los datos de la CGH.
- Figura 2A(1-3)-B(1-3): La frecuencia de los cambios genómicos en A, cánceres endometrioides; B, cánceres no endometrioides según los datos de la CGH.
- 30 Figura 3: Complementación de clones de arrays genómicos seleccionados. A, anómalo (ganancia o pérdida); NC, sin cambio en el número de copias.
- Figura 4A-I: Conjuntos de sondas 1 y 2 mostrados sobre el resultado de los datos de la aCGH.
- 35 Figura 5: Ejemplo representativo de células con señales FISH (amplificación). Figura 6A-C: Conjuntos de sondas 1 y 2. Porcentaje medio de células anómalas en todas las muestras evaluadas. A, % células con ganancia; B, % células con pérdida; C, % células con ganancias y pérdidas.
- 40 Figura 7: Curva ROC para CEP18+1q24+MYC+DCC, % anómalo (% células con una ganancia o pérdida en el número de copias en al menos uno de cuatro loci).
- Figura 8: Sondas individuales y combinaciones (curvas ROC, % anómalo).
- 45 Figura 9: Curvas ROC, combinación de cuatro sondas, ganancias de 1q24, MYC, CEP18 y 20q13.2.
- Figura 10: Evaluación de sondas adicionales para mejorar la sensibilidad de la detección del cáncer endometrial.

Descripción detallada

50 La presente invención proporciona un método para la detección de anomalías cromosómicas asociadas con el carcinoma endometrial de tipo endometriode y no endometriode, así como combinaciones de sondas, conforme con las reivindicaciones. Los métodos pueden utilizar técnicas conocidas como la hibridación genómica comparativa en microarray (aCGH) y la hibridación in situ (por ejemplo, la hibridación in situ con fluorescencia (FISH)), utilizando una combinación de Identificador Específico de Locus (LSI) y Sondas Enumeradoras de Cromosomas (CEP) para detectar células que presentan anomalías cromosómicas coherentes con un diagnóstico del cáncer endometrial. Los métodos descritos en el presente se pueden utilizar para detectar el cáncer endometrial en diversos tipos de muestras (por ejemplo, una muestra de raspado endometrial o de biopsia endometrial) obtenida en la consulta médica o en quirófano.

60 Actualmente no existe ningún test de diagnóstico citológico para la detección temprana del cáncer endometrial ni existe ningún test o procedimiento para explorar rutinariamente a las mujeres con riesgo de cáncer endometrial. La biopsia endometrial está recomendada como evaluación inicial de las mujeres con un sangrado uterino anómalo. Las desventajas de la biopsia son que se trata de un procedimiento invasivo y molesto para la paciente. Por otra parte, es posible que en el caso de los tumores que comprenden menos del 50% del endometrio la muestra tomada mediante biopsia endometrial resulte inadecuada. La muestra inadecuada por biopsia puede dar falsos negativos y

requerir nuevas biopsias endometriales para determinar la causa de un sangrado uterino anómalo persistente. Dado que los cánceres endometriales tienen un crecimiento relativamente rápido, a menudo las pacientes acuden cuando el cáncer ya se ha desarrollado y extendido localmente.

5 La citología convencional recogida con un dispositivo de muestreo endometrial, como el raspador Tao Brush, ofrece la ventaja de ser relativamente no invasiva y, por tanto, menos molesta para la paciente. Por otra parte, el muestreo endometrial para la citología tiene menos probabilidades que la biopsia de dar falsos negativos debido a una muestra inadecuada. El problema con la citología convencional es que la mayoría de patólogos no tienen experiencia interpretando la citología endometrial y muchos consideran que resulta difícil de interpretar. Por otra parte, incluso los citopatólogos experimentados consideran que hay una importante proporción de casos que no se pueden diagnosticar de forma definitiva como muestras positivas o negativas de cáncer y que se deben clasificar como indeterminadas por lo que respecta a la presencia de cáncer.

15 Los métodos y composiciones que se describen en el presente proporcionarán medios para detectar y mejorar el diagnóstico del cáncer endometrial. Específicamente, la metodología que se describe aquí puede proporcionar una o más de las siguientes ventajas: distinguir el cáncer de enfermedades benignas complejas; distinguir el tejido benigno de lesiones precancerosas y lesiones precancerosas de cáncer; distinguir tumores endometrioides y no endometrioides; proporcionar una herramienta de detección temprana para tests ambulatorios con muestras de citologías; ayudar al diagnóstico del cáncer endometrial en muestras de biopsias o quirúrgicas (contribuir a la evaluación histológica del tejido); y ayudar a controlar los estados cancerosos y precancerosos durante la terapia.

25 Las ventajas de los métodos descritos en el presente pueden incluir una o más de las siguientes: uso de ADN estable para la detección de anomalías cromosómicas (delección, amplificación, aneusomía, translocación); detección rápida: los resultados se podrían obtener en 18-36 horas; las posibilidades de implementación incluyen métodos multiplexados (por ejemplo, microarray) y FISH multicolor; uso como test independiente o complementario de otros tests (histología, PSA, nomograma, metilación, mutación); uso en muestras de citología o biopsia (recién congelada o FFPE); la combinación de varias sondas aumenta la sensibilidad y especificidad en comparación con un ensayo de un único analito; mayor sensibilidad en comparación con la citología convencional.

30 **Definiciones**

Los términos utilizados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva tienen las definiciones siguientes, a menos que se especifique lo contrario.

35 El término "carcinoma endometrial" se refiere a una neoplasia maligna del endometrio, que es la membrana mucosa que recubre el útero. Basado en su aspecto bajo la luz del microscopio, comportamiento clínico y epidemiología se reconocen dos subtipos clinicopatológicos diferentes: el tipo relacionado con estrógenos ("endometriode", tipo I) y el tipo no relacionado con estrógenos ("no endometriode", tipo II, como el seroso papilar y de células claras).

40 Los términos "tumor" o "cáncer" en un animal se refieren a la presencia de células que presentan características como una morfología o un crecimiento atípicos, incluyendo la proliferación no controlada, la inmortalidad, el potencial metastásico, el rápido crecimiento y proliferación, y determinados rasgos morfológicos característicos. A menudo, las células cancerígenas serán en forma de tumor, pero estas células pueden existir solo en un animal. El término tumor incluye tanto las neoplasias benignas como malignas. El término "neoplásico" se refiere a un crecimiento atípico tanto benigno como maligno.

50 El término "muestra biológica" o "muestra" significará una muestra obtenida de un sujeto que se sospecha que padece o padece carcinoma endometrial. En algunas realizaciones, la muestra incluye una biopsia introducida en parafina y fijada con formalina. Además de los sujetos que se sospecha que padecen carcinoma endometrial, la muestra biológica se puede obtener también de un sujeto al que se le ha diagnosticado un carcinoma endometrial con el fin de confirmar el diagnóstico o de determinar que se ha extraído todo el tumor ("margen limpio"). La muestra se puede obtener de una muestra de raspado endometrial o de biopsia endometrial.

55 Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido", a efectos del presente, se refieren a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena simple o doble. El término incluye ácidos nucleicos, es decir oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales con propiedades de unión similares o mejoradas para los propósitos perseguidos.

60 El término también incluye estructuras similares a los ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos. Los análogos de los esqueletos de ADN proporcionados por la invención incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquil fosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetil, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, morfolino carbamato, y ácidos peptidonucleicos (PNA); véase *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). Los PNA contienen segmentos principales no iónicos, como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Los enlaces de fosforotioato se describen en WO 97/03211;

WO 96/39154; Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197. Otros segmentos principales sintéticos incluidos en el término incluyen enlaces de metil-fosfonato o enlaces que alternan metilfosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36: 8692-8698), y enlaces de becilfosfonato (Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 153 y 156).

5 Los términos "hibridación específica", "hibridación específica" e "hibridación selectiva", a efectos del presente, se refieren a la unión, el duplexado o la hibridación de una molécula de ácido nucleico, preferiblemente con una secuencia de nucleótidos concreta en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará preferiblemente a su secuencia diana y, en menor medida, o no se hibridará en absoluto, a otras secuencias. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de la hibridación del ácido nucleico (por ejemplo, como en array, hibridación Southern o Northern, o FISH) dependen de la secuencia y son diferentes en función de los distintos parámetros ambientales. Una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra, por ejemplo, en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology— Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I, cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NY ("Tijssen"). Por lo general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan de forma que sean 5°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una potencia iónica y un pH definido. La T_m es la temperatura (con una potencia iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda con una coincidencia perfecta. Las condiciones sumamente rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T_m para una sonda concreta. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un array o en un filtro de un ensayo Southern o Northern blot son 42°C utilizando soluciones de hibridación estándar (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, y la explicación detallada que se recoge más abajo).

25 Una "sonda cromosómica" o "composición de sondas cromosómicas" se refiere a uno o más polinucleótidos que se hibridan específicamente con una región de un cromosoma. Las secuencias diana a las que se puede unir la sonda tienen una longitud variable, por ejemplo, entre unos 25 000 y 800 000 nucleótidos. También se pueden utilizar sondas más pequeñas, por ejemplo, que se hibridan con una región de menos de 100 000 nucleótidos o con una región de menos de 10 000 nucleótidos. De este modo, en diversas realizaciones, la sonda se puede hibridar con secuencias diana que tienen 25 000 nucleótidos, 30 000 nucleótidos, 50 000 nucleótidos, 100 000 nucleótidos, 150 000 nucleótidos, 200 000 nucleótidos, 250 000 nucleótidos, 300 000 nucleótidos, 350 000 nucleótidos, 400 000 nucleótidos, 450 000 nucleótidos, 500 000 nucleótidos, 550 000 nucleótidos, 600 000 nucleótidos, 650 000 nucleótidos, 700 000 nucleótidos, 750 000 nucleótidos, u 800 00 nucleótidos de longitud o que tienen una longitud incluida en cualquier rango con alguno de estos valores como parámetros. Una sonda para una región cromosómica concreta puede incluir múltiples fragmentos de polinucleótidos, por ejemplo, de un tamaño que varía entre unos 50 y unos 1000 nucleótidos de longitud.

40 Una sonda enumeradora de cromosomas (CEP) es cualquier sonda capaz de enumerar el número de cromosomas específico en una célula.

Por lo general, el término "fracción que contiene una etiqueta" o "fracción de detección" se refiere a un grupo o grupos moleculares asociados con una sonda cromosómica, de forma directa o indirecta, que permite la detección de esa sonda tras la hibridación con su diana.

45 El término "región diana" o "diana de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra en una ubicación cromosómica concreta cuya pérdida y/o ganancia es indicativa de la presencia de un carcinoma endometrial.

50 **Introducción**

Los métodos descritos en el presente se basan, en parte, en la identificación de combinaciones de sondas cromosómicas altamente sensible y específicas que se pueden utilizar para detectar selectivamente un carcinoma endometrial. Las combinaciones de sondas proporcionan una mayor sensibilidad y especificidad que las sondas individuales. Las sondas abarcan sondas específicas de locus, así como sondas enumeradoras de cromosomas (CEP) que se hibridan típicamente en las regiones centroméricas. Los métodos se realizan hibridando una o más sondas con ácidos nucleicos de, por ejemplo, muestras de citología (raspados, lavados o hisopos uterinos) o células de muestras congeladas o fijadas, como tejidos introducidos en parafina y fijados con formalina.

60 **Sondas cromosómicas**

Las sondas para la invención se utilizan para la hibridación con ácidos nucleicos que están presentes en muestras biológicas de sujetos con respecto a los que se sospecha en cierta medida que padecen un carcinoma endometrial. En determinadas realizaciones, las sondas son etiquetadas con etiquetas detectables, por ejemplo, etiquetas fluorescentes.

Sonda enumeradora de cromosomas

Típicamente, una sonda enumeradora de cromosomas reconoce y se une a una región cercana al centrómero (denominada "pericentromérica") o al centrómero de un cromosoma específico, por lo general una secuencia de ADN repetitiva. Se considera que el centrómero de un cromosoma representa típicamente la entidad de dicho cromosoma, dado que el centrómero es necesario para la segregación fiel durante la división celular. La delección o amplificación de una región cromosómica concreta se puede diferenciar de la pérdida o ganancia del conjunto del cromosoma (aneusomía), en el que normalmente reside, comparando el número de señales correspondientes al locus particular (número de copias) con el número de señales para el centrómero correspondiente. Un método para realizar esta comparación consiste en dividir el número de señales que representan el locus por el número de señales que representan el centrómero. Los ratios inferiores a uno indican una pérdida relativa o delección del locus, mientras que los ratios superiores a uno son indicativos de una ganancia o amplificación del locus. Del mismo modo, se puede realizar una comparación entre dos loci diferentes del mismo cromosoma, por ejemplo, en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar un desequilibrio de ganancias o pérdidas dentro del cromosoma.

En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, un experto en la técnica reconocerá que la sonda de un brazo cromosómico se puede utilizar alternativamente para calcular aproximadamente la pérdida o ganancia cromosómica total. Sin embargo, estas sondas no son tan precisas enumerando cromosomas, dado que la pérdida de señales para dichas sondas puede no siempre indicar una pérdida de todos los cromosomas. Entre los ejemplos de sondas enumeradoras de cromosomas se incluyen las sondas CEP® (por ejemplo, CEP® 12 y sondas X/Y) comercializadas por Abbott Molecular, DesPlaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente sondas enumeradoras de cromosomas y de sondas específicas de locus dirigidas a una región o subregión cromosómica o adquirirlas en, por ejemplo, Abbott Molecular, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, UK). Estas sondas se preparan utilizando técnicas estándar. Se pueden preparar sondas cromosómicas, por ejemplo, con ácidos nucleicos de proteínas, ADN humano clonado como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), y cromosomas artificiales PI (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Se puede obtener una región de interés vía clonación o amplificación por PCR. Alternativamente, se pueden preparar sondas cromosómicas sintéticamente.

Sondas específicas de locus

Entre las sondas que se pueden utilizar en el método descrito en el presente se incluyen sondas que se hibridan selectivamente a regiones cromosómicas (por ejemplo, 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 7p, 8p, 8q, 9p, 9q, 10q, 15q, 16q, 17p, 18q, 19p, 20q, y 22q) o subregiones de las regiones cromosómicas (por ejemplo, 1q25, 2p24, 2q26, 3p21, 3q27-q29, 7p21, 8p11, 8q24, 9q34, 10q23, 10q26, 15q11-q13, 16q24, 18q21, 20q12 y 20q13). (Las designaciones de las subregiones utilizadas en el presente incluyen la banda designada y típicamente unas 10 megabases de la secuencia genómica en cualquiera de los lados). Estas sondas también se denominan "sondas específicas de locus". Una sonda específica de locus se une selectivamente a un locus específico de una región cromosómica que se sabe que se somete a una ganancia o pérdida en el carcinoma endometrial. Una sonda se puede focalizar a regiones de codificación o de no codificación, o a ambas, incluyendo exones, intrones y/o secuencias reguladoras, como secuencias de promotores y similares.

Cuando se desea focalizar un locus de un gen concreto, las sondas que se hibridan a lo largo de toda la longitud del gen diana son preferibles en ciertas realizaciones, aunque no imprescindibles. En realizaciones específicas, una sonda específica de locus puede estar diseñada para hibridar a un oncogen o gen supresor del tumor, cuya aberración genética está correlacionada con el carcinoma endometrial.

Por lo general, las sondas útiles en los métodos descritos en el presente incluyen una serie de uno o más fragmentos de ácidos nucleicos cuya hibridación con una diana se puede detectar. Las sondas se pueden producir a partir de una fuente de ácidos nucleicos de una o más porciones (preseleccionadas) concretas del genoma, por ejemplo, uno o más clones, un cromosoma completo o fragmento de cromosoma aislado, o una serie de productos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las sondas útiles en el método descrito en el presente se pueden producir a partir de los ácidos nucleicos que se encuentran en las regiones descritas en el presente. La sonda puede ser procesada de alguna manera, por ejemplo, bloqueando o eliminando los ácidos nucleicos repetitivos o enriqueciendo con ácidos nucleicos únicos.

En determinadas realizaciones, por ejemplo, en las realizaciones con hibridación in situ (como la basada en FISH), las dianas de las sondas específicas de locus incluyen preferiblemente al menos 100 000 nucleótidos. Para las células de una muestra determinada, con respecto a las de un control, los incrementos o las disminuciones del número de señales de una sonda indican una ganancia o pérdida, respectivamente, para la correspondiente región.

También se pueden utilizar sondas como ácidos nucleicos aislados inmovilizados sobre una superficie sólida (por ejemplo, nitrocelulosa) como en la aCGH. En algunas realizaciones, las sondas pueden ser miembros de un array de ácidos nucleicos tal y como se describe, por ejemplo, en WO 96/17958, que proporciona una descripción de un array de CGH. Las técnicas capaces de producir arrays de alta densidad son bien conocidas (véase, por ejemplo, Fodor et

al. Science 767-773 (1991) y la Patente USA Nº 5.143.854).

Tal y como se describe detalladamente más abajo, fueron identificados los loci putativamente asociados con el cáncer endometrial y la sensibilidad y especificidad de esta asociación se examinó de forma detallada utilizando un array de hibridación genómica comparativa (aCGH) y una hibridación in situ con fluorescencia (FISH). Los clones seleccionados del análisis aCGH incluían: LAMC2 (1q25-q31), MYCN (**2p24.1**), RASSF (3p21.3), TP63 (3q27-q29), IL6 (7p21), FGFR1 (8p11.2-p11.1), MYC (8q24), TSC1 (9q34), PTEN (10q23.3), FGFR2 (10q26), UBE3A/D15S10 (15q11-q13), FANCA (16q24.3), DCC (18q21.3), NCOA3 (20q12), y ZNF217 (20q13.2). Las sondas del análisis FISH incluían: 1q25, PTEN (10q23.3), DCC (18q21.2), CEP10, CEP18, FGFR1 (8p11.2), MYC (8q24), MYCN (2p24.3), PIK3CA (2q26.32), FGFR2 (10q26.13), y ZNF217 (20q13.2). Se desarrollaron nuevas sondas FISH para NMYC, FGFR1, y FGFR2.

Métodos de selección de sondas

Las combinaciones de sondas se pueden seleccionar por su capacidad para detectar simplemente el carcinoma endometrial, pero típicamente se seleccionan por su capacidad por discriminar entre el carcinoma endometrial y otras condiciones. Por tanto, los análisis de combinaciones de sondas se realizan típicamente para determinar los valores DFI de diferentes combinaciones de sondas para discriminar entre el carcinoma endometrial y otras condiciones o tejido normal. En realizaciones concretas, se pueden analizar combinaciones de sondas para discriminar entre los tipos endometrioides y no endometrioides de carcinoma endometrial.

Las combinaciones de sondas para su uso en los métodos de la presente invención se pueden seleccionar utilizando los principios descritos en los ejemplos. Las combinaciones de sondas cromosómicas dentro de una combinación de sondas se seleccionan por la sensibilidad, especificidad y detectabilidad respecto al carcinoma endometrial. La sensibilidad se refiere a la capacidad de un test (por ejemplo, FISH) para detectar la enfermedad (por ejemplo, carcinoma endometrial) si está presente. Más concretamente, la sensibilidad se define como Verdaderos Positivos/(Verdaderos Positivos+Falsos Negativos). Un test con una elevada sensibilidad presenta escasos resultados falsos negativos, mientras que un test de baja sensibilidad presenta numerosos resultados de falsos negativos. En determinadas realizaciones, la combinación de sondas tiene una sensibilidad aproximada de al menos: 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o una sensibilidad comprendida en un intervalo de cualquiera de estos valores como parámetros.

La especificidad, por otra parte, se refiere a la capacidad de un test (por ejemplo, FISH) para dar un resultado negativo cuando la enfermedad no está presente. Más concretamente, la especificidad se define como Verdaderos Negativos/(Verdaderos Negativos+Falsos Positivos). Un test con una elevada especificidad presenta escasos resultados falsos positivos, mientras que un test de baja especificidad presenta numerosos resultados de falsos positivos. En determinadas realizaciones, la combinación de sondas tiene una especificidad de al menos: 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, o 95%, o una especificidad comprendida en un intervalo de cualquiera de estos valores como parámetros.

En general, las combinaciones de sondas cromosómicas con la sensibilidad y especificidad combinadas más altas para la detección del carcinoma endometrial resultan preferibles. En ejemplos de realizaciones, la combinación de sondas tiene una sensibilidad y especificidad aproximada de al menos: 93% y 88%, 95% y 90%, 96% y 91%, 97% y 92%, respectivamente, o cualquier combinación de sensibilidad y especificidad basada en los valores anteriormente indicados para cada uno de estos parámetros.

La sensibilidad y especificidad combinadas de una combinación de sondas se puede representar por la distancia de los parámetros con respecto al ideal (DFI), que se define como $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$. Los valores de DFI oscilan entre 0 y 1414, donde 0 representa una combinación de sondas que tiene un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad y 1414 representa una combinación de sondas que tiene un 0% de sensibilidad y un 0% de especificidad.

No existe un límite para el número de sondas que se pueden emplear en una combinación, aunque, en determinadas realizaciones no se combinan más de 10 sondas. Por otra parte, en algunas realizaciones, el número de sondas de un conjunto que van a ser visualizadas por un observador humano (y no por técnicas de captura de imágenes por ordenador) puede ser limitado por razones prácticas, por ejemplo, por el número de fluoróforos únicos que proporcionan señales visualmente distinguibles tras la hibridación. Por ejemplo, típicamente cuatro o cinco fluoróforos únicos (que pueden aparecer como señales rojas, verdes, acuosas y doradas al ojo humano) pueden ser empleados convenientemente en una única combinación de sondas. Por lo general, la sensibilidad de un ensayo aumenta cuanto mayor es el número de sondas de un conjunto. Sin embargo, los incrementos de la sensibilidad son cada vez menores con la adición de nuevas sondas y en algún punto la inclusión de nuevas sondas a una combinación de sondas no está asociada con incrementos significativos en la sensibilidad del ensayo ("disminución del rendimiento"). Al aumentar el número de sondas de una combinación de sondas puede reducirse la especificidad del ensayo. Por consiguiente, una combinación de sondas de la presente invención típicamente incluye dos, tres o cuatro sondas cromosómicas, conforme sea necesario para proporcionar un equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad.

Las sondas individuales pueden ser seleccionadas para su inclusión en una combinación de sondas en función de su capacidad para complementar a otras sondas de la combinación. Concretamente, están dirigidas a cromosomas o subregiones cromosómicas que no se suelen alterar simultáneamente dentro de un carcinoma endometrial dado. Por tanto, cada sonda de una combinación de sondas complementa a la otra u otras, es decir que identifica el carcinoma endometrial cuando las demás sondas de la combinación en ocasiones no consiguen identificarlo. Un método para determinar qué sondas se complementan entre sí consiste en identificar sondas únicas con los valores DFI más bajos para un grupo de muestras de tumores. A continuación, se pueden probar sondas adicionales con las muestras de tumores que la sonda inicial no consiguió identificar, y la sonda con el valor DFI más bajo medida en combinación con la sonda o sondas iniciales se añade al conjunto. Esto se puede repetir hasta que se consigue un conjunto completo de sondas cromosómicas con el valor DFI deseado.

El análisis de discriminación es el método que se puede utilizar para determinar qué sondas pueden detectar mejor el carcinoma endometrial. Este método evalúa si las sondas individuales son capaces de detectar un porcentaje estadísticamente diferente de células anómalas en muestras de ensayo (por ejemplo, carcinoma endometrial) en comparación con muestras normales. La detección de células con ganancias cromosómicas (o locus) o pérdidas cromosómicas (o locus) se puede utilizar para identificar células neoplásicas en pacientes con carcinoma endometrial. Sin embargo, en ocasiones se producen pérdidas cromosómicas como un artefacto en las células normales debido a que una señal aleatoria se solapa y/o a una mala hibridación. En secciones de material introducido en parafina y fijado con formalina, normalmente utilizado para evaluar las biopsias, la truncación de núcleos en el proceso de seccionamiento también puede producir una pérdida artefactual de material cromosómico. Por consiguiente, las ganancias cromosómicas son a menudo un indicador más fiable de la presencia de células neoplásicas.

Los valores de corte para las ganancias y pérdidas cromosómicas individuales se deben determinar a la hora de elegir una combinación de sondas. El término "valor de corte" pretende significar el valor de un parámetro asociado con la aberración cromosómica que divide una población de muestras en dos grupos —las muestras por encima del valor de corte y las muestras por debajo del valor de corte—. Por ejemplo, el parámetro puede ser el número absoluto o el porcentaje de células de una población que presenta aberraciones genéticas (por ejemplo, pérdidas o ganancias para regiones diana). Si el número o porcentaje de células de la muestra que presente pérdidas o ganancias para una sonda concreta es superior al valor de corte, se determina que la muestra es positiva en carcinoma endometrial.

Las combinaciones de sondas útiles se debaten detalladamente en el Ejemplo que se recoge más abajo. En ejemplos de combinaciones, una o más ganancias en uno o más brazos de 1q24, 8q24, CEP18, y 20q13 son indicativas de un carcinoma endometrial, al igual que lo son (i) una o más ganancias en una o más de 1q25, 8q24, CEP 18, y 20q13 y (ii) una o más de una ganancia en 20q13, una ganancia en 1q24, un desequilibrio en CEP 10, y una ganancia en 10q26. También cabe señalar que se observaron diferentes cambios genómicos a la hora de comparar los subtipos endometrioides y no endometrioides. Las ganancias en los brazos cromosómicos 1q, 10p y 10q fueron habituales en los carcinomas endometrioides. En los carcinomas no endometrioides se observaron múltiples ganancias en el genoma y las ganancias más habituales se observaron en 3q, 8q y 20q.

Hibridación de sondas

Por lo general, las condiciones para la hibridación específica de sondas a sus dianas de ácido nucleico incluyen las combinaciones de condiciones que se pueden emplear en un determinado procedimiento de hibridación para producir híbridos específicos, cuyas condiciones pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. Estas condiciones implican típicamente la temperatura controlada, la fase líquida y el contacto entre una sonda cromosómica y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de múltiples factores, incluyendo la concentración de la sonda, la longitud de la diana, el contenido G-C de la diana y la sonda, la composición del solvente, la temperatura y la duración de la incubación. Al menos un paso de desnaturalización puede preceder al contacto de las sondas con las dianas. Alternativamente, tanto la sonda como la diana de ácido nucleico se pueden someter a condiciones de desnaturalización juntos, mientras están en contacto entre sí, o durante el posterior contacto de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede conseguir con la posterior incubación de la sonda/muestra en, por ejemplo, una fase líquida de una mezcla con un ratio de volumen aproximado de 50:50 de 2-4 veces SSC y formamida, a una temperatura en el rango de unos 25 a 55°C durante un tiempo ilustrativo en un rango aproximado de entre 0,5 y 96 horas, o más preferiblemente a una temperatura de unos 32 a unos 40°C durante un tiempo en un rango aproximado de entre 2 y 16 horas. A fin de aumentar la especificidad, se puede utilizar un agente bloqueante como un ácido nucleico bloqueante no etiquetado como el que se describe en la Patente USA N° 5.756.696 (cuyo contenido proporciona una descripción del uso de un ácido nucleico bloqueante) conjuntamente con los métodos de la presente invención. Otras condiciones se pueden emplear fácilmente para hibridar de forma específica las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, tal y como resultará evidente para un experto en la técnica.

Una vez completado un periodo de incubación adecuado, la unión no específica de sondas cromosómicas al ADN de la muestra se puede eliminar mediante una serie de lavados. La temperatura y las concentraciones de sal se seleccionan convenientemente para la rigurosidad deseada. El nivel de rigurosidad requerido depende de la

complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica, y se puede determinar hibridando sistemáticamente sondas con muestras de una composición genética conocida. En general, se pueden realizar lavados de elevada rigurosidad a una temperatura en un rango aproximado de entre 65 y 80°C con aproximadamente entre 0,2x y 2xSSC y aproximadamente 0,1% y 1% de un detergente no iónico como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de menor rigurosidad, los lavados se pueden realizar a una temperatura inferior con una mayor concentración de sal.

Detección de patrones de hibridación de sondas

Las sondas de hibridación se pueden detectar utilizando cualquier medio conocido en la técnica. Las fracciones que contienen etiquetas se pueden asociar directa o indirectamente con sondas cromosómicas. Se pueden seleccionar diferentes fracciones que contienen etiquetas para cada sonda individual de una combinación concreta de forma que cada sonda hibridada sea visualmente distinta de las demás tras la detección. Cuando se emplea la FISH, las sondas cromosómicas pueden ser convenientemente etiquetadas con distintas fracciones que contienen etiquetas fluorescentes. En estas realizaciones, los fluoróforos, las moléculas orgánicas que se vuelven fluorescentes bajo la radiación a una longitud de onda concreta, por lo general se unen directamente a las sondas cromosómicas. Hay un gran número de fluoróforos a la venta en formas reactivas adecuadas para el marcado de ADN.

La unión de fluoróforos a sondas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se puede realizar utilizando cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir covalentemente a un nucleótido concreto, por ejemplo, y el nucleótido etiquetado se puede incorporar a la sonda utilizando técnicas estándar como la traslación de mellas, el marcaje aleatorio, el etiquetado por PCR y similares. Alternativamente, el fluoróforo se puede unir covalentemente a través de un enlazador a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que han sido transaminados. Los métodos para etiquetar sondas se describen en la Patente USA N° 5.491.224 y en Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (2002), Y.-S. Fan, Ed., capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," L. Morrison et al., p. 21-40, Humana Press, ambos proporcionan descripciones del etiquetado de sondas.

Entre los ejemplos de fluoróforos que se pueden utilizar para el etiquetado de sondas se incluyen TEXAS RED (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), CASCADE blue acetylazide (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), SPECTRUMORANGE™ (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) y SPECTRUMGOLD™ (Abbott Molecular).

Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otros agentes y colorantes en lugar de fluoróforos como fracciones que contienen una etiqueta. Las etiquetas adecuadas que se pueden unir a las sondas incluyen, entre otros, radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, etiquetas de masas, partículas densas de electrones, partículas magnéticas, etiquetas de espín, moléculas que emiten luminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores y sustratos de enzimas. Los agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, fracciones que contienen etiquetas radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Alternativamente, se pueden utilizar fracciones de detección que se visualizan a través de medios indirectos. Por ejemplo, las sondas se pueden etiquetar con biotina o digoxigenina utilizando métodos rutinarios conocidos en la técnica y, a continuación, se pueden procesar para su detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede conseguir a través de la posterior unión de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso la visualización y discriminación de sondas se puede conseguir tal y como se ha descrito anteriormente para la FISH.

Las sondas cromosómicas hibridadas con regiones diana se pueden visualizar alternativamente a través de reacciones enzimáticas de fracciones etiquetadas con los sustratos adecuados para la producción de productos de color insolubles. Cada sonda se puede discriminar de las demás sondas del conjunto mediante la selección de una fracción etiquetada distinta. 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 (HRP) como sustrato adecuado. 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitro blue tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que la diaminobenzidina sirve como sustrato para la HRP.

En realizaciones en las que se utilizan sondas o composiciones de sondas etiquetadas con fluoróforos, el método de detección puede implicar la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo u otro medio para determinar la hibridación de la sonda. Se puede utilizar cualquier método de captura de imágenes microscópicas adecuado conjuntamente con los métodos de la presente invención para observar múltiples fluoróforos. En caso de que se emplee la microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden visualizar bajo la luz adecuada para detectar la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros adecuados. Alternativamente se pueden utilizar sistemas de captura de imágenes digitales automáticos, como MetaSystems, BioView o Applied Imaging Systems.

En el array de CGH, las sondas no son etiquetadas, sino que se inmovilizan en distintos lugares sobre un sustrato, tal y como se describe en WO 96/17958. En este contexto, las sondas se denominan a menudo "ácidos nucleicos diana". Los ácidos nucleicos de muestra son típicamente etiquetados para permitir la detección de complejos de hibridación. Los ácidos nucleicos de muestra utilizados en la hibridación pueden ser etiquetados de forma detectable antes de la reacción de hibridación. Alternativamente, se puede seleccionar una etiqueta detectable que se une al

producto de la hibridación. En la aCGH bicolor o multicolor, el array de ácido nucleico diana es hibridado con dos o más colecciones de ácidos nucleicos etiquetados de forma diferente, sea de forma simultánea o en serie. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de muestra (por ejemplo, de biopsia de carcinoma endometrial) y los ácidos nucleicos de referencia (por ejemplo, de endometrio normal) son etiquetados con una etiqueta separada y distinguible. Las diferencias de la intensidad de cada señal en cada punto de ácido nucleico diana se pueden detectar como una indicación de una diferencia en el número de copias. A pesar de que se puede utilizar cualquier etiqueta detectable adecuada para una aCGH, las etiquetas fluorescentes son típicamente las más convenientes.

Los métodos preferibles para visualizar señales se describen en WO 93/18186. Para facilitar la visualización de resultados y para mejorar la sensibilidad de detección de pequeñas diferencias en la intensidad de la fluorescencia, se puede utilizar un sistema de análisis de imágenes digitales. Un ejemplo de sistema es QUIPS (que significa sistema de procesamiento cuantitativo de imágenes), que es un sistema de análisis de imágenes automático basado en un microscopio de fluorescencia estándar equipado con una platina automática, control del enfoque y rueda de filtros (Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, N.Y.). La rueda de filtros está montada en la trayectoria de la excitación de fluorescencia del microscopio para seleccionar la longitud de onda de excitación. Los filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, Vt.) del bloque dicróico permiten la excitación de los múltiples colorantes sin cambiar el registro de la imagen. El microscopio tiene dos puertos de cámaras, uno de ellos con una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, Calif.) para la visualización de imágenes de vídeo sensibles a alta velocidad, que se utiliza para encontrar áreas interesantes en el portaobjetos y para el enfoque. El otro puerto de cámara tiene una cámara CCD refrigerada (modelo 200 de Photometries Ltd., Tucson, Ariz.) que se utiliza para la captura real de imágenes a alta resolución y sensibilidad. La cámara CCD refrigerada está interconectada con una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, Calif.) a través de un bus VME. Toda la captura de imágenes multicolor se controla con un paquete de software de procesamiento de imágenes SCIL-Image (Delft Centre for Image Processing, Delft, Netherlands).

Detección y diagnóstico de pacientes con carcinoma endometrial

Los métodos de detección de la invención incluyen el uso de una muestra biológica obtenida de un sujeto que padece carcinoma endometrial o que se sospecha que padece carcinoma endometrial. La muestra biológica puede ser la muestra de una citología (por ejemplo, raspados, lavados o hisopos uterinos). En realizaciones concretas, la muestra biológica es una muestra congelada o fijada, como una muestra introducida en parafina y fijada con formalina. La muestra se pone en contacto con una o más sondas cromosómicas para detectar de forma selectiva el carcinoma endometrial en la muestra, si procede, bajo condiciones para la hibridación específica de las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra. Las sondas de una combinación se pueden hibridar de forma simultánea o secuencial, capturándose imágenes digitales de los resultados de cada hibridación, separando la sonda o sondas, e hibridando después la muestra con la otra sonda o sondas. También se pueden hibridar múltiples combinaciones de sondas con la muestra de esta manera.

La muestra biológica puede ser de una paciente que se sospecha que padece carcinoma endometrial o de una paciente a la que se le ha diagnosticado un carcinoma endometrial, por ejemplo, para la confirmación del diagnóstico o para establecer un margen limpio, o para la detección de células de carcinoma endometrial en otros tejidos como los nódulos linfáticos. La muestra biológica también puede ser de un sujeto con un diagnóstico ambiguo, con el objeto de aclararlo. La muestra biológica también puede ser de un sujeto con una lesión histopatológicamente benigna para confirmar el diagnóstico. Las muestras biológicas se pueden obtener utilizando cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica.

Como se ha señalado, una muestra biológica se puede tratar con un elemento de fijación como formaldehído y se puede introducir en parafina y seccionarse para su uso en los métodos de la invención. Alternativamente, se puede prensar el tejido fresco o congelado contra el portaobjetos para formar monocapas de células conocidas como improntas, que contienen núcleos intactos y no sufren de los artefactos de truncación que supone el seccionamiento. Estas células se pueden fijar, por ejemplo en soluciones alcohólicas como etanol al 100% o en 3:1 de metanol:ácido acético. Los núcleos también se pueden extraer de secciones gruesas de muestras introducidas en parafina para reducir los artefactos de truncación y eliminar material extraño introducido. Típicamente las muestras biológicas, una vez obtenidas, se recogen y procesan antes de la hibridación utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Este procesamiento incluye típicamente el tratamiento con proteasa y una fijación adicional en solución de aldehído, como formaldehído.

Preselección de muestras

Antes de la detección, las muestras de células pueden ser opcionalmente preseleccionadas, en base a anomalías citológicas evidentes. La preselección identifica las células sospechosas, permitiendo así centrar el estudio en esas células. La preselección permite una detección más rápida y aumenta la probabilidad de que no se pierda un resultado positivo. Durante la preselección, las células de una muestra biológica se pueden colocar en el portaobjetos de un microscopio y se pueden explorar visualmente para detectar anomalías citológicas habitualmente asociadas con células displásicas o neoplásicas. Estas anomalías incluyen anomalías en el tamaño del núcleo, la forma del núcleo, la tinción del núcleo, evaluadas por contratinción de núcleos con colorantes para ácidos nucleicos

como yoduro de propidio o 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI), normalmente tras la hibridación de las sondas con sus ADN diana. Típicamente, las células neoplásicas contienen núcleos de mayor tamaño, de forma irregular y/o muestran un patrón de tinción moteado. El yoduro de propidio, típicamente utilizado a una concentración aproximada de entre 0,4 µg/ml y 5 µg/ml, es un colorante específico para ADN de fluorescencia roja que se puede observar a una longitud de onda máxima de emisión de 614 nm. El DAPI, típicamente utilizado a una concentración aproximada de entre 125ng/ml y 1000 ng/ml, es un colorante específico para ADN de fluorescencia azul que se puede observar a una longitud de onda máxima de emisión de 452 nm. En este caso, solo las células preseleccionadas para la detección se someten a recuento para detectar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Preferiblemente, se eligen del orden de al menos 20, y más preferiblemente al menos 30-40, células preseleccionadas para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. La preselección de una región sospechosa en una sección de tejido se puede realizar en una sección en serie teñida con medios convencionales, como tinción con H&E o PAP, y la región sospechosa puede ser marcada por un patólogo u otro técnico debidamente formado. La misma región puede ser posteriormente ubicada en la sección en serie teñida mediante FISH y se pueden enumerar los núcleos de esa región. Dentro de la región marcada, la enumeración se puede limitar a los núcleos que muestran características anómalas como las anteriormente descritas.

Alternativamente, las células para la detección se pueden seleccionar con independencia de sus características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células que no se solapan de una determinada área o áreas del portaobjetos de un microscopio pueden ser evaluadas para detectar pérdidas y/o ganancias cromosómicas. En otro ejemplo, se pueden seleccionar las células del portaobjetos, por ejemplo, células que muestran una morfología alterada, del orden de al menos unas 50 y más preferiblemente de al menos una 100, que aparecen en orden consecutivo en el portaobjetos de un microscopio para detectar pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

Patrón de hibridación

El patrón de hibridación para el conjunto de sondas cromosómicas en las regiones diana se detecta y registra para las células seleccionadas para la detección de pérdidas y/o ganancias cromosómicas. La hibridación se detecta por la presencia o ausencia de las señales concretas generadas por cada una de las sondas cromosómicas. El término "patrón de hibridación" se refiere a la cuantificación de pérdidas/ganancias cromosómicas de las células seleccionadas para la evaluación, en comparación con el número presente en una muestra de control correspondiente, para cada sonda de una muestra de células seleccionada. La cuantificación de pérdidas/ganancias puede incluir determinaciones que evalúan el ratio de un locus con respecto a otro en el mismo cromosoma o en un cromosoma diferente. Una vez que el número de regiones diana de cada célula se ha determinado, evaluado por el número de regiones que presentan hibridación con cada sonda, se pueden cuantificar las ganancias y/o pérdidas cromosómicas relativas.

La ganancia o pérdidas relativa de cada sonda se determina comparando el número de señales distintas de la sonda en cada célula con el número previsto en una célula normal, es decir donde el número de copias debería ser dos. Las células no neoplásicas de la muestra, como queratinocitos, fibroblastos y linfocitos, se pueden utilizar como células normales de referencia. Más del número normal de señales de la sonda se considera una ganancia y menos del número normal se considera una pérdida. Alternativamente, puede ser necesario un número mínimo de señales por sonda por célula para considerar que la célula es anómala (por ejemplo, cinco o más señales). Al igual que para la pérdida, donde puede ser necesario un número máximo de señales por sonda para considerar que la célula es anómala (por ejemplo, cero señales o una o menos señales).

Los porcentajes de células con al menos una ganancia y/o pérdida se registrarán para cada locus. Una célula se considera anómala si al menos una de las aberraciones genéticas identificadas por una combinación de sondas de la presente invención se encuentra en esa célula. Una muestra se puede considerar positiva en una ganancia o pérdida, si el porcentaje de células con la correspondiente ganancia o pérdida excede del valor de corte para cualesquiera sondas utilizadas en un ensayo. Alternativamente, pueden ser necesarias dos o más aberraciones genéticas para considerar la célula anómala con el efecto de aumentar la especificidad. Por ejemplo, cuando las ganancias son indicativas de un carcinoma endometrial, una muestra se considera positiva si contiene, por ejemplo, al menos cuatro células que presentan ganancias de al menos dos o más regiones que contienen sondas.

aCGH

El array de CGH se puede realizar en modo monocolor, bicolor o multicolor.

En modo monocolor, solo los ácidos nucleicos de la muestra son etiquetados e hibridados con arrays de ácidos nucleicos. Las diferencias en el número de copias se pueden determinar detectando una intensidad de la señal en un determinado punto del ácido nucleico diana del array que difiere de forma significativa de la intensidad de la señal observada en uno o más puntos correspondientes a uno o más loci presentes en los ácidos nucleicos de la muestra en un número de copias normal. Para facilitar esta determinación, el array puede incluir elementos diana para uno o más loci que no se espera que presenten diferencias en el número de copias en el carcinoma endometrial.

En el modo bicolor o multicolor, la señal correspondiente a cada colección de ácidos nucleicos etiquetada (por ejemplo, ácidos nucleicos de la muestra y ácidos nucleicos normales de referencia) se detecta en cada punto del ácido nucleico diana del array. Las señales de cada punto se pueden comparar, por ejemplo, calculando un ratio. Por ejemplo, si el ratio de señal del ácido nucleico de la muestra con respecto a la señal del ácido nucleico de referencia es superior a uno, esto indica una ganancia en los ácidos nucleicos de la muestra en el locus correspondiente al punto de ácidos nucleicos del array. Por el contrario, si el ratio de la señal del ácido nucleico de la muestra con respecto a la señal del ácido nucleico de referencia es inferior a uno, esto indica una pérdida en los ácidos nucleicos de la muestra en el correspondiente locus.

10 **Otros métodos para detectar variaciones en el número de copias asociadas con el carcinoma endometrial**

Los expertos en la técnica apreciarán que las variaciones en cualquiera de los loci descritos en el presente se puede detectar utilizando otros métodos, incluyendo métodos basados en la amplificación y secuenciación de ADN de alto rendimiento.

15 **Detección basada en la amplificación**

En los ensayos basados en la amplificación, los ácidos nucleicos diana actúan como plantilla o plantillas de la reacción o reacciones de amplificación (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad del producto de la amplificación es proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. Los protocolos detallados para la PCR cuantitativa se proporcionan en Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.). Existen diversos sistemas de PCR cuantitativa disponibles en el mercado, tales como el sistema TaqMan de Applied Bio systems.

25 Otros métodos de amplificación adecuados, incluyen, entre otros, la reacción en cadena de ligasa (LCR) (véase Wu y Wallace (1989) Genomics 4: 560; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077; y Barringer et al. (1990) Gene 89: 117), la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA), la amplificación por transcripción (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), la replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874), la PCR dot y la PCR con adaptador del enlazador, etc.

30 La amplificación se realiza típicamente utilizando cebadores que amplifican de forma específica uno o más loci dentro de cada cromosoma o región cromosómica a analizar. La detección se puede realizar utilizando cualquier medio estándar, incluyendo una sonda de diana específica, una sonda universal que se une, por ejemplo, a una secuencia introducida en todos los ampliconos a través de uno o de los dos cebadores, o un colorante de unión a ADN de cadena doble (como, por ejemplo, SYBR Green). En realizaciones ilustrativas, se emplean sondas candado o sondas de inversión molecular para la detección.

35 **Secuenciación de ADN de alto rendimiento**

40 En realizaciones concretas, se utilizan métodos de amplificación para producir ampliconos adecuados para la secuenciación de ADN de alto rendimiento (es decir, automatizada). Por lo general, los métodos de amplificación que proporcionan una amplificación sustancialmente uniforme de las secuencias de nucleótidos diana se emplean para preparar bibliotecas de secuenciación de ADN que tienen buena cobertura. En el contexto de la secuenciación de ADN automatizada, el término "cobertura" se refiere al número de veces que la secuencia se mide tras la secuenciación. Los recuentos obtenidos son típicamente normalizados con respecto a una muestra o muestras de referencia para determinar el número de copias relativo. Por tanto, después de realizar una secuenciación automatizada de una pluralidad de ampliconos diana, el número normalizado de veces que se mide la secuencia refleja el número de ampliconos diana que incluye esa secuencia, lo que a su vez refleja el número de copias de la secuencia diana en el ADN de muestra.

50 La amplificación para la secuenciación puede implicar aislados de la PCR de emulsión en la que las moléculas de ADN individuales junto con los gránulos recubiertos de cebador se encuentran presentes en forma de pequeñas gotas acuosas en una fase oleosa. A continuación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) recubre cada gránulo con copias clonales de la molécula de ADN, seguida de la inmovilización para la posterior secuenciación. La PCR de emulsión se utiliza en los métodos de Marguilis et al. (comercializada por 454 Life Sciences), Shendure y Porreca et al. (también conocida como "secuenciación Polony") y secuenciación SOLiD, (desarrollada por Agencourt, actualmente Applied Biosystems). Otro método para la amplificación clonal in vitro para la secuenciación es la PCR de puente, donde los fragmentos se amplifican después de unir los cebadores a una superficie sólida, como la utilizada en el Illumina Genome Analyzer. Algunos métodos de secuenciación no requieren amplificación, como por ejemplo el método de molécula única desarrollado por el laboratorio Quake (posteriormente comercializado por Helicos). Este método utiliza fluoróforos brillantes y excitación láser para detectar eventos de pirosecuenciación de moléculas de ADN individuales fijadas a una superficie. Pacific Biosciences también ha desarrollado un método de secuenciación de molécula única que no requiere amplificación.

65 Tras la amplificación clonal in vitro (si resulta necesaria), las moléculas de ADN que se unen físicamente a una superficie son secuenciadas. La secuenciación por síntesis, como la secuenciación electroforética por terminación

fluorescente, utiliza una polimerasa de ADN para determinar la secuencia de base. Los métodos del terminador reversible (utilizados por Illumina y Helicos) utilizan versiones reversibles de terminadores fluorescentes, añadiendo un nucleótido cada vez, y detectando la fluorescencia en cada posición en tiempo real, mediante la eliminación repetida del grupo de bloqueo para permitir la polimerización de otro nucleótido. La pirosecuenciación (utilizada por 5 454) también emplea la polimerización de ADN, añadiendo una especie de nucleótido cada vez y detectando y cuantificando el número de nucleótidos añadidos a un determinado lugar a través de la luz emitida por la liberación de pirofosfatos unidos.

La secuenciación de Pacific Biosciences Single Molecule Real Time (SMRT™) se basa en la procesividad de la 10 polimerasa de ADN para secuenciar moléculas únicas y utiliza nucleótidos fosfoenlazados, cada tipo etiquetado con un fluoróforo de un color diferente. Dado que los nucleótidos son incorporados en una cadena de ADN complementaria, cada uno es contenido por la polimerasa de ADN dentro de un volumen de detección durante una mayor cantidad de tiempo de la que tarda el nucleótido en entrar y salir del volumen de detección. A continuación, la polimerasa de ADN cliva el enlace que anteriormente mantenía el fluoróforo en su lugar y el colorante sale del 15 volumen de detección de forma que la señal de fluorescencia vuelve al contexto de fondo. El proceso se repite a medida que avanza la polimerización.

La secuenciación por ligación utiliza la ligasa de ADN para terminar la secuencia diana. Utilizado en el método 20 Polony y en la tecnología SOLiD, este método emplea un conjunto de todos los oligonucleótidos posibles de una longitud determinada, etiquetados en función de la posición secuenciada. Los oligonucleótidos son renaturalizados y ligados; la ligación preferible por ligasa de ADN para las correspondientes secuencias produce una señal informativa del nucleótido en esa posición.

Combinaciones de sondas y kits para aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico

25 La invención incluye combinaciones de sondas altamente específicas y sensibles, como las descritas en el presente, que se pueden utilizar para detectar el carcinoma endometrial. La divulgación incluye kits para su uso en aplicaciones de diagnóstico, investigación y pronóstico. Los kits incluyen combinaciones de sondas y también 30 pueden incluir reactivos como tampones y similares. Los kits pueden incluir materiales instructivos con indicaciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta divulgación. A pesar de que los materiales de instrucciones incluyen típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a esto. Cualquier medio capaz de almacenar estas instrucciones y transmitir las al usuario final está contemplado por la presente divulgación. Estos 35 medios incluyen, entre otros, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (como CD ROM) y similares. Estos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan los mencionados materiales instructivos.

Referencias

40 1. Int J Mol Med. 2003 Nov;12(5):727-31. Una pérdida en 11q23-24 está asociada con una inestabilidad cromosómica en el cáncer endometrial. Kawasaki K, Suehiro Y, Umayahara K, Morioka H, Ito T, Saito T, Tsukamoto N, Sugino N, Kato H, Sasaki K.

45 2. Hum Genet. 1997 Oct; 100(5-6):629-36. Ganancias frecuentes en los brazos cromosómicos 1q y/o 8q en el cáncer endometrial humano. Suzuki A, Fukushima S, Nagase S, Ohuchi N, Satomi S, Horii A.

3. Cancer Genet Cytogenet. 2008 Feb;181(1):25-30. Amplificaciones de genes recurrentes en el adenocarcinoma endometrial humano de tipo I detectadas mediante hibridación in situ con fluorescencia. Samuelson E, Levan K, Adamovic T, Levan G, Horvath G.

50 4. Cytogenet Genome Res. 2006; 115(1): 16-22. Alteraciones cromosómicas en 98 adenocarcinomas endometroides analizadas con hibridación genómica comparativa. Levan K, Partheen K, Osterberg L, Helou K, Horvath G.

55 5. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005 May 1; 120(1): 107-14. Desequilibrios genéticos en la hiperplasia endometrial y el carcinoma endometriode detectados por hibridación genómica comparativa. Muslumanoglu HM, Oner U, Ozalp S, Acikalin MF, Yalcin OT, Ozdemir M, Artan S.

60 6. Am J Clin Pathol. 2004 Oct;122(4):546-51. Sobrerepresentación de 8q en carcinosarcomas y adenocarcinomas endometriales. Schulten HJ, Gunawan B, Enders C, Donhuijsen K, Emons G, Fiizesi L.

7. Hum Genet. 1997 Oct; 100(5-6):629-36. Ganancias frecuentes en los brazos cromosómicos 1q y/o 8q en el 65 cáncer endometrial humano. Suzuki A, Fukushima S, Nagase S, Ohuchi N, Satomi S, Horii A.

8. Genes Chromosomes Cancer. 1997 Feb; 18(2): 115-25. Detección de ganancias y pérdidas de ADN en 65 carcinomas endometriales primarios mediante hibridación genómica comparativa. Sonoda G, du Manoir S, Godwin AK, Bell DW, Liu Z, Hogan M, Yakushiji M, Testa JR.

9.USPN 5713369 titulada "Uterine endometrial tissue sample brush."

10.USPN 4227537 titulada "Endometrial brush with slidable protective sleeve."

5 11. Guido RS, Kanbour-Shakir A, Rulin MC, Christopherson WA. Pipelle endometrial sampling. Sensitivity in the detection of endometrial cancer. J Reprod Med 1995;40(8):553-5.

10 12.Critchley HO, Warner P, Lee AJ, Brechin S, Guise J, Graham B. Evaluation of abnormal uterine bleeding: comparison of three outpatient procedures within cohorts defined by age and menopausal status. Health Technol Assess 2004;8(34):iii-iv, 1- 139.

13.Del Priore G, Williams R, Harbatkin CB, Wan LS, Mittal K, Yang GC. Endometrial brush biopsy for the diagnosis of endometrial cancer. J Reprod Med 2001;46(5):439-43.

15 14.Kipp BR, Medeiros F, Campion MB, Distad TJ, Peterson LM, Keeney GL, et al. Direct uterine sampling with the Tao brush sampler using a liquid-based preparation method for the detection of endometrial cancer and atypical hyperplasia: a feasibility study. Cancer 2008;114(4):228-35.

20 15.Maksem JA. Performance characteristics of the Indiana University Medical Center endometrial sampler (Tao Brush) in an outpatient office setting, first year's outcomes: recognizing histological patterns in cytology preparations of endometrial brushings. Diagn Cytopathol 2000;22(3): 186-95.

25 16.Williams AR, Brechin S, Porter AJ, Warner P, Critchley HO. Factors affecting adequacy of Pipelle and Tao Brush endometrial sampling. Bjog 2008; 115(8): 1028- 36.

17.Yang GC, Wan LS. Endometrial biopsy using the Tao Brush method. A study of 50 women in a general gynecologic practice. J Reprod Med 2000;45(2):109-14.

Ejemplos

30 Los ejemplos siguientes se ofrecen a título ilustrativo y no limitan la invención reivindicada. Todos los ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones se aportan con fines comparativos.

Ejemplo 1

Estudios de array de CGH

Diseño del estudio

40 En un estudio colaborativo de Abbott Molecular y Mayo Clinic realizado en 2007-2009, se obtuvieron muestras congeladas de biopsias de carcinoma endometrial confirmado de 62 pacientes con el consentimiento informado en el momento de la cirugía en el Rochester Methodist Hospital de Mayo Clinic, Rochester, MN. Se cortaron secciones de 5 µm del tejido recogido y estas secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el análisis histológico. Las muestras con más de un 70% de tumor se seleccionaron para un análisis aCGH y las restantes secciones se dejaron sin teñir para futuros estudios clínicos.

50 El ADN de las muestras seleccionadas se extrajo y amplificó con anterioridad al análisis CGH con el sistema GenoSensor™. Los portaobjetos de microarrays de ADN de Vysis GenoSensor obtenidos de Abbott Molecular (Des Plaines, IL) se utilizaron para el análisis CGH. Los portaobjetos de microarrays contenían 287 dianas de ADN consistentes en oncogenes conocidos, genes supresores de tumores, y regiones de ganancia, pérdida o pérdida de heterocigosidad habitualmente asociada con el cáncer (**Adjunto 1**). Las dianas obtenidas de bibliotecas de BAC se dispusieron en arrays por triplicado.

55 Las muestras de ADN de ensayo y de referencia normales se etiquetaron con cebado aleatorio, utilizando reactivos de etiquetado Vysis GeneSensor, con Cyanine3-dCTP, and Cyanine5-dCTP (Perkin Elmer/NEN), respectivamente. El cebado aleatorio se refiere al proceso por el que los octámeros de ADN sintéticos de una secuencia aleatoria se unen a secuencias de ADN complementarias (a lo largo de una plantilla de ADN) y sirven como plantillas para la síntesis de ADN y la elongación mediante ADN polimerasa I (fragmento de Klenow). Tras la purificación adicional, el ADN de ensayo y de referencia se mezcló en una proporción igual (en tampón de hibridación), se desnaturalizó y se hibridó con el microarray de ADN genómico humano Vysis GenoSensor™ Array 300. La hibridación se produjo a 30°C durante 72 horas, tras el lavado y el análisis de los arrays. Las imágenes de los arrays se analizaron con el software GenoSensor™, que segmenta e identifica cada diana utilizando el plano de imagen azul (DAPI). El software mide las intensidades medias de los planos de imagen verde y rojo, elimina el fondo, determina el ratio medio de señal verde/rojo, y calcula el ratio más representativo del número de copias de ADN modal del ADN de la muestra. Las hibridaciones sin coincidencia de género (hombre/mujer o mujer/hombre) proporcionaron el control con respecto a la detección de los desequilibrios del número de copias autosómicas. Los arrays se hibridaron en la Mayo

Clinic y los datos de la aCGH obtenidos fueron analizados por Abbott Molecular.

En total, se disponía de 57 muestras de cáncer (44 endometrioides y 13 no endometrioides) y de nueve muestras normales para el análisis.

5

Resultados

Los datos de la CGH revelaron diversas dianas genómicas prometedoras para estos

10 conjuntos de sondas FISH de investigación (**Figura 1**). Las ganancias más frecuentes observadas en todos los carcinomas endometriales incluyeron áreas en los brazos cromosómicos 1q, 2p, 3q, 8q, and 20q. Las pérdidas más
comunes observadas en todos los carcinomas incluyeron 9p, 9q, 16q, 17p, 18q, and 22q. Cabe señalar que se
observaron diferentes cambios genómicos a la hora de comparar los subtipos endometrioides y no endometrioides.
15 Las ganancias en los brazos cromosómicos 1q, 10p y 10q fueron habituales en los carcinomas endometrioides. En
los carcinomas no endometrioides se observaron múltiples ganancias en el genoma y las ganancias más habituales
se observaron en 3q, 8q y 20q.

El análisis bruto de los cambios cromosómicos demostró que los cambios más frecuentes en todos los cánceres
analizados fueron los siguientes:

20

1. Ganancias en 1q31-qtel (20-30%)
2. Ganancias en 3q, 8q y 10q (aprox. 20%)
3. Ganancia en 2p (aprox. 15%)
4. Pérdidas en 9q (aprox. 18%)
5. Pérdidas en 15q11-q13 (aprox. 18%)
6. Pérdidas en 18q21.3 y 19ptel (aprox. 18-19%)
7. Pérdidas en 16q y 17p (aprox. 12%)

25

La Tabla1 proporciona datos de los loci afectados con mayor frecuencia (por clon del array).

30

Tabla 1 Loci con una frecuencia de desequilibrio en el número de copias genómicas >10% en las muestras de cáncer.

Clon #	Nombre del clon	Ubicación citológica	FREC. GAN. (%)	FREC. PÉRD.(%)	FREC. GAN. Ca (%)	FREC. PÉRD. Ca (%)	FREC. DESEQ. L Ca (%)	FREC. GAN. EN (%)	FREC. PÉRD. EN (%)	FREC. GAN. NE (%)	FREC. PÉRD. NE (%)
8	AMC2	q25-q31	7,27	,00	1,58	,00	1,58	4,09	,00	3,08	,00
0	GFB2	q41	2,73	,00	6,32	,00	6,32	1,82	,00	,69	,00
7	I-5663, I-13414	q21	1,21	,00	4,56	,00	4,56	7,27	,00	5,38	,00
1	KT3	q44	2,73	,00	4,56	,00	4,56	9,55	,00	,69	,00
2	HGC-18290	q tel	2,73	,00	4,56	,00	4,56	9,55	,00	,69	,00
36	29F16/SP6	9p tel	,03	6,67	,51	9,30	2,81	,27	8,18	,69	3,08
3	QTEL10	q tel	6,67	,00	9,30	,00	9,30	5,00	,00	,00	,00
6	YCN(N-myc)	p24.1	2,12	,55	4,04	,26	9,30	,82	,82	8,46	,00
4	F12	q tel	6,67	,00	9,30	,00	9,30	1,36	,00	6,15	,00
10	YC	q24.12- q24.13	6,67	,00	9,30	,00	9,30	,82	,00	1,54	,00
11	TK2	q24-qter	6,67	,00	9,30	,00	9,30	,82	,00	1,54	,00
22	SC1	q34	,52	5,15	,75	7,54	9,30	,27	,09	,00	6,15
35	GFR2	0q26	6,67	,00	9,30	,00	9,30	0,45	,00	5,38	,00
82	BE3A, 15S10	5q11-q13	,52	5,15	,75	7,54	9,30	,27	3,64	,00	0,77
31	CC	8q21.3	,52	6,67	,75	7,54	9,30	,27	,82	,00	3,85
3	P63	q27-q29	5,15	,00	7,54	,00	7,54	,09	,00	6,15	,00
06	GFR1	p11.2- p11.1	2,12	,03	4,04	,51	7,54	,09	,27	0,77	,69
21	BCCR1	q33.2	,52	3,64	,75	5,79	7,54	,27	,82	,00	6,15
6	QTEL11	q tel	0,61	,55	0,53	,26	5,79	3,64	,27	,00	5,38
02	8S596	p tel	,58	,06	,77	,02	5,79	,82	,55	5,38	5,38
96	RA16D	6q23.2	,03	0,61	,51	2,28	5,79	,00	,09	5,38	3,08
70	F2	2q 12.2	,58	,06	,77	,02	5,79	,82	,82	5,38	,69
71	DGFB(SIS)	2q13.1	,69	,15	,77	,02	5,79	,82	,27	5,38	3,08
9	TGS2(COX2)	q31.1	3,64	,00	5,79	,00	5,79	0,45	,00	,00	,00

Clon #	Nombre del clon	Ubicación citológica	FREC. GAN. (%)	FREC. PERD. (%)	FREC. GAN. Ca (%)	FREC. PERD. Ca (%)	FREC. DESEQ. L Ca (%)	FREC. GAN. EN (%)	FREC. PÉRD. EN (%)	FREC. GAN. NE (%)	FREC. PERD. NE (%)
7	SH2.KCNK12	p22.3-2p22.1	3,64	,00	5,79	,00	5,79	3,64	,00	3,08	,00
09	XT1	q24.11- q24.13	3,64	,00	5,79	,00	5,79	,82	,00	6,15	,00
12	HGC-3110	q tel	3,64	,00	5,79	,00	5,79	,55	,00	3,85	,00
6	1S2465, 1S3402	p12	0,61	,52	2,28	,75	4,04	,82	,27	0,77	,00
99	ANCA	6q24.3	,52	0,61	,75	2,28	4,04	,27	,09	,00	3,08
0	L6	p21	2,12	,00	4,04	,00	4,04	1,36	,00	3,08	,00
01	8S504	p tel	,06	,06	,02	,02	4,04	,82	,55	,69	5,38
37	1SG27915	0q tel	2,12	,00	4,04	,00	4,04	5,91	,00	,69	,00
97	DH13	6q24.2- q24.3	,00	2,12	,00	4,04	4,04	,00	,09	,00	0,77
5	PTEL27	p tel	0,61	,00	2,28	,00	2,28	1,36	,00	5,38	,00
8	2S447	q tel	,06	,55	,02	,26	2,28	,09	,27	,00	5,38
5	ASSF1	p21.3	0,61	,00	2,28	,00	2,28	,09	,00	3,08	,00
7	4S2930	q tel	,03	,58	,51	,77	2,28	,55	,27	,00	0,77
8	84C11/T3	p tel	,09	,52	0,53	,75	2,28	,09	,00	5,38	,69
2	TR1B	q13	,09	,52	0,53	,75	2,28	,09	,27	5,38	,00
36	MBT1	0q25.3- q26.1	,09	,52	0,53	,75	2,28	3,64	,00	,00	,69
78	GH(D14S308)	4q tel	2,12	,00	2,28	,00	2,28	,09	,00	3,08	,00
08	17S125, 17S61	7p12-p11.2	,00	0,61	,00	2,28	2,28	,00	,55	,00	8,46
10	LGL1	7p12-	,00	0,61	,00	2,28	2,28	,00	,82	,00	0,77
48	OP1	0q 12-q 13.1	,09	,52	0,53	,75	2,28	,55	,27	0,77	,00
49	COA3(AIB1)	0q 12	0,61	,00	2,28	,00	2,28	,27	,00	6,15	,00
57	PD52L2.TOM	0q tel	0,61	,00	2,28	,00	2,28	,55	,00	8,46	,00
69	CR	2q 11.23	,55	,58	,51	,77	2,28	,00	,82	5,38	5,38

Como se pone de manifiesto en la **Figura 2**, los tumores no endometrioides (NE) tenían un mayor número total de cambios genómicos en comparación con los tumores endometrioides (EN). Por otra parte, el patrón de cambios fue diferente entre los tumores EN y NE. Por ejemplo, los cambios en los loci **1q** y **10q** fueron más prevalentes en los tumores EN, mientras que los cambios en **8q** y **18q** fueron más prevalentes en los tumores NE.

5

Análisis de sensibilidad y especificidad

Se realizó un análisis para determinar los cambios en los loci más abundantes en los cánceres (tanto NE como EN) y proporcionar la máxima sensibilidad y especificidad en la detección del cáncer.

10

En primer lugar, se realizó un análisis de loci individuales y se seleccionaron los loci con el mejor valor de sensibilidad y especificidad representados por el parámetro DFI calculado como:

$$DFI = \sqrt{(1 - SENS)^2 + (1 - SPEC)^2}$$

15

Como se muestra a continuación, el mejor rendimiento fue demostrado por los loci que se encuentran en el brazo largo del cromosoma 1.

SONDA 1	Caso # muestra	SENS.	ESPEC. vs normal	DFI vs. normal
LAMC2:18:1q25-q31	57	0,3158	1,0000	0,6842
TGFB2:20:1q41	57	0,2632	1,0000	0,7368
WI-5663,WI-13414:17:1 q21	57	0,2456	1,0000	0,7544
SHGC-18290:22:1q tel	57	0,2456	1,0000	0,7544
AKT3:21:1q44	57	0,2456	0,8889	0,7625

20

A continuación, consideramos clones adicionales y elegimos una sonda representativa para un segmento en el que varias sondas se ubicaron en una región de reordenación aparentemente contigua. Es evidente (**Tabla 2**) que la sensibilidad y especificidad de los loci individuales son bajas. Por tanto, se evaluaron combinaciones de los loci que se indican a continuación.

Tabla 2: Rendimiento de clones individuales para clones seleccionados.

Clon	control		caso		caso		caso		Control		chi cuadr. prob
	# muestra	SENS.	# muestra	SENS.	DFI. vs normal	ESPEC. vs normal	marcador (s)+	marcador (s)-	marcador (s)+	marcador (s)-	
LAMC2:18:1q25-q31	9	0,0000	57	0,3158	1,0000	0,6842	18	39	0	9	4,8060E-02
MYCN(N-myc):26:2p24.1	9	0,0000	57	0,1930	1,0000	0,8070	11	46	0	9	1,4883E-01
RASSF1:45:3p21.3	9	0,0000	57	0,1228	1,0000	0,8772	7	50	0	9	2,6617E-01
TP63:53:3q27-q29	9	0,0000	57	0,1754	1,0000	0,8246	10	47	0	9	1,7252E-01
IL6:90:7p21	9	0,0000	57	0,1404	1,0000	0,8596	8	49	0	9	2,3056E-01
FGFR1:106:8p11,2-p11.1	9	0,0000	57	0,1754	1,0000	0,8246	10	47	0	9	1,7252E-01
MYC:110:8q24.12-q24.13	9	0,0000	57	0,1930	1,0000	0,8070	11	46	0	9	1,4883E-01
TSC1:122:9q34	9	0,0000	57	0,1930	1,0000	0,8070	11	46	0	9	1,4883E-01
PTEN:134:10q23.3	9	0,2222	57	0,0702	0,7778	0,9560	4	53	2	7	1,4034E-01
FGFR2:135:10q26	9	0,0000	57	0,1930	1,0000	0,8070	11	46	0	9	1,4883E-01
UBE3A,D15S10:182:15q11-q13 anomal	9	0,0000	57	0,1930	1,0000	0,8070	11	46	0	9	
FANCA:199:16q24.3	9	0,0000	57	0,1404	1,0000	0,8596	8	49	0	9	2,3056E-01
DCC:231:18q21.3	9	0,1111	57	0,1930	0,8889	0,8146	11	46	1	8	5,5398E-01
NCOA3(AIB1):249:20q12	9	0,0000	57	0,1228	1,0000	0,8772	7	50	0	9	2,6617E-01
ZNF217(ZABC1):254:20q13.2	9	0,0000	57	0,0702	1,0000	0,9298	4	53	0	9	4,1224E-01

La complementación entre los loci seleccionados en todas las muestras sometidas a ensayo se representa en la **Figura 3**.

5 A continuación, se evaluó la sensibilidad y especificidad en la detección del tumor utilizando el software de análisis estadístico JPM (SAS Institute), empleando un análisis de tablas de contingencia de X/Y. En este análisis se evaluaron los 13 loci y grupos de 10, 9 y 8 clones complementarios. Una muestra se consideró positiva cuando **uno de los loci** (al menos un locus) del grupo era positivo.

10 **1. Conjunto de los 14 clones:**

Tumor	Pos/Neg 14 Loci	
	Fila%	
NORMAL	88,89	11,11
TUMOR	28,07	71,93

Tests

N	DF -LogLike	RSquare (U)
990	1 94,293904	0,1453

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Ratio Probable	188,588	<,0001*
Pearson	186,366	<,0001*

Test exacto de Fisher's	Prob	Hipotesis Alternativa
Izquierda	1,0000	¿Prob(Pos/Neg 14 Loci=POS)es mayor para el tumor? =NORMAL que TUMOR
Derecha	<,0001*	¿Prob(Pos/Neg 14 Loci=POS)es mayor para el tumor? =TUMOR que NORMAL
Bilateral	<,0001*	¿Prob(Pos/Neg 14 Loci=POS) es diferente entre tumores?

15 **2. Un subconjunto representativo de 10 clones:**

- DCC
- FGFR2
- IL6
- LAMC2
- MYC
- MYCN(N-myc)
- PTEN
- RASSF1
- TSC1
- UBE3A,D15S10

Tumor	Pos/Neg 10	
	Fila%	
NORMAL	66,67	33,33
TUMOR	26,32	73,68

Tests

N	DF -LogLike	RSquare (U)
---	-------------	-------------

Tests		
N	DF	-LogLike RSquare (U)
924	1	37,838597 0,0655
Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Ratio Probable	75,677	<,0001*
Pearson	81,670	<,0001*
Test exacto de Fisher's	Prob	Hipotesis Alternativa
Izquierda	1,0000	¿Prob(Pos/Neg 10 Loci=POS)es mayor para el tumor? =NORMAL que TUMOR
Derecha	<,0001*	¿Prob(Pos/Neg 10 Loci=POS)es mayor para el tumor? =TUMOR que NORMAL
Bilateral	<,0001*	¿Prob(Pos/Neg 10 Loci=POS) es diferente entre tumores?

3. Un subconjunto representativo de nueve clones

DCC
 FGFR2
 IL6
 LAMC2
 MYC
 MYCN(N-myc)
 RASSF1
 TSC1

UBE3A,D15S10

Tumor	Pos/Neg 9	
	NEG	POS
Fila %		
NORMAL	88,89	11,11
TUMOR	28,07	71,93

5

Tests		
N	DF	-LogLike RSquare (U)
924	1	88.007643 0.1453
Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Ratio Probable	176,015	<,0001*
Pearson	173,942	<,0001*
Test exacto de Fisher'st	Prob	Alternative Hypothesis
Izquierda	1,0000	¿Prob(Pos/Neg 9 Loci=POS)es mayor para el tumor? =NORMAL que TUMOR
Derecha	<,0001 *	¿Prob(Pos/Neg 9 Loci=POS)es mayor para el tumor? =TUMOR que NORMAL
Bilateral	<,0001 *	¿Prob(Pos/Neg 9 Loci=POS) es diferente entre tumores?

4. Un subconjunto representativo de ocho clones:

FGFR2
IL6
LAMC2
MYC
MYCN(N-myc)
RASSF1 TSC1
UBE3A,D15S10

Tumor

Pos/Neg 8 Loci		
Fila%	NEG	POS
NORMAL	100,00	0,00
TUMOR	29,82	70,18

Tests

N	DF	-LogLike RSquare (U)
924	1	133.24371 0.2151

Test	ChiSquare Prob>ChiSq
Ratio Probable	266.487 <.0001 *
Pearson	224.453 <.0001 *

Test exacto de Fisher's	Prob	Hipotesis Alternativa
Izquierda	1,0000	¿Prob(Pos/Neg 8 Loci=POS)es mayor para el tumor? =NORMAL que TUMOR
Derecha	<.0001 *	¿Prob(Pos/Neg 8 Loci=POS)es mayor para el tumor? =TUMOR que NORMAL
Bilateral	<.0001 *	¿Prob(Pos/Neg 8 Loci=POS) es diferente entre tumores?

5

Selección del conjunto de sondas para FISH

Para seleccionar conjuntos de sondas de cuatro colores para otros experimentos FISH, evaluamos los loci seleccionados más detalladamente, complementando el análisis estadístico con una revisión de la bibliografía. Del posterior análisis para la selección de la sonda excluimos los loci anteriormente implicados en enfermedades endometriales benignas. Por otra parte, consideramos que NCOA3 y ZNF217 están potencialmente ubicados en un segmento de reordenación y por tanto elegimos la sonda disponible, ZNF 217, para realizar nuevos estudios FISH.

10

Clon en array:	Disponibilidad de sonda Vsis FISH
1q25-q31, LAMC2	sonda 1q25
18q21.3, DCC:pérdida	Sonda disponible
1q24, MYC	Sonda disponible
10q26, FGFR2: ganancia (10q23 en bibliografía)	No sonda/clon PTENq23.3
15q11, UBEEA: delección	Sonda PWS
3q27-q29, TP63: ganancia (3q24-26.4 documentado en bibliografía)	2 clones o sustitución por PIK3CA
3p21.3, RASSF1: ganancia	2 clones
7p21, IL6: ganancia	1 clon
2p24.1, MYCN: ganancia	Sondas SG, SO
8p11.2, FGFR1: ganancia/delección	2 clones
9q33-34 (TSC1): pérdida (detectado también en endometriosis)	
20q12-q13 (NCOA3?): ganancia (en bibliografía q13.2)	20q11.2 HIRA, 20q13.2 ZNF217
16Q24.2-Q24.3: pérdida (16q bibliografía)	

15 Como se pone de manifiesto por los anteriores resultados, los datos de la CGH producidos por el array Genosensor produjeron varias dianas cromosómicas preliminares, incluyendo LAMC2 (1q25), NMYC (2p24.1), PIK3CA (3q27-q29), MYC (8q24), FGFR2 (10q26), la región centromérica del cromosoma 18 (CEP18), DCC (18q21), y ZNF217 (20q13). De estas ocho sondas, se identificaron numerosas combinaciones potenciales de cuatro sondas y las sondas se agruparon en conjuntos de sondas.

20

ES 2 621 812 T3

5 El análisis de tablas de contingencia se utilizó para evaluar las combinaciones de sondas y estas se clasificaron en función de un valor chi cuadrado p y de un valor DFI. Habida cuenta de que al menos algunos de los loci (como DCC) representan deleciones, primero evaluamos combinaciones de tres sondas para poder añadir una sonda enumeradora de cromosomas (CEP) al conjunto de sondas en caso necesario, como control para una sonda de deleción. A continuación, se muestra la lista de la mejor combinación de tres sondas para detectar el cáncer endometrial (**Tabla 3**) con un valor chi cuadrado p de 0,05.

10 Los siguientes conjuntos de sondas se seleccionaron y utilizaron en experimentos FISH utilizando la **Tabla 3** como guía. Se diseñaron y fabricaron nuevas sondas en Abbott Molecular R&D como se indica a continuación.

<u>Juego de sondas</u>	<u>Juego de sondas #3</u>		
<u>#1</u>			
1q25	SpectrumGold	PTEN (10q23.3)	SpectrumOrange
DCC (18q21.2)	SpectrumRed	CEP10	SpectrumGreen
CEP18	SpectrumGreen	FGFR1 (8p11.2)	SpectrumAqua (nueva sonda)
MYC (8q24)	SpectrumAqua		
<u>Juego de sondas</u>			
<u>#2</u>			
MYCN (2p24.3)		SpectrumGreen (nueva sonda)	
PIK3CA (2q26.32)		SpectrumGold	
FGFR2 (10q26.13)		SpectrumAqua (nueva sonda)	
ZNF217 (20q13.2)		SpectrumRed	

Tabla 3: Mejores combinaciones de tres sondas seleccionadas ($p < 0,05$).

SONDA1	SONDA2	SONDA3	Normal						Cáncer						ch.oad prob
			#Sondas	#muestras	SENS.	marcador (+)	marcador (-)	#muestras	SENS.	EFPEC vs normal	DFUs normal	Marcador (+)	marcador (-)		
LAMC2:181:q25-q31	MYC:1108q24.12-q24.13	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,5439	1,0000	0,4561	31	26	0,0024		
LAMC2:181:q25-q31	FGFR2:135:10q26	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,5439	1,0000	0,4561	31	26	0,0024		
LAMC2:181:q25-q31	MYCN:Nmyc:2B2p24.1	MYC:1108q24.12-q24.13	3	9	0,0000	0	9	0,5363	1,0000	0,4737	30	27	0,0032		
LAMC2:181:q25-q31	MYC:1108q24.12-q24.13	FGFR2:135:10q26	3	9	0,0000	0	9	0,5363	1,0000	0,4737	30	27	0,0032		
LAMC2:181:q25-q31	FGFR1:108q11.2-p11.1	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,5363	1,0000	0,4737	30	27	0,0032		
LAMC2:181:q25-q31	MYCN:Nmyc:2B2p24.1	FGFR1:108q11.2-p11.1	3	9	0,0000	0	9	0,5088	1,0000	0,4912	29	28	0,0043		
LAMC2:181:q25-q31	FGFR1:108q11.2-p11.1	FGFR2:135:10q26	3	9	0,0000	0	9	0,5088	1,0000	0,4912	29	28	0,0043		
LAMC2:181:q25-q31	FGFR1:108q11.2-p11.1	MYC:1108q24.12-q24.13	3	9	0,0000	0	9	0,4912	1,0000	0,5088	28	29	0,0056		
LAMC2:181:q25-q31	MYCN:Nmyc:2B2p24.1	FGFR2:135:10q26	3	9	0,0000	0	9	0,4912	1,0000	0,5088	28	29	0,0056		
LAMC2:181:q25-q31	MYCN:Nmyc:2B2p24.1	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,4737	1,0000	0,5263	27	30	0,0072		
MYC:1108q24.12-q24.1	FGFR2:135:10q26	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,4737	1,0000	0,5263	27	30	0,0072		
LAMC2:181:q25-q31	FGFR1:108q11.2-p11.1	ZNF217(ZABC1):25q42q13	3	9	0,0000	0	9	0,4737	1,0000	0,5263	27	30	0,0072		
LAMC2:181:q25-q31	MYC:1108q24.12-q24.13	ZNF217(ZABC1):25q42q13	3	9	0,0000	0	9	0,4737	1,0000	0,5263	27	30	0,0072		
LAMC2:181:q25-q31	UBE3A:D15S10:182:15q1	ZNF217(ZABC1):25q42q13	3	9	0,0000	0	9	0,4737	1,0000	0,5263	27	30	0,0072		
LAMC2:181:q25-q31	FGFR2:135:10q26	ZNF217(ZABC1):25q42q13	3	9	0,0000	0	9	0,4661	1,0000	0,5439	26	31	0,0093		
FGFR1:108q11.2-p11	FGFR2:135:10q26	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,4396	1,0000	0,5614	25	32	0,0117		
LAMC2:181:q25-q31	MYCN:Nmyc:2B2p24.1	ZNF217(ZABC1):25q42q13	3	9	0,0000	0	9	0,4396	1,0000	0,5614	25	32	0,0117		
MYCN:Nmyc:2B2p24.1	FGFR1:108q11.2-p11.1	FGFR2:135:10q26	3	9	0,0000	0	9	0,4211	1,0000	0,5789	24	33	0,0147		
MYCN:Nmyc:2B2p24.1	MYC:1108q24.12-q24.13	FGFR2:135:10q26	3	9	0,0000	0	9	0,4211	1,0000	0,5789	24	33	0,0147		
MYCN:Nmyc:2B2p24.1	FGFR2:135:10q26	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,4085	1,0000	0,5965	23	34	0,0182		
MYCN:Nmyc:2B2p24.1	MYC:1108q24.12-q24.13	UBE3A:D15S10:182:15q11-	3	9	0,0000	0	9	0,3960	1,0000	0,6140	22	35	0,0225		

Los conjuntos de sondas número 1 y 2 en relación con los datos de la aCGH se muestran en la **Figura 4**. El gráfico ilustra que las sondas se seleccionaron de manera que se pudiera detectar tanto los tumores endometrioides como no endometrioides.

5 **Estudios de hibridación in situ con fluorescencia**

Diseño del estudio

En estos momentos se está realizando un estudio de selección de sondas para determinar qué combinación de cuatro sondas de las ocho sondas FISH puede detectar de forma más precisa el carcinoma endometrial.

Para este estudio de selección de sondas se utilizaron muestras guardadas de tejido endometrial introducido en parafina y fijado con parafina tomadas de pacientes que se sometieron a una histerectomía o biopsia de Pipelle entre 2000 y 2006. Para el análisis FISH se seleccionaron diversas muestras en las que se había diagnosticado un carcinoma (de tipo endometriode y no endometriode), hiperplasia simple y compleja, y epitelio endometrial normal (**Tabla 4**).

También se evaluaron diez muestras histológicamente negativas de pacientes sin un historial de carcinoma endometrial como estudio del valor normal. Se prepararon seis portaobjetos seccionados con parafina para cada caso: uno se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) y se prepararon cinco portaobjetos no teñidos para el análisis FISH. El portaobjetos de H&E fue microscópicamente analizado por un patólogo especializado en ginecología y se identificaron las áreas de interés (tumor en muestras de cáncer; epitelio normal en muestras benignas) para el análisis FISH. Esta área de interés se marcó al mismo tiempo en los portaobjetos de tejido no teñido y se hibridó con cada uno de los dos conjuntos de sondas FISH (se utilizaron portaobjetos separados para cada uno de los dos conjuntos de sondas).

Tabla 4. Población de pacientes

	Casos Genosensor	No Genosensor	Total
Normal	0	10	10
Hiperplasia simple	0	5	5
Hiperplasia compleja	2	4	6
Endometriode Grado 1	8	7	15
Endometriode Grado 2	7	3	10
Endometriode Grado 3	6	4	10
Seroso	6	3	9
Células claras	1	1	2
MMMT	2	1	3
Total	32	38	70

Los portaobjetos hibridados se evaluaron utilizando microscopía de fluorescencia. El área de interés se identificó, se evaluaron 50 células (50 células tumorales para casos de cáncer o preneoplásicos y 50 células normales para los casos normales) y se registró el número de señales de cada una de las cuatro sondas. Un ejemplo representativo de células de cáncer endometrial que presentan múltiples ganancias para estas sondas se muestra en la **Figura 5**. Abbott Molecular, Inc. realizó un análisis estadístico utilizando patrones de señales de todas las células registradas. Las 10 muestras histológicamente negativas se utilizaron para calcular el número de señales presentes en el tejido endometrial normal. Se realizaron análisis de la curva ROC para determinar los valores de corte óptimos utilizados para discriminar anomalías cromosómicas (ganancias y pérdidas) de células con un contenido cromosómico normal para cada sonda analizada. Se evaluaron numerosas combinaciones de cuatro sondas diferentes utilizando esta técnica para determinar la mejor combinación de sondas para distinguir el cáncer endometrial del tejido endometrial normal y lesiones precursoras.

Resultados

Conjuntos de sondas 1 y 2.

Se evaluaron los conjuntos de sondas 1 y 2 con todas las muestras. **La Figura 6** ilustra la proporción de células con anomalías cromosómicas por subtipo histológico para cada una de las ocho sondas. Las muestras endometriales normales no presentaban ninguna o presentaban muy pocas células con ganancias cromosómicas y aproximadamente el 5-20% de las células presentaba una forma de pérdida cromosómica. Por otra parte, muy pocas células (<10%) con ganancias cromosómicas fueron identificadas en las muestras de hiperplasia.

Se analizaron los parámetros FISH siguientes:

1. % ganancia, porcentaje de células con una ganancia en el número de copias (> 2 copias por célula) de un

locus de 50 células sometidas a recuento (50 = 100%)

2. % pérdida, porcentaje de células con una pérdida en el número de copias (< copias por célula) de un locus de 50 células sometidas a recuento (50=100%)

5 3. % anomalía, porcentaje de células con una pérdida en el número de copias (< 2 copias por célula) O una ganancia en el número de copias (> 2 copias por célula) de un locus de 50 células sometidas a recuento (50 = 100%)

10 Las conclusiones extraídas de la **Figura 6** son las siguientes: No se observaron ganancias en las muestras normales para DCC, CEP18, MYC y 1q24. El aumento en el porcentaje de células con ganancias se observó en las muestras normales, en la hiperplasia y el cáncer, aunque las mayores ganancias se observaron en los tumores no endometrioides. Con las pérdidas, no existe una separación clara entre las muestras normales, de hiperplasia y cáncer. Se observa una tendencia en el aumento del porcentaje de anomalías de las muestras normales, de hiperplasia y cáncer, y el mayor número de anomalías se da en los tumores no endometrioides. MYC y 1q24 parecen presentar el mayor rango de diferencia.

15 Las sondas dirigidas a 1q25 y 8q24 tenían el máximo porcentaje de células anómalas en las muestras con cánceres EN y NE. Todas las demás sondas detectaron aproximadamente la misma proporción de células con ganancias en los cánceres EN y NE. Por lo que respecta a las pérdidas cromosómicas, 18q (DCC) y CEP 18 presentaron el mayor número de células con pérdidas en los cánceres EN y NE, así como en las muestras normales y de hiperplasia.

20 Se realizó un análisis multivarianza para determinar qué combinación de cuatro sondas producía la mejor combinación de sensibilidad y especificidad para los cánceres EN y NE. Utilizando el software JMP 8.0 Statistical Analysis (SAS Institute, 2008) se testaron 70 combinaciones de cuatro sondas de las ocho sondas disponibles. "% de anomalía" se seleccionó como el parámetro FISH para el análisis (véanse las definiciones) y se utilizó la plataforma Nominal Logistic Regression con las muestras de ensayo seleccionadas como "todos los cánceres" y muestras de control como hiperplasia + normal.

30 Se elaboraron curvas ROC y se seleccionaron las 20 combinaciones mejores con el AUC más elevado. Se ejecutó el programa de combinaciones Excel con las combinaciones seleccionadas para obtener datos de alta resolución sobre la sensibilidad y la especificidad. El programa elaboró tablas de contingencia y calculó valores DFI para las combinaciones de cuatro sondas en cada nivel de corte del porcentaje de "anomalías" para cada sonda.

35 Los resultados de estos análisis revelaron numerosos conjuntos de cuatro sondas de posibles candidatos (**Tabla 5**). El conjunto con la mejor combinación de sondas incluía DCC, 1q24, MYC, y CEP18 que presentaba un AUC de 0,952 con una sensibilidad de 1,000 y una especificidad de 0,9048. Otras tres combinaciones tenían una sensibilidad de 0,979 y una especificidad de 0,900 que incluían (conjunto 2) 1q24, 18q, MYC, FGFR2, CEP18, (conjunto 3) DCC, 1q24, FGFR2, CEP18, y (conjunto 4) 1q24, MYC, CEP 18 y PIK3CA.

40 Tabla 5. Combinaciones de sondas que discriminan el cáncer de las muestras normales y de hiperplasia Porcentaje de células analizadas con alguna anomalía (% anomalía) utilizando JMP8.0 con el programa de combinaciones Excel (análisis de tablas de contingencia). Ensayo = todos los cánceres; Control = hiperplasia + normal

Locus 1	Locus 2	Locus 3	Locus 4	AUC (JMP)	Mejor sens LM	Mejor espec LM
DCC	1q24	MYC	CEP18	0,95238	1,0000	0,9048
1q24	MYC	FGFR2	CEP18	0,95918	0,9796	0,9000
DCC	1q24	FGFR2	CEP18	0,95867	0,9796	0,9000
1q24	MYC	CEP18	PIK3CA	0,95306	0,9796	0,9000
DCC	1q24	MYC	FGFR2	0,95714	0,9592	0,9000
1q24	NMYC	FGFR2	CEP18	0,95714	0,9592	0,9000
1q24	FGFR2	CEP18	PIK3CA	0,95714	0,9592	0,9000
1q24	FGFR2	CEP18	20q13	0,95612	0,9592	0,9000
1q24	CEP18	PIK3CA	20q13	0,95612	0,9592	0,9000
1q24	NMYC	CEP18	PIK3CA	0,9551	0,9592	0,9000
DCC	1q24	FGFR2	20q13	0,95408	0,9388	0,9000
	1q24	MYC	CEP18		0,9796	0,9048
DCC	1q24		CEP18		0,9796	0,9048
	1q24		CEP18		0,9592	0,9048

45 Las Figuras 7 y 8 presentan curvas de ROC para la combinación de sondas seleccionada. Las figuras ponen de manifiesto que añadir sondas a un ensayo FISH de una sola sonda mejora la sensibilidad y la especificidad.

La distribución por tipo y grado de tumor se muestra a continuación (Tabla 6):

Tabla 6. Tipo y grado de tumor según FISH (4Best) % anomalía: POS o NEG. Los cortes utilizados se recogen en la Figura 7.

Recuento Fila%	NEG	POS	Total
Normal	10 100,00	0 0,00	10
Hiperplasia simple	4 80,00	1 20,00	5
Hiperplasia compleja	5 83,33	1 16,67	6
Endometrioide Grado 1	0 0,00	15 100,00	15
Endometrioide Grado 2	0 0,00	10 100,00	10
Endometrioide Grado 3	0 0,00	10 100,00	10
Carcinosarcoma/MMMT	0 0,00	3 100,00	3
Células claras	0 0,00	2 100,00	2
Seroso	0 0,00	9 100,00	9
	19	51	70

5 La detección de positivos en las muestras de hiperplasia compleja se podría deber a la heterogeneidad de esta categoría y podría reflejar el riesgo de progresión del cáncer.

Comparación de datos de FISH frente a aCGH

10 El rendimiento del conjunto de sondas FISH lq24, CEP16, DCC y MYC se comparó mediante análisis de contingencia en JMP 8.0 con el conjunto de selección de sondas 1 de la aCGH (Probe Selection Set #1):

- 15 DCC (18q21.3) - frecuencia de pérdida en todos los cánceres -17%
- Cep 18- incluida para el conjunto de sondas FISH (detección de deleciones)
- LAMC2 (1q25) - frecuencia de ganancia en todos los cánceres >20%
- MYC (8q24.12-q24.13) - frecuencia de ganancia en todos los cánceres -17%

Tabla de contingencia de Array (Ca vs. N)

Uno de los loci cambiados

Recuento Fila%	NEG	POS	
Ca	28 49,12	29 50,88	57
N	8 88,89	1 11,11	9
	36	30	66

Sensibilidad = 50,88% (29 de 57)
Especificidad = 88,89% (8 de 9)

Tabla de contingencia de FISH (Ca vs. N+Hiperplasia)

FISH (4Best) %Deseq: POS o NEG

Recuento Fila%	NEG	POS	
Ca	0 0,00	49 100,00	49
N	19 90,48	2 9,52	21
	19	51	70

¿Testo ref?

Sensibilidad =100% (49 de 49)
Especificidad = 90,48% (19 de 21)

20 Resulta evidente que el ensayo FISH con la sonda diseñada basada en los resultados del microarray han mejorado de forma significativa el rendimiento del array. Esto se debe posiblemente a la influencia de las células benignas en los tumores macro-disecados que diluyen el ADN del tumor del analito y por tanto generan una menor sensibilidad. Este problema con los experimentos de microarray se podrían superar con una cuidadosa selección de muestras con un elevado porcentaje de células tumorales y con la micro-disección de la zona del tumor.

25 **Análisis de ganancias en el número de copias solo, mejores combinaciones: Cáncer vs Normal + Hiperplasia**

Para una aplicación práctica de la FISH, se evaluó una combinación alternativa de sondas que evita técnicamente la difícil detección de pérdidas (las pérdidas y ganancias se consideran en el parámetro de "% anomalía").

30

ES 2 621 812 T3

Tras el procedimiento anteriormente indicado, todas las combinaciones de cuatro sondas se analizaron y se seleccionaron las mejores (análisis preliminar utilizando la SD del % de células en Excel). Tabla 7 y Figura 9.

Tabla 7. Mejores combinaciones de cuatro sondas, solo ganancias.

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	SENS.	ESPEC	DFI	CORTE 1	CORTE 2	CORTE 3	CORTE 4
1q24	MYC	CEP18	20q13.2	0,84	0,95	0,17	41,30	8,36	7,91	4,46
1q24	CEP18	PIK3CA	20q13.2	0,84	0,95	0,17	8,36	7,91	18,47	4,46
1q24	CEP18	20q13.2	FGFR2	0,84	0,90	0,19	8,36	7,91	4,46	15,71

Cabe señalar que las combinaciones anteriormente mencionadas han mejorado por lo que respecta a la especificidad para la detección del cáncer aunque ha disminuido su sensibilidad, especialmente para los tumores endometrioides en un estadio temprano (Figura 9 y Tabla 8).

- 5 La distribución de muestras positivas y negativas utilizando el conjunto de sondas lq24, MYC, CEP18 y 20q13 se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Tipo y grado de tumor según FISH: Ganancias en MYC, CEP18, lq24, 20q13. Los cortes utilizados se recogen en la Figura 9.

Recuento Fila%	NEG	POS	Total
Normal	10 100,00	0 0,00	10
Hiperplasia simple	4 80,00	1 20,00	5
Hiperplasia compleja	5 83,33	1 16,67	6
Endometrioide Grado 1	3 20,00	12 80,00	15
Endometrioide Grado 2	1 10,00	9 90,00	10
Endometrioide Grado 3	0 0,00	10 100,00	10
Carcinosarcoma/MMMT	0 0,00	3 100,00	3
Células claras	0 0,00	2 100,00	2
Seroso	0 0,00	9 100,00	9
	23	47	70

- 10 Como se pone de manifiesto en la tabla, este conjunto (ganancias FISH) tiene una menor sensibilidad a los tumores endometriales de bajo grado.

Evaluación del conjunto de sondas 3

- 15 El conjunto de sondas 3 (Probe set # 3) se evaluó con 16 muestras de cáncer endometrioide en un estadio temprano y 12 muestras benignas (normal e hiperplasia) para determinar si mejoraba la sensibilidad de detección de tumores endometrioides en un estadio temprano (grados 1 y 2) con el ensayo FISH que evalúa las ganancias de MYC, CEP18, 1q24, 20q13.

- 20 El análisis de los datos FISH ha demostrado que la adición de la pérdida de PTEN a la sonda seleccionada establecida a un corte del 14% podría aumentar la sensibilidad de detección del cáncer endometrial hasta el 100%, aunque disminuyendo la especificidad (Figura 10). Esta conclusión coincide con los datos de la aCGH anteriormente expuestos. Por el contrario, una adición del "% células anómalas" del cromosoma 10 a las sondas seleccionadas a un corte del 10-12% de las células con alguna anomalía (ganancia o pérdida) permite una mayor sensibilidad sin sacrificar la especificidad. Cabe señalar que una combinación de CEP 10 con MYC, CEP 18, y lq24 produjo el mismo 100% de sensibilidad para las 16 muestras de cáncer y un 92% de especificidad con las 12 muestras normales + hiperplasia. Por tanto, otra evaluación de la aneusomía 10 al conjunto de sondas FISH podría resultar beneficiosa. La adición de FGFR1 no mejoró de forma significativa la detección del cáncer; sin embargo, cuando se utilizó en combinación con las sondas CEP10, lq24 y MYC, la ganancia de FGFR1 a un corte del 2% de las células produjo un 100% de sensibilidad para las 16 muestras de cáncer y un 92% de especificidad para las 12 muestras normales + hiperplasia. Sin embargo, si se tienen en cuenta las 70 muestras (con datos limitados incluidos para el conjunto de sondas 3), la única sonda que no produjo un descenso de la especificidad en combinación con las sondas de ganancia MYC, 1q24, 20q13, y CEP18 fue FGFR1 a un corte de $\geq 2\%$ de las células con ganancia de la sonda:

¿Test o Ref? Por ganancia MYC, ganancia 1q24, ganancia 20q13, ganancia CEP18, ganancia FGFR1:

Recuento Fila%	NEG	POS	Total
Ca	2 4,08	47 95,92	49
N+Hiperpl	19 90,48	2 9,52	21
	21	49	70

Cabe señalar que una combinación de 20q13.2, 1q24, CEP10 y FGFR1 en el conjunto de las 70 muestras (con los datos disponibles hasta la fecha) demostró una sensibilidad y especificidad del 96% y 91%, como se muestra a continuación:

5

¿Test o Ref? Por 20q13, CEP10, 1q24, FGFR1			
Recuento Fila%	NEG	POS	Total
Ca	2 4,08	47 95,92	49
N+Hiperpl	19 90,48	2 9,52	21
	21	49	70

Dado que no se dispone de los datos de todas las muestras en estos momentos para el conjunto de sondas 3 (Probe Set #3), parece factible que la combinación de cuatro sondas que evalúan la ganancia de 20q13, la ganancia de 1q24, el desequilibrio de CEP 10, y la ganancia de FGFR1 podría resultar superior al conjunto de sondas 1q24, MYC, CEP8 y 20q13.2 en experimentos futuros.

10

Evaluación del conjunto de sondas 4

El conjunto de sondas 4 (Probe set # 4) se evaluó con el mismo conjunto de muestras de cáncer endometrioide, muestras normales y de hiperplasia anteriormente descrito para determinar si mejora la sensibilidad de detección de tumores endometrioides de bajo grado (grados 1 y 2) con respecto al ensayo FISH que evalúa las ganancias de MYC, CEP18, 1q24, 20q13.

15

El análisis de los datos FISH demuestra que la sustitución de la ganancia de FGFR1 (con un corte del 4%) por 20q en el conjunto de sondas MYC, 1q25, y CEP18 proporcionó una sensibilidad del 90% que fue similar a la del conjunto de sondas MYC, 1q25, CEP18 y 20q. Sin embargo, la adición de FGFR1 provocó que una muestra de hiperplasia compleja adicional se diagnosticara como positiva. (Tabla 9).

20

Cabe señalar que otros análisis revelaron que FGFR1 podría aumentar de forma significativa la sensibilidad del conjunto de cuatro sondas con respecto a 20q. Cuando el corte de FGFR1 se redujo al 2%, la combinación de sondas FGFR1, MYC, 1q25, y CEP18 presentaba una sensibilidad y especificidad del 96% y el 81%, respectivamente.

25

Tabla 9: Evaluación de sondas adicionales (conjunto de sondas 3) para mejorar la sensibilidad de la detección del cáncer endometrial con respecto a la obtenida con MYC, CEP 18, 1q25 y 20q13.

30

Abreviaturas de la tabla: N = Normal; SH = Hiperplasia simple; CH = Hiperplasia compleja; EG1 = Endometrioide Grado 1; EG2 = Endometrioide Grado 2; EG3 = Endometrioide Grado 3; Carcinosarcoma/MMMT = C/M; S = Seroso; POS = Número de células con patrones de señales anómalas identificadas que alcanzan o exceden el umbral para la sonda; NEG = Número de células con patrones de señales anómalas identificadas inferiores al umbral para la sonda

35

ID#	Tipo	yMYC	CEP18	1q25	20q13.2	FGFR1	FGFR1	DCC/	PTEN	/PTEN	CEP10	FGFR1	%
	Grado	% Gan	% Gan	% Gan	% Gan	% Gan	% Gan	Pérd.	%Pérd.	%Pérd.	%Pérd.	Pérd.Gan	%
		>4	>4	>6	>4%	>4	>2	>16	>12	>18	>10	>10	>10
101	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
102	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
103	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
104	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
105	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
106	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
107	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
108	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
109	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
110	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
86	SH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG
88	SH	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
96	SH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
97	SH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
100	SH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
85	CH	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
87	CH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
89	CH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
90	CH	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
91	CH	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
93	CH	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

ID#	Tipo	yMYC	CEP18	1q25	20q13.2	FGFR1	FGFR1	DCC/	PTEN	/PTEN	CEP10	FGFR1	%
	Grado	% Gan	% Gan	% Gan	% Gan	% Gan	% Gan	GanCEP18	%CEP10	% Pérd.	% Pérd.	% Pérd.	% O
		>4	>4	>6	>4	>2		Pérd. >16	Pérd. >12	>18	>10	Pérd. >10	
2	EG1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	
3	EG1	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
4	EG1	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
5	EG1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
14	EG1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
15	EG1	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	
16	EG1	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	
18	EG1	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	
56	EG1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	
57	EG1	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	
58	EG1	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
59	EG1	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	
61	EG1	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	
63	EG1	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
65	EG1	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	
7	EG2	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
8	EG2	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
33	EG2	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	
34	EG2	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	
35	EG2	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
36	EG2	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
37	EG2	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	
66	EG2	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	
67	EG2	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
70	EG2	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	
9	EG3	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	
42	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	
43	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	
44	EG3	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
45	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
47	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	
75	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
76	EG3	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	
77	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
83	EG3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	
11	C/M	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	
12	C/M	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	
78	C/M	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
	Células												
54	Células	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
	claras												
81	Células.	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
1	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	
6	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
10	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
49	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
50	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
51	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
79	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
80	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
94	S	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	

Los análisis de las demás sondas para aumentar la sensibilidad de MYC, 1q25 y CEP18 se muestran en la **Tabla 10**. La adición de DCC, CEP10, PTEN, o FGFR1 aumenta la sensibilidad del conjunto de sondas combinadas hasta el 94-98%. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad se consiguió a costa de reducir la especificidad (76-81%).

5

Tabla 10: Análisis de añadir DCC, CEP 10, PTEN o FGFR1 a un conjunto de sondas de MYC, 1q25 y CEP18 para aumentar la sensibilidad de la detección del cáncer endometrial

	Ganancias			Pérdidas	Sensibilidad	Especificidad
	Sonda 1	Sonda 2	Sonda 3	Sonda 4		
Corte	MYC >4	1q25 >6	CEP18 >4	DCC/CEP18 >16	98%	76%
Corte	MYC >4	1q25 >6	CEP18 >4	CEP10 >10	98%	81%
Corte	MYC >4	1q25 >6	CEP18 >4	PTEN >18	96%	81%
Corte	MYC >4	1q25 >6	CEP18 >4	FGFR1 >10 (ganancias y pérdidas)	94%	81%

- 5 Se realizaron otros análisis para determinar el conjunto de sondas óptimo con cortes para conseguir una especificidad muy elevada para el carcinoma endometrial. Los resultados de este análisis se pueden consultar en la **Tabla 11**. Numerosas combinaciones de sondas y anomalías lograron una especificidad de al menos el 95%. Las que produjeron la sensibilidad más elevada con una especificidad superior al 95% se subrayan en amarillo en la parte superior de la Tabla 11. Todas estas combinaciones incluían la evaluación de pérdida de locus o una combinación de pérdidas y ganancias (deseq.). El conjunto de sondas que generó mejores resultados y que solo evaluó las ganancias presentaba una sensibilidad del 84% y una especificidad del 95%, e incluía FGFR1, 1q25, CEP 18 y 20q13 con cortes de 8%, 8%, 8% y 8%, respectivamente (resaltado en azul). Otros dos conjuntos de sondas que contenían 1q25, MYC, CEP18 y FGFR1 o 20q13 con cortes de 12%, 12%, 12%, y 12%, respectivamente, consiguieron una sensibilidad del 80% y una especificidad del 95% (resaltado en verde).
- 10
- 15 El conjunto de sondas más atractivo incluía cuatro sondas LSI de 1q25, MYC, FGFR1 y 20q13 utilizando cortes similares y tenía una sensibilidad y especificidad del 80% y 95%, respectivamente (resaltado en rojo). Este conjunto de sondas resulta ideal porque tiene un rendimiento prácticamente igual que los demás conjuntos de sondas, aunque solo analiza las ganancias cromosómicas de las muestras. Las ganancias cromosómicas resultan más fáciles de identificar para los técnicos y probablemente permitirían una mayor reproducibilidad entre observadores que si se evalúan las pérdidas cromosómicas.
- 20

Tabla 11: Análisis de diferentes sondas y cortes para conseguir una especificidad >95% para la detección del cáncer endometrial

SONDA 1	SONDA 2		SONDA 3		SONDA 4								
Sonda	Abn	Cut off	Sonda	Abn	Cut off	Sonda	Abn	Cut off	Sonda	Abn	Cut off	SENS	ESPEC
PTEN/CEP1	loss	12	FGFR1	imbal	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	0,857	0,952
FGFR1	imbal	12	FGFR1	loss	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	0,857	0,952
FGFR1	imbal	12	FGFR1	gain	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	0,857	0,952
FGFR1	imbal	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	CEP18	gain	12	0,857	0,952
FGFR1	gain	8	1q25	gain	8	CEP18	gain	8	2Qq13.2	gain	8	0,837	0,952
PTEN/CEP10	loss	12	FGFR1	loss	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	0,816	0,952
PTEN/CEP10	loss	12	FGFR1	imbal	12	1q25	gain	12	CEP18	gain	12	0,816	0,952
FGFR1	loss	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	CEP18	gain	12	0,816	0,952
PTEN/CEP10	loss	12	FGFR1	gain	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	0,796	0,952
FGFR1	gain	28	CEP 10	imbal	28	1q25	gain	28	MYC	gain	28	0,796	0,952
PTEN/CEP10	loss	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	CEP18	gain	12	0,796	0,952
FGFR1	gain	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	CEP18	gain	12	0,796	0,952
PTEN/CEP10	loss	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	20q13.2	gain	12	0,796	0,952
FGFR1	gain	12	1q25	gain	12	MYC	gain	12	20q13.2	gain	12	0,796	0,952
1q25	gain	12	MYC	gain	12	CEP18	gain	12	20q13.2	gain	12	0,796	0,952

- 25 **Abreviaturas:** Probe = locus de interés; Abn = tipo de anomalía; loss = evalúa solo la pérdida de locus; gain = evalúa solo la ganancia de locus; imbal = evalúa ganancias o pérdidas; cutoff = % de células con anomalía para considerar una muestra como positiva.

30 **ADJUNTO 1. Lista de clones del array de GeneSensor™ 300**

	Ubic. citol., enlace locus	Utilidad
1	CEB108/T7	1p tel
		Sub Tel

ES 2 621 812 T3

		Ubic. citol., enlace locus	Utilidad
2	1PTEL06	1p tel	Sub Tel
3	CDC2L1 (p58)	1 p36	u DEL
4	PRKCZ	1 p36.33	u DEL
5	TP73	1 p36.33	u DEL/LOH
6	D1S2660	1 p36.32	u DEL/LOH
7	D1S214	1 P36.31	u DEL/ LOH
8	D1S1635	1 p36.22	LOH
9	D1S199	1 P36.13	LOH
10	FGR(SRC2)	1p36.2- P36.1	AMP(1)
11	MYCL1 (LMYC)	1 p34.3	AMP(1)
12	D1S427,FAF1	1 p32.3	LOH
13	D1S500	1 p31.1	LOH
14	D1S418	1 p13.1	LOH
15	NR AS	1 p13.2	AMP(1)
16	D1S2465,D1 S3402	1 p12	
17	WI-5663,WI-13414	1q21	
18	LAMC2	1q25-q31	AMP(1)
19	PTGS2(COX2)	1q31.1	
20	TGFB2	1q41	
21	AKT3	1q44	AMP
22	SHGC-18290	1q tel	Sub Tel
23	1QTEL10	1q tel	Sub Tel
24	U32389	2p tel	Sub Tel
25	2PTEL27	2p tel	Sub Tel
26	MYCN(N-myc)	2p24.1	AMP(1)
27	MSH2,KCNK12	2p22.3-2p22.1	LOH
28	REL	2p13-p12	AMP(1)
29	GNLY	2p12-q11	M
30	SGC34236	2q13	M
31	BIN1	2q14	pTSG
32	LRP1B	2q21.2	pTSG
33	TBR1	2q23-q37	M
34	ITGA4	2q31-q32	M
35	CASP8	2q33-q34	LOH
36	ERBB4(HER-4)	2q33.3-q34	HER-2 homol
37	WI-6310	2q tel	Sub Tel
38	D2S447	2q tel	Sub Tel
39	3PTEL25	3p tel	Sub Tel
40	3PTEL01 ,CHL1	3p tel	Sub Tel
41	VHL	3p25-p26	TSG
42	RAF1	3p25	AMP(1)
43	THRB	3p24.3	LOH
44	MLH1	3p21,3-p23	Del
45	RASSF1	3p21.3	pTSG
46	FHIT	3p14.2	pTSG
47	P44S10	3p14.1	
48	D3S1274, R0B01	3p12-3p13	LOH
49	RBP1, RBP2	3q21-q22	
50	TERC	3q26	AMP(1)
51	EIP5A2	3a26.2	
52	PIK3CA	3Q26.3	AMP(1)
53	TP63	3q27q29	TSG
54	MF12	3q tel	Sub Tel
56	3QTEL05	3a tel	Sub Tel
56	GS10K207	4p tel	Sub Tel
57	SH004-20 7	4p tel	Sub Tel
56	D4S114	4pi6 3	U DEL
59	WHSC1	4pi6 3	u DEL
60	DDX15	4p15.3	M
61	KIT	4q11-q12	ONC
62	POGFRA	4q11-q13	AMP(1)
63	EIF4E	4q24 (by UCSC)	AMP

ES 2 621 812 T3

		Ubic. citol., enlace locus	Utilidad
64	PGRVIC2	4q26	
55	PDZ-GEF1	4a32.1	M
66	4QTEL11	4q tel	Sub Tel
67	D4S2930	4q tel	Sub Tel
68	C84C11/T3	5p tel	Sub Tel
69	D5S23	5p152	U DEL
70	D5S2064	5p152	U DEL
71	DAB2	5p13	pTSG
72	DHFR,MSH3	5q11.2- q13.2	awn,loss Ca
73	APC	5q21-q22	Del
74	EGR1	5q31.1	Del
75	CSF1R	5q33-q35	Del
76	NIB1408	5q tel	Sub Tel
77	5QTEL70	5q tel	Sub Tel
78	6PTEL48	6p tel	Sub Tel
79	PIM1	6p21.2	M
80	CCND3	6P21	AMP
81	D6S414	6p12.1- p21.1	
82	HTR1B	6q13	M
83	D6S434	6q16.3	Del
84	D6S268	6q16.3-q21	LOM
85	MYB	6q22-q23	AMP(1)
86	D6S311	6q23-24	LOH
87	ESR1	6q25.1	AMP (1)
88	6QTEL54	6q tel	Sub Tel
89	G31341	7p tel	Sub Tel
90	IL6	7p21	M
91	EGFR	7p12.3- p12.1	AMP(1)
92	ELN	7q11.23	u DEL
93	RFC2.CYLN2	7q11.23	u DEL
94	ABCB1(MDR1)	7q21.1	AMP(1)
95	CDK6	7q21-q22	AMP
96	SERPINE1	7q21.3-q22	pTSG
97	MET	7q31	AMP(1)
98	TIF1	7q32-q34	M
99	stSG48460	7q tel	Sub Tel
100	7QTEL20	7q tel	Sub Tel
101	D8S504	8p tel	Sub Tel
102	D8S596	8p tel	Sub Tel
103	CTSB	8p22	AMP(1)
104	PDGRL	8p22-p21.3	Del
105	LPL	8p22	Del
106	FGFR1	8p11.2- P11.1	AMP(1)
107	MOS	8q11	AMP(1)
108	E2F5	8p22-q21.3	M
109	EXT1	8q24.11- q24.13	TSG, uDel
110	MYC	8q24.12- q24.13	AMP(1)
111	PTK2	8q24-qter	AMP
112	SHGC-31110	8q tel	Sub Tel
113	U11829	8q tel	Sub Tel
114	AF170276	9p tel	Sub Tel
115	D9S913	9ptel	Sub Tel
116	MTAP	9p21.3	LOH
117	CDKN2A(p16),MTAP	9p21	TSG
118	AFM137XA11	9p11.2	M
119	D9S166	9p12-q21	
120	PTCH	9q22.3	TSG
121	DBCCR1	9q33.2	TSG
122	TSC1	9q34	TSG
123	ABL1	9q34.1	AMP(1)
124	H18962	9q tel	Sub Tel
125	D9S325	9q tel	Sub Tel

ES 2 621 812 T3

		Ubic. citol., enlace locus	Utilidad
126	10PTEL006	10p tel	Sub Tel
127	SHGC-44253	10p tel	Sub Tel
128	D10S249,D10S533	10p15	TSG
129	GAT A3	10p15	
130	WI-2389,D10S1260	10p14-p13	u DEL
131	BMI1	10p13	gain
132	D10S167	10p11-10q11	Near Cen
133	EGR2	10q21.3	M
134	PTEN	10q23.3	TSG
135	FGFR2	10q26	AMP(1)
136	DMBT1	10q25.3-q26.1	
137	stSG27915	10q tel	Sub Tel
138	10QTEL24	10q tel	Sub Tel
139	11 PTEL03	11p tel	Sub Tel
140	INS	11 p tel	Sub Tel
141	HR AS	11 p15.5	AMP(1)
142	CDKN1 C(p57)	11 p15.5	TSG
143	WT1	11 p13	TSG
144	KAI1	11 p11.2	
145	D11S461	11 q12.2	Near Cen
146	MEN1	11 q13	
147	CCND1	11 q13	AMP(1)
148	FGF4,FGF3	11 q13	AMP(1)
149	EMS1	11 q13	AMP(1)
150	GARP	11q13.5-q14	AMP(1)
151	PAK1	11 q13-q14	AMP(1)
152	RDX	11q22.3	LOH
153	ATM	11q22.3	LOH
154	MLL	11q23	AMP(1)
155	WI-6509	11q tel	Sub Tel
156	AF240622	11q tel	Sub Tel
157	8M16/SP6	12p tel	Sub Tel
158	SHGC-5557	12p tel	Sub Tel
159	CCND2	12p13	AMP(1)
160	CDKN1 B(p27)	12p13.1 -p12	TSG
161	KRAS2	12p11.2	AMP(1)
162	WNT1(INT1)	12q 12-q 13	AMP(1)
163	CDK2,ERBB3	12q 13	AMP
164	GLI	12q13.2-q13.3	AMP(1)
165	SAS,CDK4	12q 13-q 14	AMP(1)
166	MDM2	12q14.3-q15	AMP(1)
167	DRIM,ARL1	12q23	
168	stSG8935	12q tel	Sub Tel
169	U11838	12q tel	Sub Tel
170	BRCA2	13q12-q13	TSG
171	RB1	13q 14	TSG
172	D13S319	13q14.2	LOH
173	D13S25	13q14.3	LOH
174	D13S327	13q tel	Sub Tel
175	PNN(DRS)	14q 13	
176	TCL1A	14q32.1	gain/loss
177	AKT1	14q32.32	AMP(1)
178	IGH(D14S308)	14q tel	Sub Tel
179	IGH(SHGC-36156)	14q tel	Sub Tel
180	D15S11	15q11-q13	u DEL
181	SNRPN	15q12	u DEL
182	UBE3A,D15S10	15q11-q13	u DEL
183	GABRB3	15q 11.2-q12	u DEL
184	MAP2K5	15q23	
185	FES	15q26.1	AMP(1)
186	IGF1R	15q25-q26	AMP(1)
187	PACE4C	15q tel	Sub Tel

ES 2 621 812 T3

		Ubic. citol., enlace locus	Utilidad
188	WI-5214	15q tel	Sub Tel
189	16PTEL03	16p tel	Sub Tel
190	stSG48414	16p tel	Sub Tel
191	CREBBP	16p13.3	u DEL
192	EMP2	16p13.3	
193	ABCC1(MRP1)	16p13.1	AMP(1)
194	CYLD	16q12-q13	TSG
195	CDH1	16q22.1	LOH
196	FRA16D	16q23.2	
197	CDH13	16q24.2-q24.3	LOH
198	LZ16	16q24.2	Del
199	FANCA	16q24.3	
200	stSG30213	16q tel	Sub Tel
201	16QTEL013	16q tel	Sub Tel
202	282M15/SP6	17p tel	Sub Tel
203	WI-14673	17p tel	Sub Tel
204	HIC1	17p13.3	LOH
205	D17S379,MNT	17p13.3	u DEL/ LOH
206	PAFAH1 B1 (LIS1)	17p13.3	u DEL
207	TP53(p53)	17p13.1	TSG
208	D17S125,D17S61	17p12-p11.2	u Del/u Dup
209	D17S1296,D17S1523	17p12-p11.2	u Del/u Dup
210	LLGL1	17p12- 17p11.2	u DEL
211	FLI, TOP3A	17p12- 17p11.2	u DEL
212	NF1 5'	17q11.2	
213	NF1 3'	17q11.2	
214	BRCA1	17q21	TSG
215	PPARBP(PBP)	17q12	AMP
216	ERBB2(HER-2)	17q11.2- 17q 12	AMP(1)
217	THRA	17q11.2	AMP
218	TOP2A	17q21-q22	AMP
219	NME1 (NME23)	17q21.3	LOH?
220	RPS6KB1 (STK14A)	17q23	AMP(1)
221	D17S1670	17q23	
222	TK1	17q23.2-q25.3	AMP?
223	SHGC-103396	17q tel	Sub Tel
224	AFM217YD10	17q tel	Sub Tel
225	D18S552	18p tel	Sub Tel
226	SHGC17327	18p tel	Sub Tel
227	YES1	18p11.31- pi 1.21	AMP(1)
228	TYMS(TS)	18p11.32	AMP
229	LAM A3	18q11.2	
230	FRA18A(D18S978)	18q12.3	
231	DCC	18q21.3	Del
232	MADH4(DPC4)	18q21.1	TSG
233	BCL2 3'	18q21.3	AMP
234	CTDP1 ,SHGC- 145820	18q tel	Sub Tel
235	18QTEL11	18q tel	Sub Tel
236	129F16/SP6	19p tel	Sub Tel
237	stSG42796	19p tel	Sub Tel
238	INSR	19p13.2	AMP(1)
239	JUNB	19p13.2	AMP(1)
240	CCNE1	19q12	AMP(1)
241	AKT2	19q13.1 - q13.2	LOH
242	GLTSCR2,SULT2A1	19q13.32	
243	D19S238E	19q tel	Sub Tel
244	20PTEL18	20p tel	Sub Tel
245	SOX22	20p tel	Sub Tel
246	JAG1	20p12.1 - p11.23	uDel
247	MKKS, SHGC-79896	20p12.1 - p11.23	uDel
248	TOP1	20q12-q13.1	AMP(1)

ES 2 621 812 T3

		Ubic. citol., enlace locus	Utilidad
249	NCOA3(AIB1)	20q12	AMP(1)
250	MYBL2	20q13.1	AMP(1)
251	CSE1 L(CAS)	20q13	AMP(1)
252	PTPN1	20q13.1 - q13.2	AMP(1)
253	STK6(STK15)	20q13.2- q13.3	AMP(1)
254	ZNF217(ZABC1)	20q13.2	AMP(1)
255	CYP24	20q13.2	AMP
256	TNFRSF6B(DCR3)	20q13	AMP
257	TPD52L2,TOM	20q tel	Sub Tel
258	20QTEL14	20q tel	Sub Tel
259	D21S378	21 q11.2	M
260	RUNX1(AML1)	21q22.3	AMP(1)
261	DYRK1A	21q22	gain
262	D21S341 ,D21 S342	21q22.3	gain
263	PCNT2(KEN)	21 q tel	Sub Tel
264	21QTEL08	21 q tel	Sub Tel
265	D22S543	22q11	M
266	G_SCL	22q11.21	u DEL
267	HIRA(TUPLE1)	22q11.21	u DEL
268	TBX1	22q11.2	u DEL
269	BCR	22q 11.23	AMP(1)
270	NF2	22q12.2	TSG
271	PDGFB(SIS)	22q13.1	AMP(1)
272	ARHGAP8	22q13.3	
273	ARSA	22q tel	Sub Tel
274	22QTEL31	22q tel	Sub Tel
275	DXYS129	X/Yp tel	Sub Tel
276	STS 3'	Xp22.3	u DEL
277	STS 5'	Xp22.3	u DEL
278	KAL	Xp22.3	U DEL
279	DMD exon 45-51	Xp21.1	
280	DXS580	Xp11.2	
281	DXS7132	Xq12	
282	AR 3'	Xq11-q12	AMP(1)
283	XIST	Xq13.2	
284	OCRL1	Xq25	
285	EST CDY16C07	X/Yq tel	Sub Tel
286	SRY	Yp11.3	
287	AZFa region	Yq11	

Sub Tel	Secuencia de una única copia cerca del telómero
AMP(1)	Amplicón del cáncer ubicado anteriormente en AmpliOncl Chip
AMP	Amplicón del cáncer no ubicado anteriormente en AmpliOncl Chip
u DEL	Región perdida en síndrome de mmicrodelección
TSG	Gen supresor del tumor
pTSG	Gen supresor del tumor putativo
M	Marcador añadido para reducir vacíos genómicos
gain	Región ganada en el cáncer
u Dup	Micro duplicación
LOH	Región de pérdida de heterozigosidad
Del	Región de delección
Near Cen	Secuencia de una única copia cerca del centrómero

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de carcinoma endometrial en una muestra biológica de un sujeto, donde el método consiste en lo siguiente:
- 5 poner en contacto la muestra con una o más sondas para una o más regiones o subregiones cromosómicas, o combinaciones de estas, seleccionadas del grupo compuesto por: la región centromérica del cromosoma 18, 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 7p, 8p, 8q, 9p, 9q, la región centromérica del cromosoma 10, 10q, 15q, 16q, 17p, 18q, 19p, 20q, y 22q, donde dicha sonda o sondas con las que se pone en contacto la muestra incluyen una sonda para la región centromérica del cromosoma 18;
- 10 incubar la sonda o sondas con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos de su región cromosómica o cromosoma diana para formar un complejo de hibridación estable; y detectar la hibridación de la sonda o sondas, donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 es indicativo de carcinoma endometrial.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en la región centromérica del cromosoma 18 y al menos una ganancia o pérdida o desequilibrio en la región cromosómica a la que se dirigen una o más de las demás sondas es indicativo de carcinoma endometrial.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas que comprende sondas para las subregiones cromosómicas CEP18 y 1q24.
4. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas que comprende sondas para las subregiones cromosómicas CEP18, 1q24, y 8q24 (MYC).
- 25 5. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas que comprende sondas para las subregiones cromosómicas CEP18, 1q24, 8q24 (MYC), 20q13.
6. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas que comprende sondas para las subregiones cromosómicas CEP18, 1q24, 10q26 (FGFR2), 20q13.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas que comprende sondas para las subregiones cromosómicas CEP18, 1q24, PIK3CA, 20q13.
- 35 8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en una o más regiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por: 1q, 2p, 3q, 8q, 10q, y 20q es indicativo de carcinoma endometrial.
9. El método de la reivindicación 8, donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en una o más regiones cromosómicas:
- 40 (i) 1q, 10p, y 10q es indicativo de carcinoma endometriode; y
(ii) 3q, 8q, 18q, y 20q es indicativo de carcinoma no endometriode.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:
- 50 1q25, 18q21, CEP18, 8q24;
18q21, 1q24, 8q24, CEP18;
1q24, 8q24, 10q26, CEP18;
18q21, 1q24, 10q26, CEP18;
1q24, 8q24, CEP18, 3q27-q29;
1q24, 2p24, 10q26, CEP18;
- 55 1q24, 10q26, CEP18, 3q27-q29;
1q24, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
1q24, 2p24, CEP18, 3q27-q29; y
18q21, 1q24, CEP18.
- 60 11. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos cuatro sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:
- 65 1q24, 8q24, CEP18, 20q13;
1q24, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
1q24, CEP18, 20q13, 10q26;
CEP 10, 8q24, CEP18, 1q24;

8q24, 1q24, 20q13, CEP18; 10q26;

donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en una o más de estas subregiones cromosómicas es indicativo de carcinoma endometrial.

5 12. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 10 18q21, 1q25, 8q24, CEP18;
 1q25, 8q24, 10q26, CEP18;
 18q21, 1q25, 10q26, CEP18;
 1q25, 8q24, CEP18, 3q27-q29;
 1q25, 2p24, 10q26, CEP18;
 15 1q25, 10q26, CEP18, 3q27-q29;
 1q25, 10q26, CEP18, 20q13;
 1q25, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
 1q25, 2p24, CEP18, 3q27-q29;
 1q25, 8q24, CEP18;
 20 18q21, 1q25, CEP18; y
 1q25, CEP18.

13. El método de la reivindicación 1, donde la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos cuatro sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas seleccionadas del grupo compuesto por:

- 25 1q25, 8q24, CEP18, 20q13;
 1q25, CEP18, 3q27-q29, 20q13;
 1q25, CEP18, 20q13, 10q26;
 CEP 10, 8q24, CEP18, 1q25;
 30 8q24, 1q25, 20q13, CEP18; 10q26;

donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia en una o más de estas subregiones cromosómicas es indicativo de carcinoma endometrial.

35 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la combinación de sondas comprende entre 2 y 10 sondas o entre 3 y 8 sondas.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la combinación de sondas comprende 4 sondas.

40 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el método se lleva a cabo a través de:

- (i) array de hibridación genómica comparativa (aCGH) con sondas inmovilizadas sobre un sustrato; o
 (ii) hibridación in situ con fluorescencia y cada sonda de la combinación de sondas se etiqueta con un fluoróforo diferente.

45 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde:

- (i) la muestra consiste en una muestra tomada con un raspador endometrial o una muestra de una biopsia endometrial.

50 18. Una combinación de sondas seleccionadas de las combinaciones definidas en cualquiera de las reivindicaciones 3-13, donde la combinación se compone de las sondas enumeradas en cada una de las combinaciones indicadas.

55 19. El uso de una combinación de sondas en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde la combinación de sondas comprende entre 2 y 10 sondas, siendo dicha combinación una combinación de sondas como la que se define en cualquiera de las reivindicaciones 3-12.

60 20. El uso de una combinación de sondas en el método de detectar la presencia de carcinoma endometrial, donde la combinación de sondas comprende entre 2 y 10 sondas, siendo dicha combinación una combinación de sondas como la que se define en cualquiera de las reivindicaciones 3-12.

FIG. 1A	FIG. 1B	FIG. 1C
---------	---------	---------

FIG. 1

FIG. 2A-1	FIG. 2A-2	FIG. 2A-3
-----------	-----------	-----------

FIG. 2A

FIG. 2B-1	FIG. 2B-2	FIG. 2B-3
-----------	-----------	-----------

FIG. 2B

FIG. 4A	FIG. 4B	FIG. 4C
FIG. 4D	FIG. 4E	FIG. 4F
FIG. 4G	FIG. 4H	FIG. 4I

FIG. 4

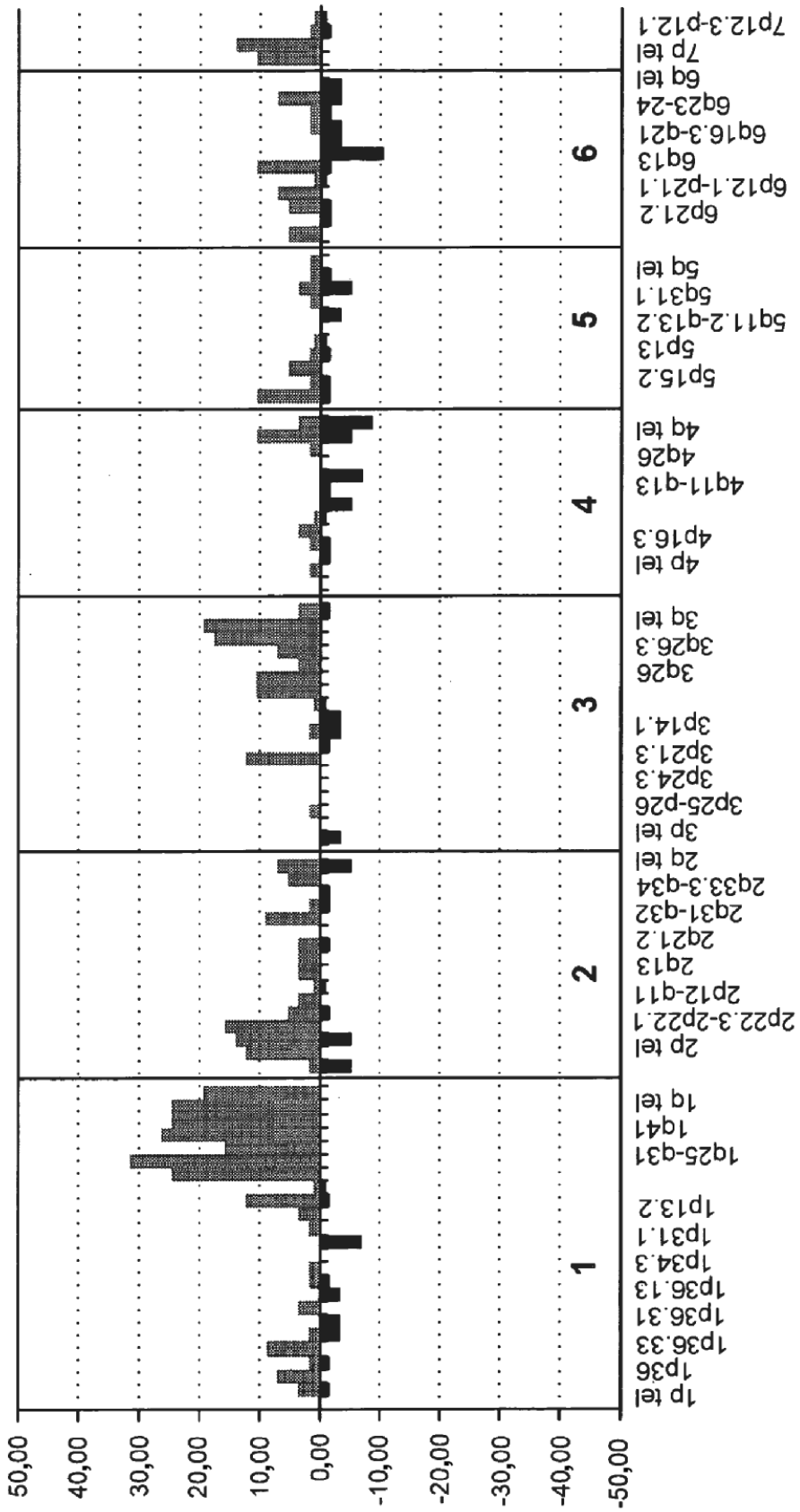


FIG. 1A

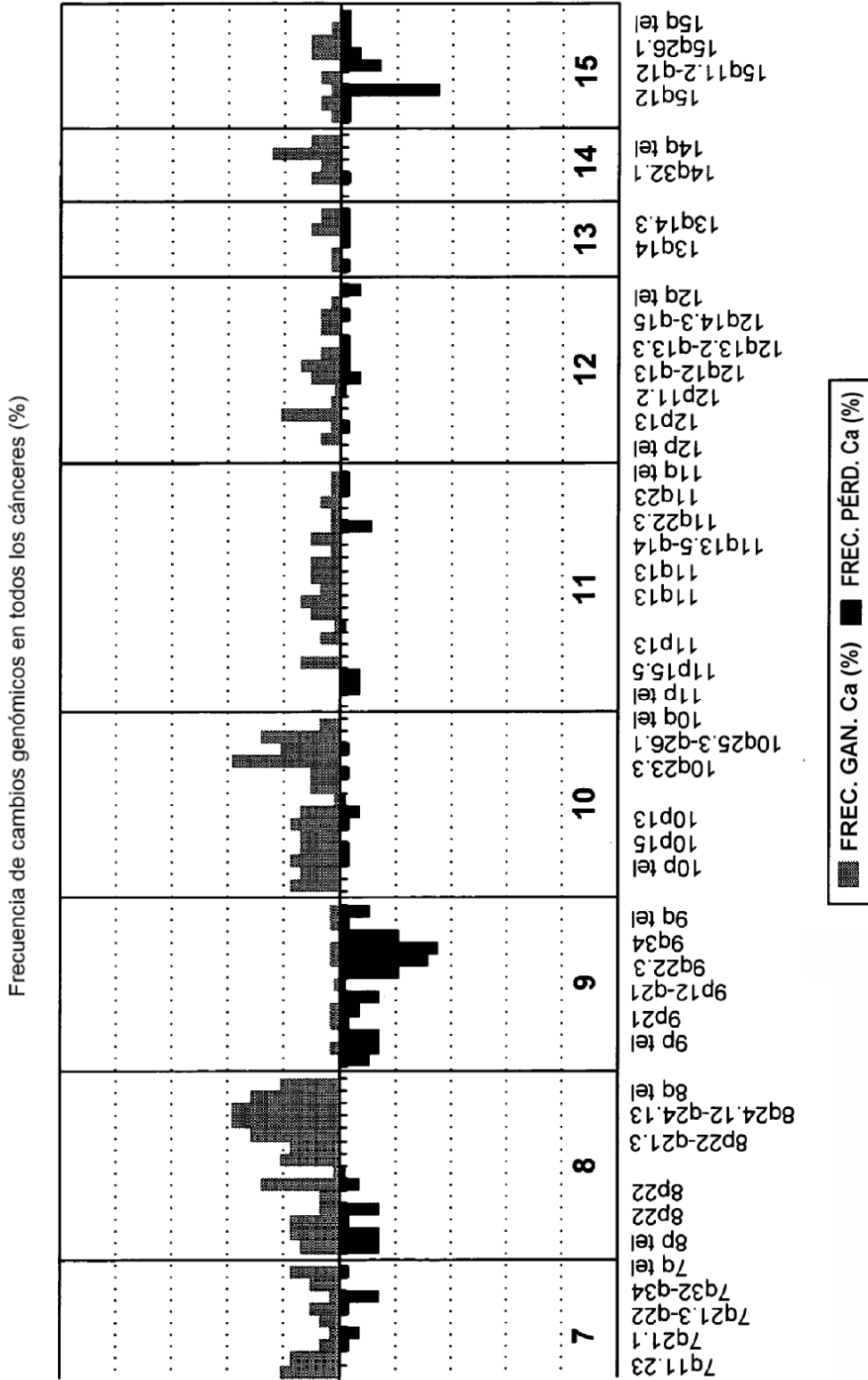


FIG. 1B

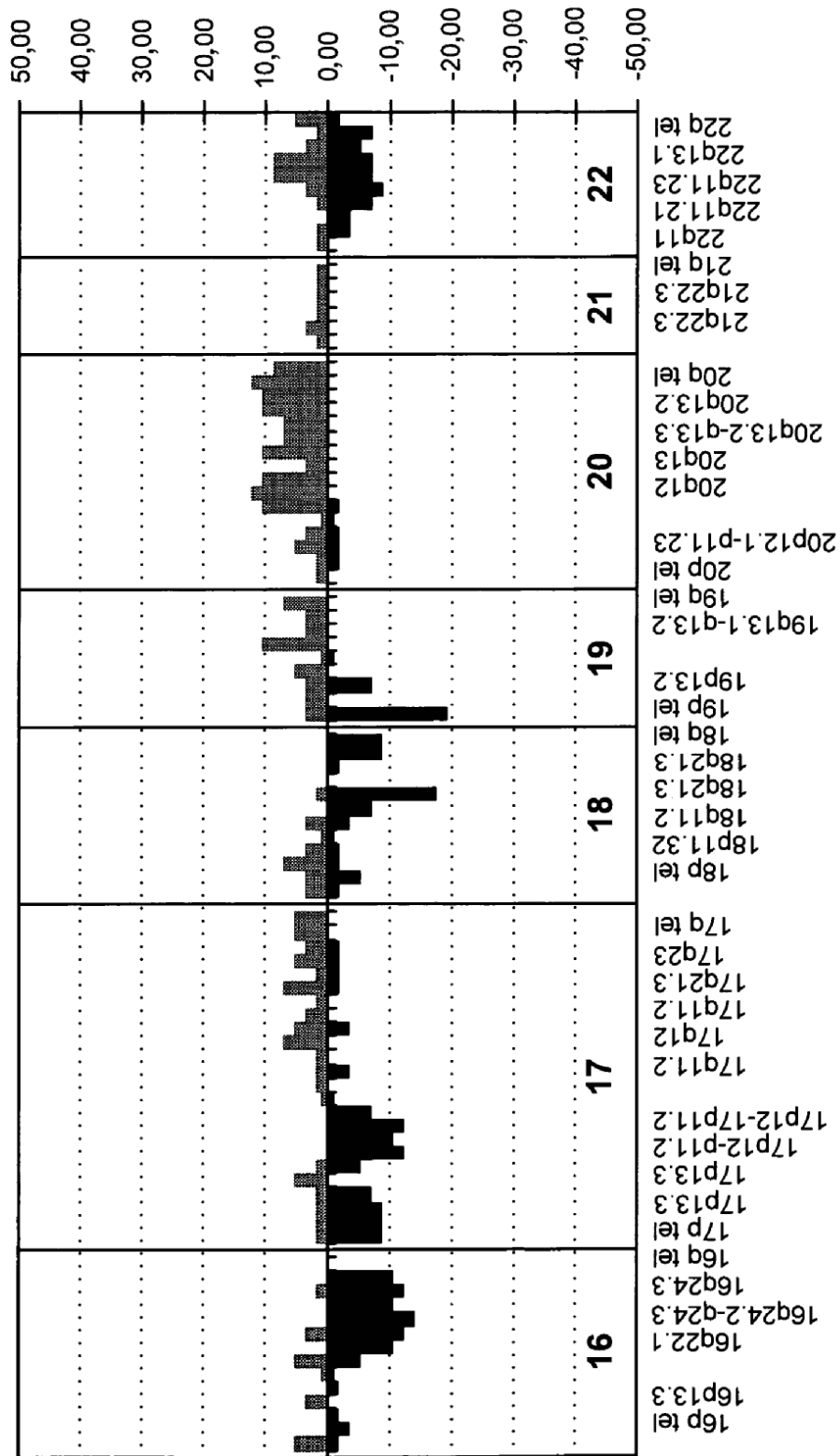


FIG. 1C

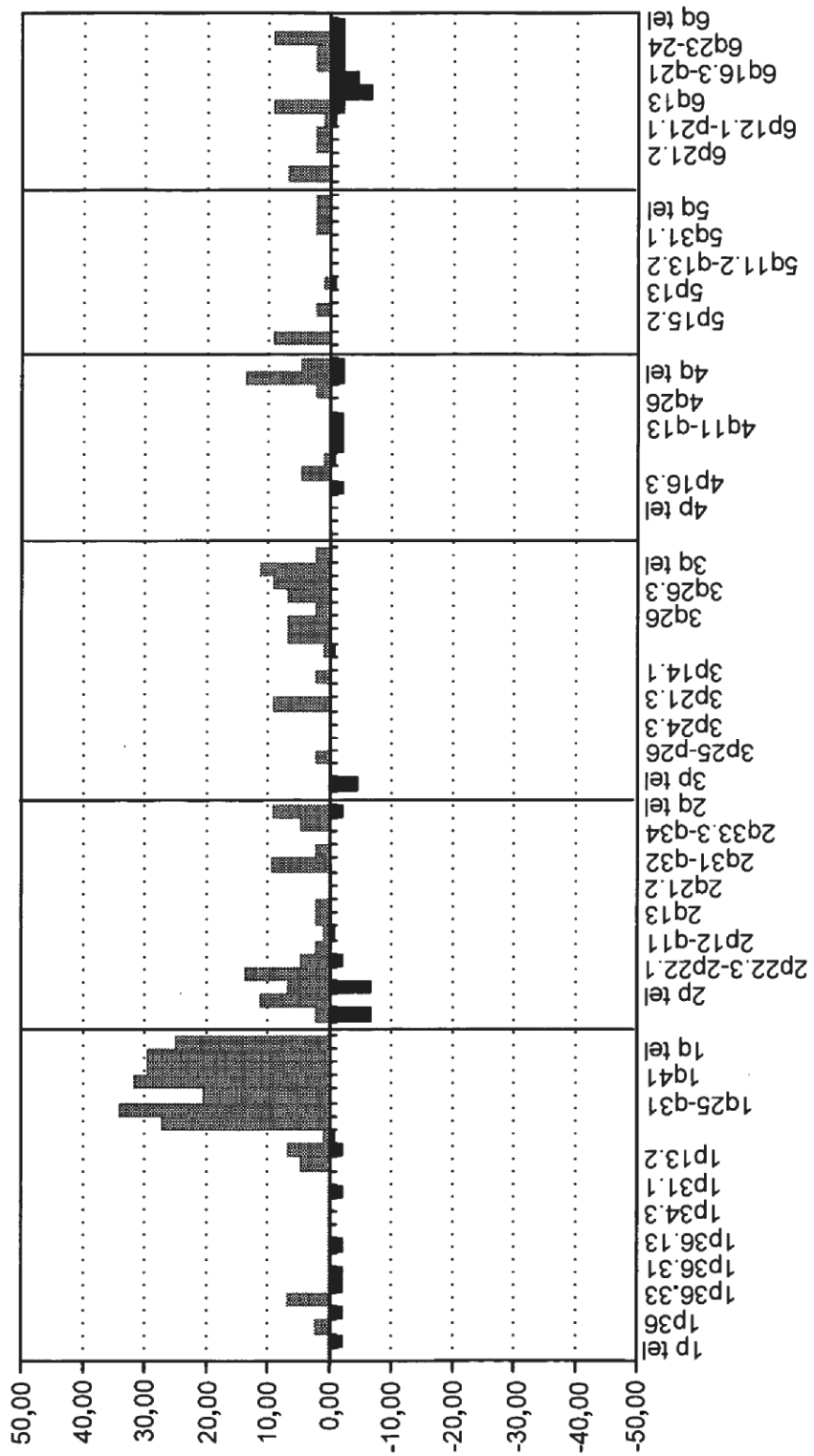


FIG. 2A-1

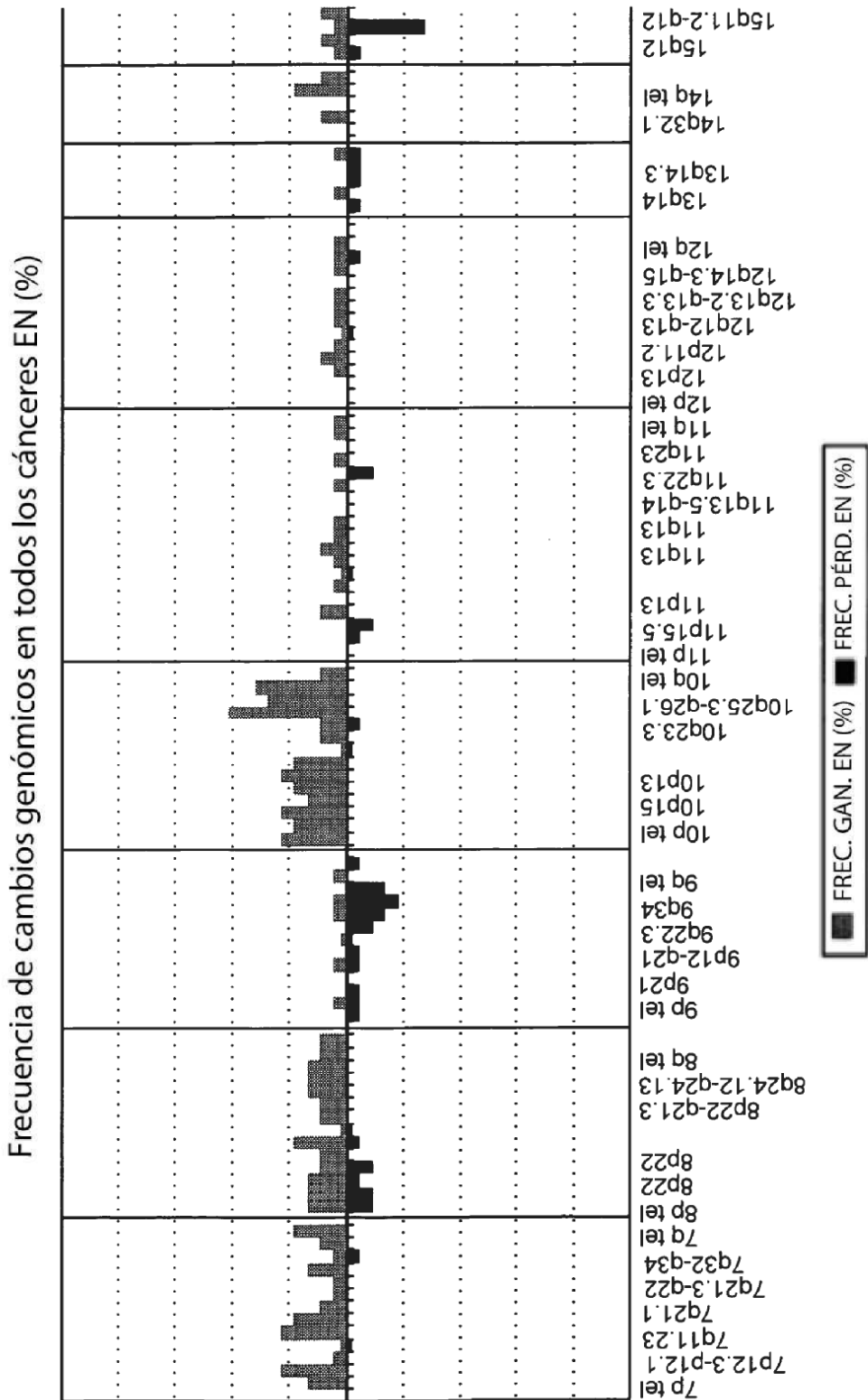


FIG. 2A-2

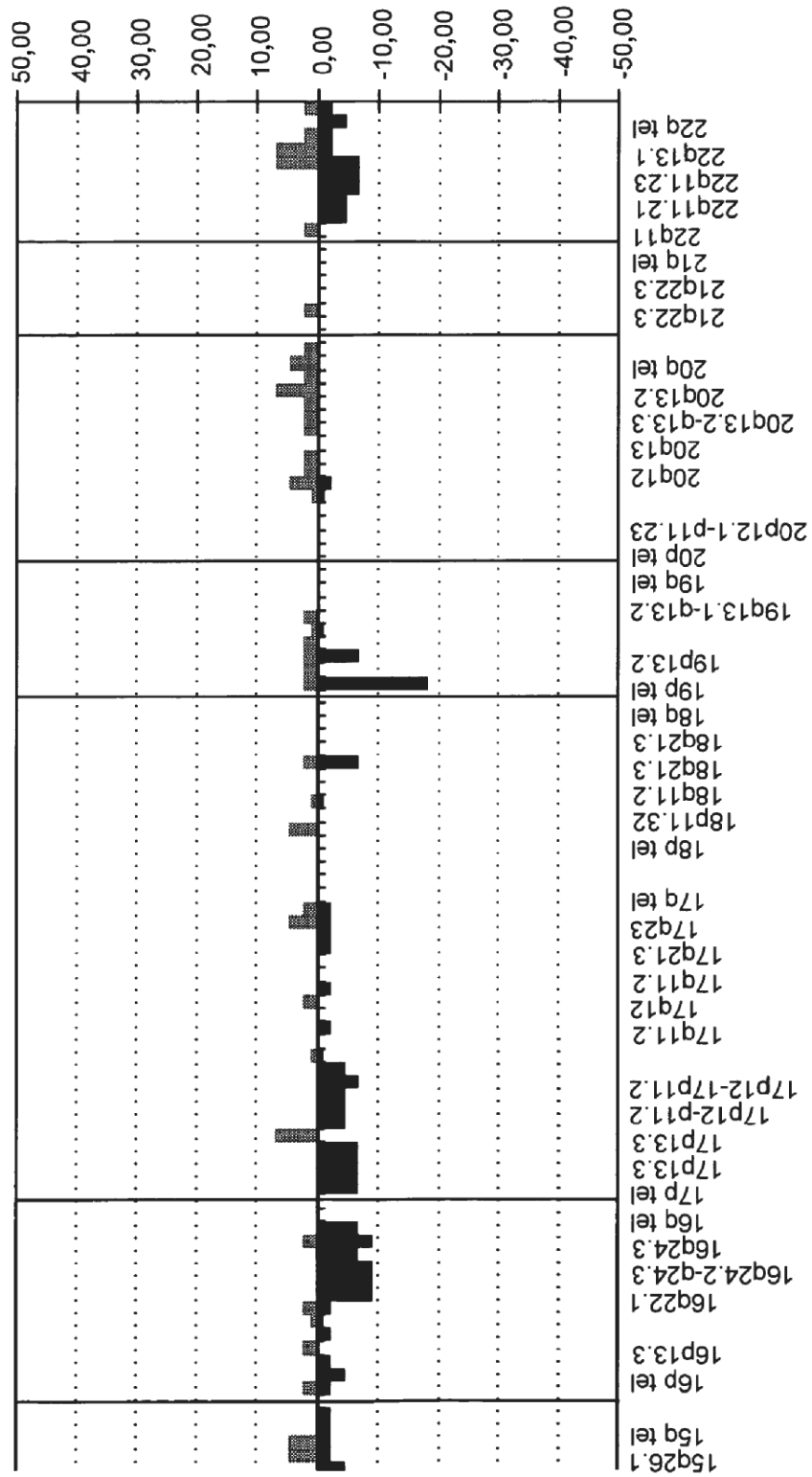


FIG. 2A-3

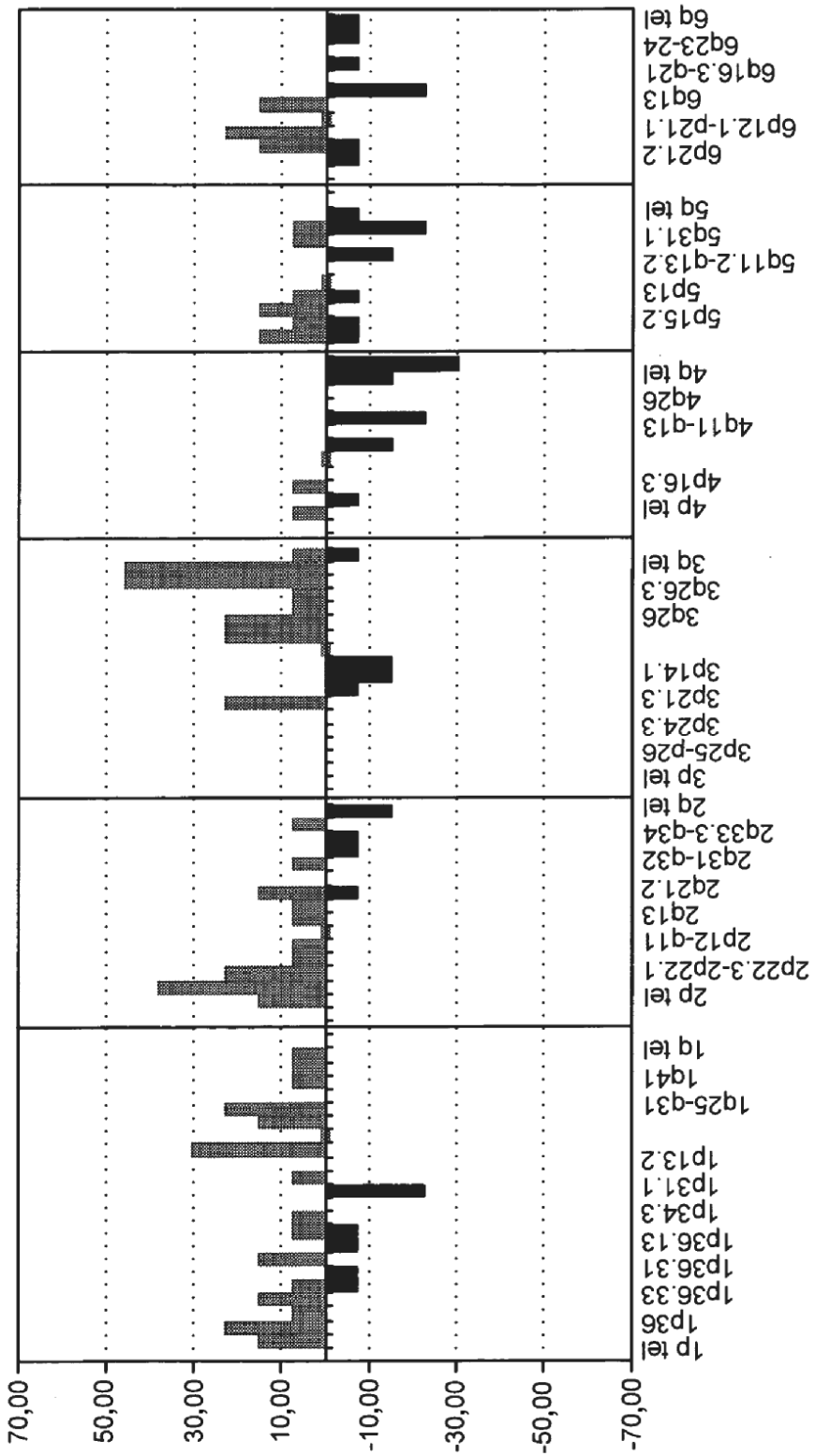


FIG. 2B-1

Frecuencia de cambios genómicos en todos los cánceres NE (%)

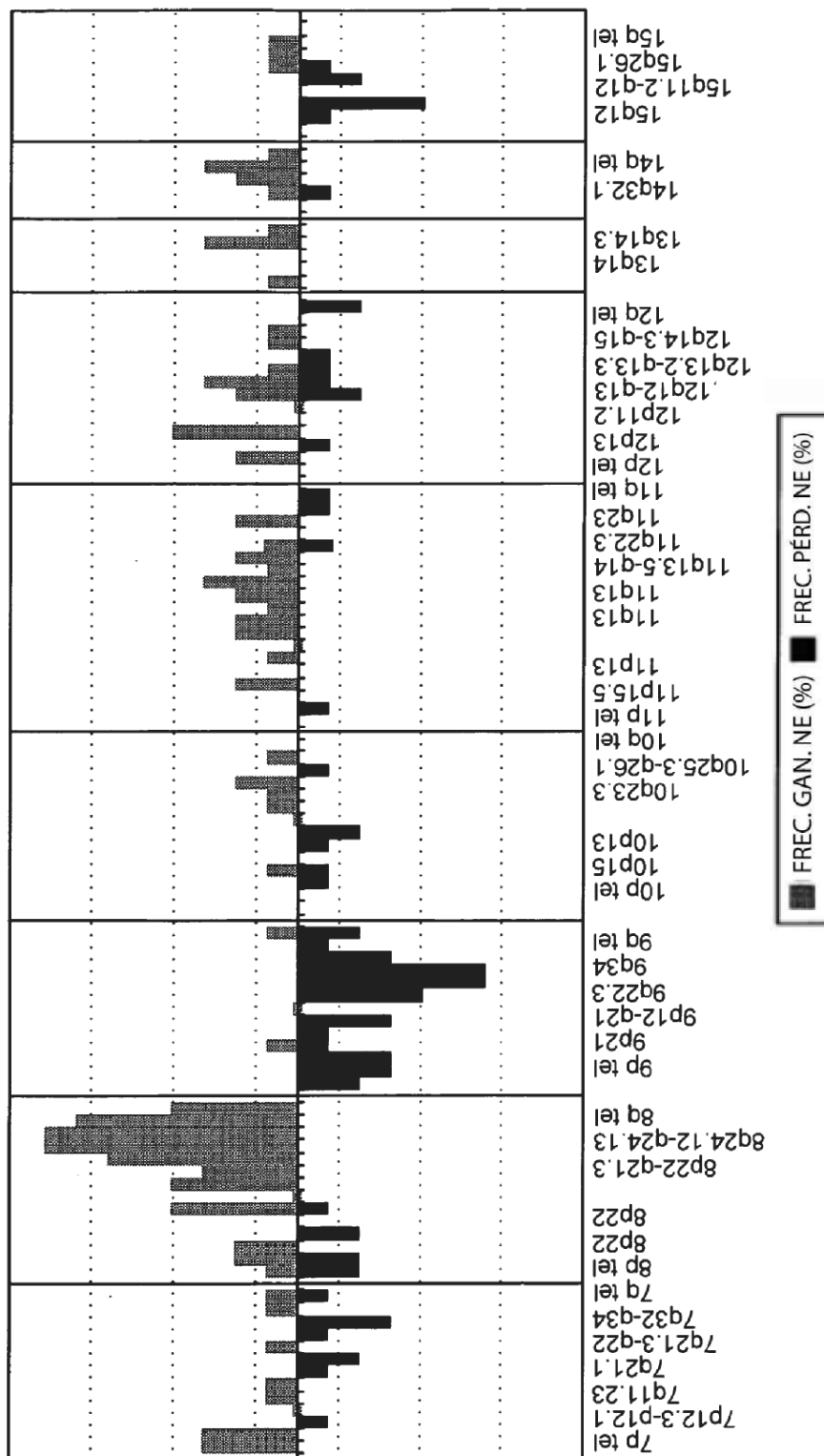


FIG. 2B-2

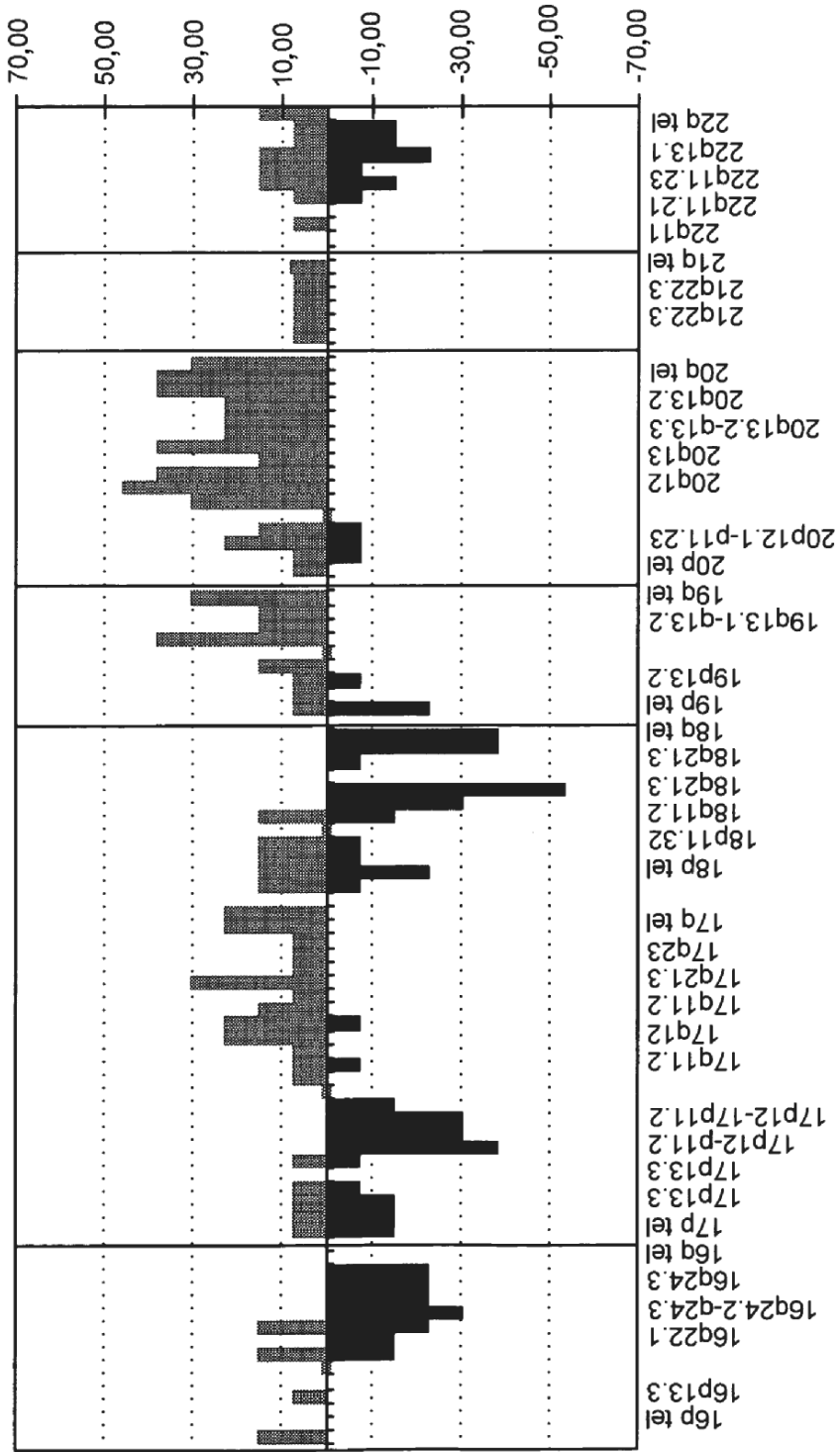
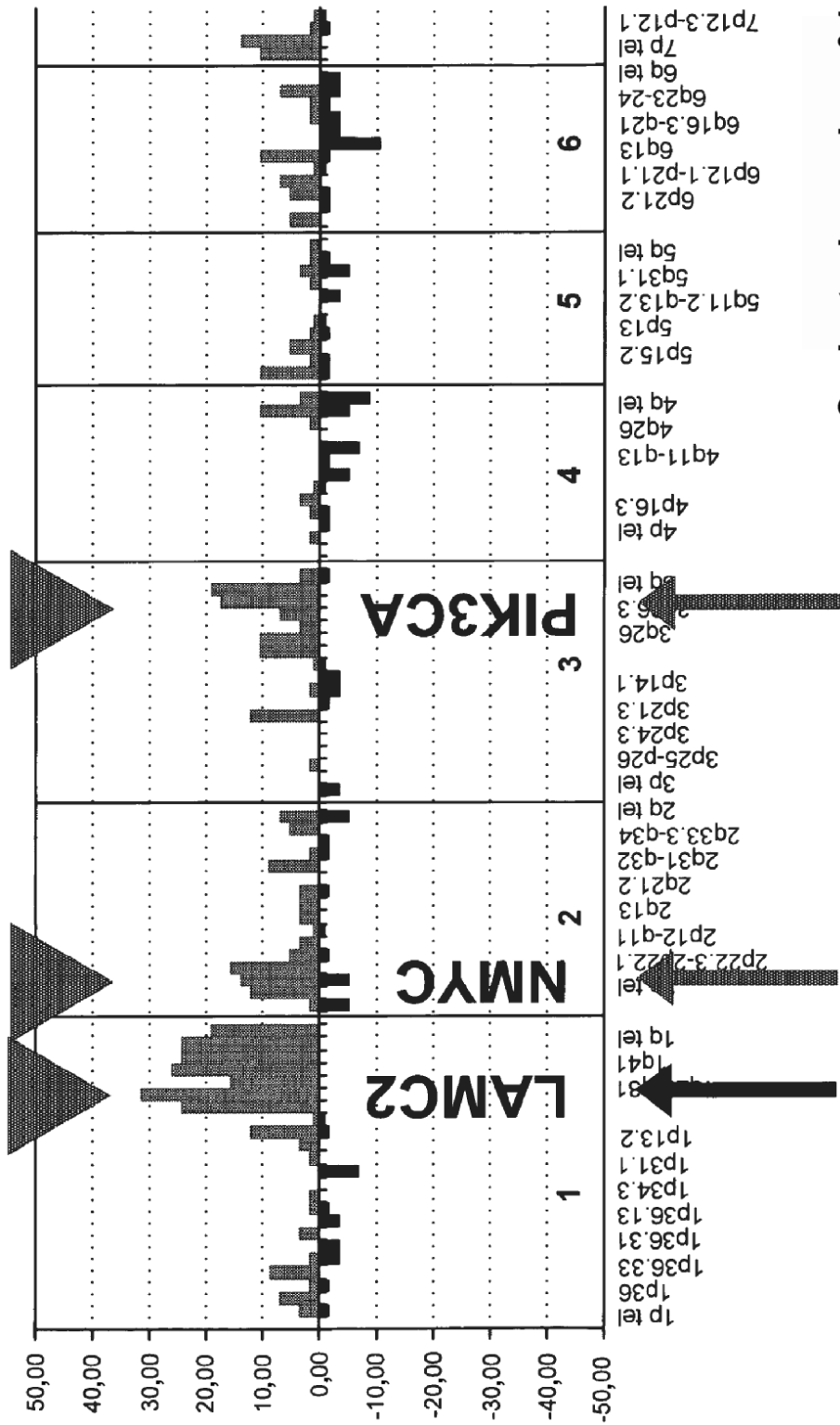
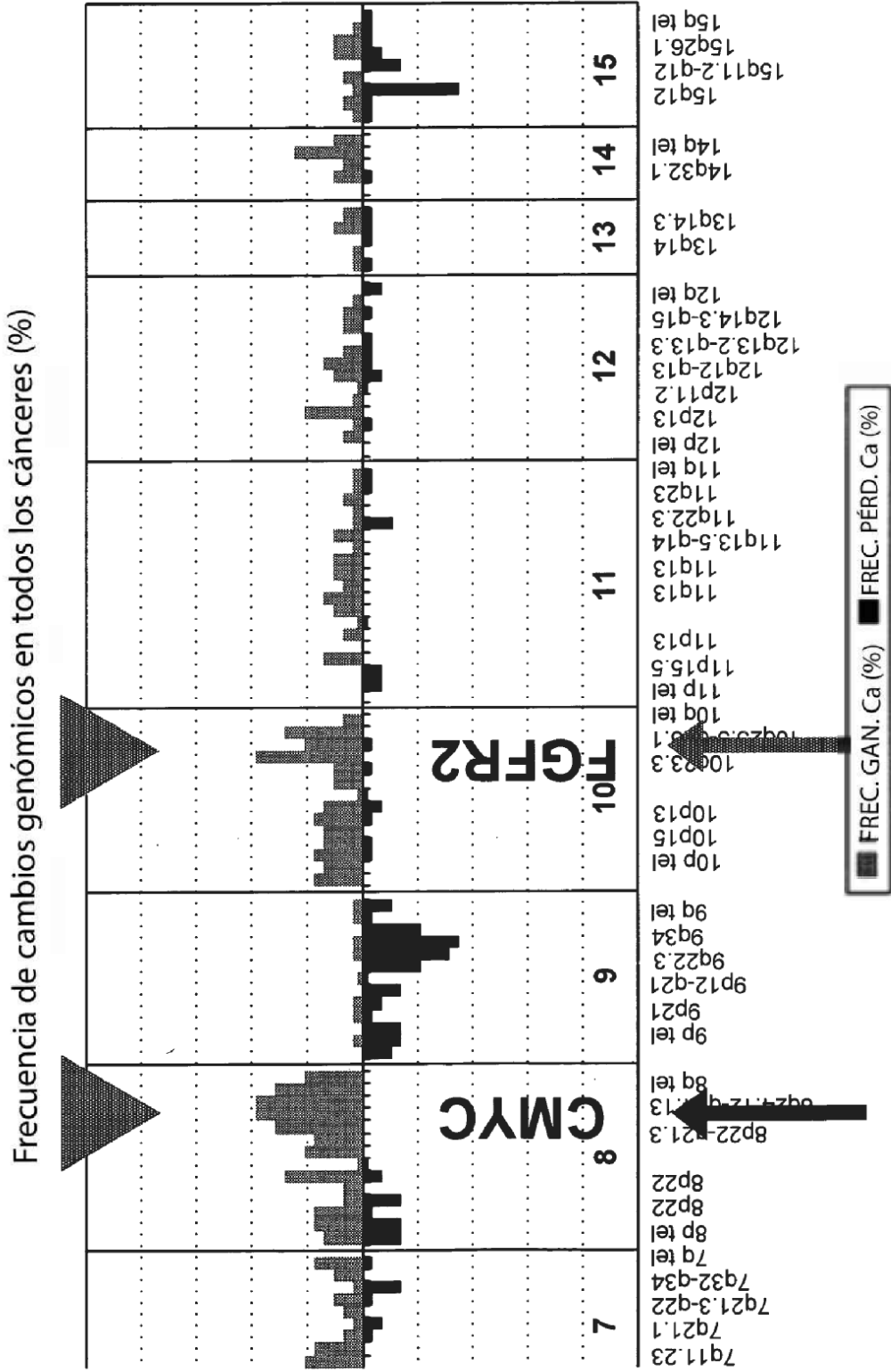


FIG. 2B-3





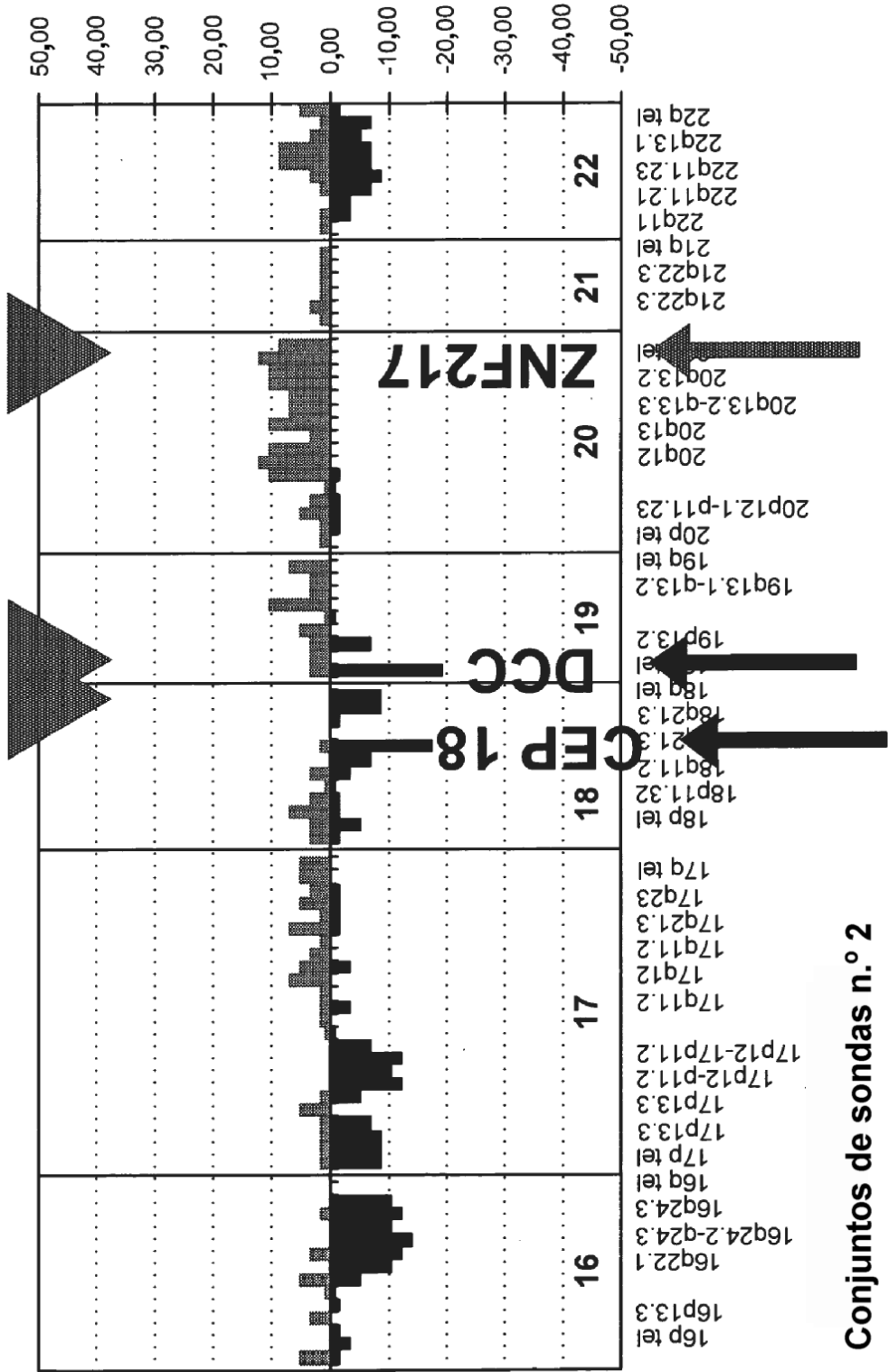


FIG. 4C

Conjuntos de sondas n.º 2

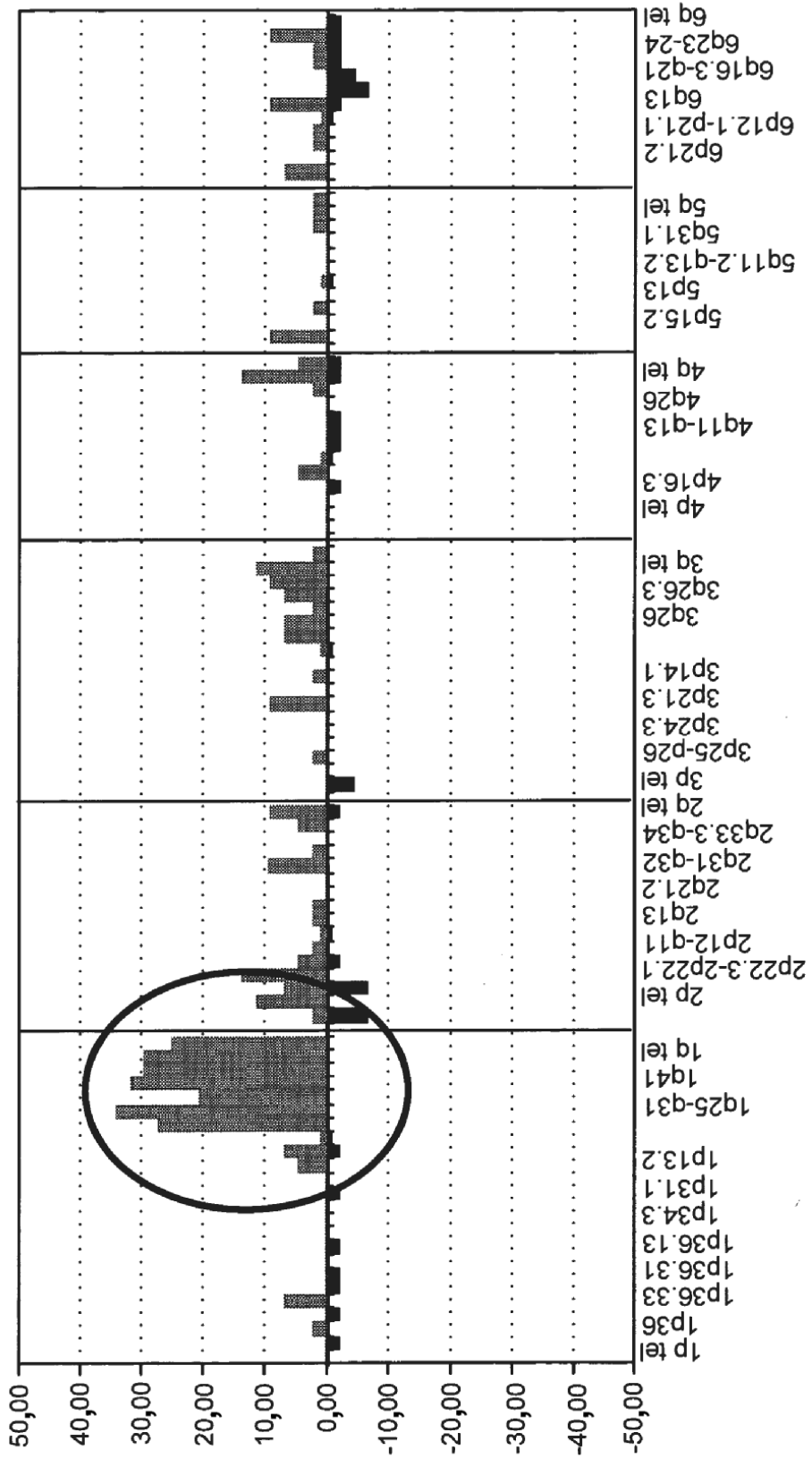


FIG. 4D

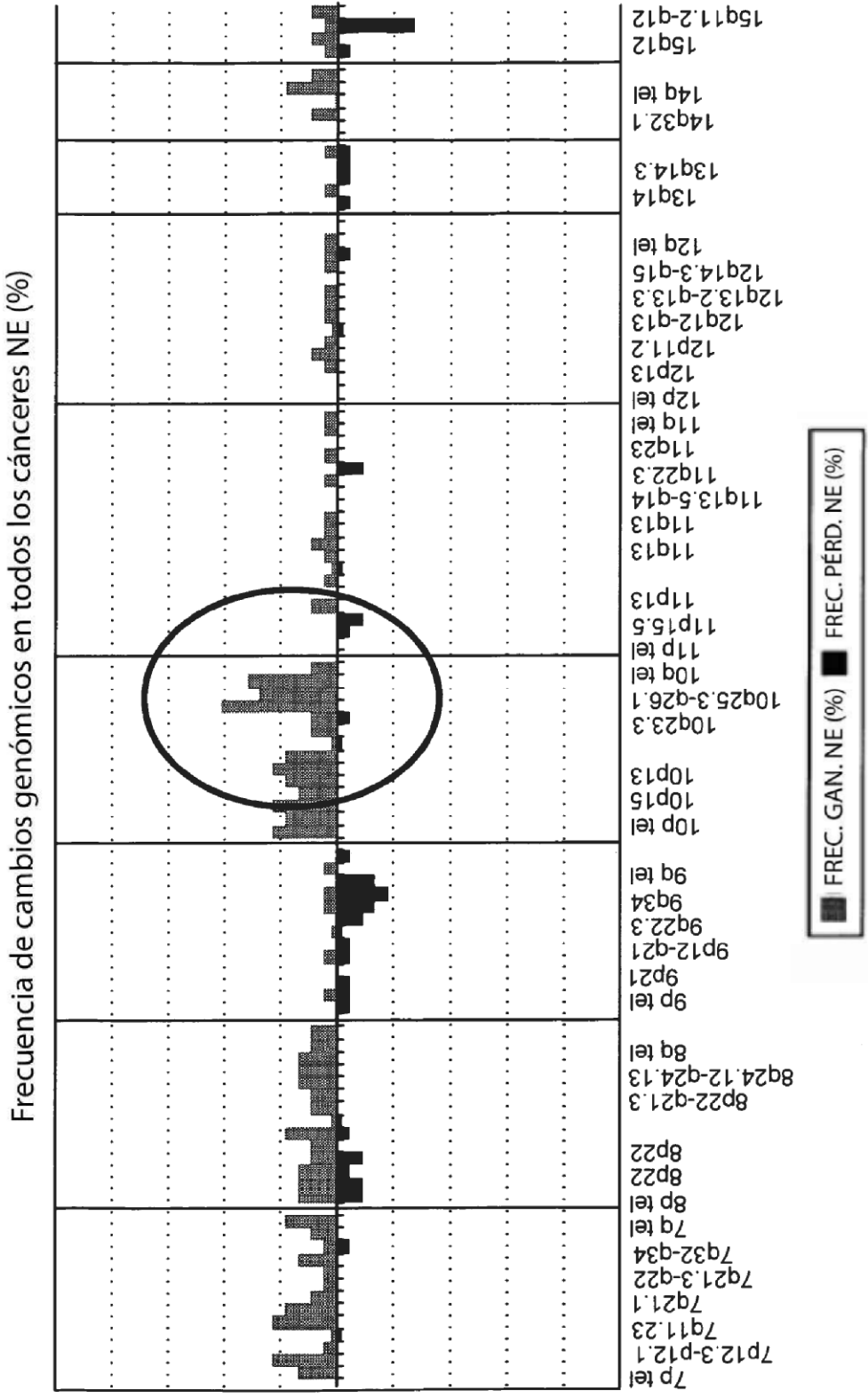


FIG. 4E

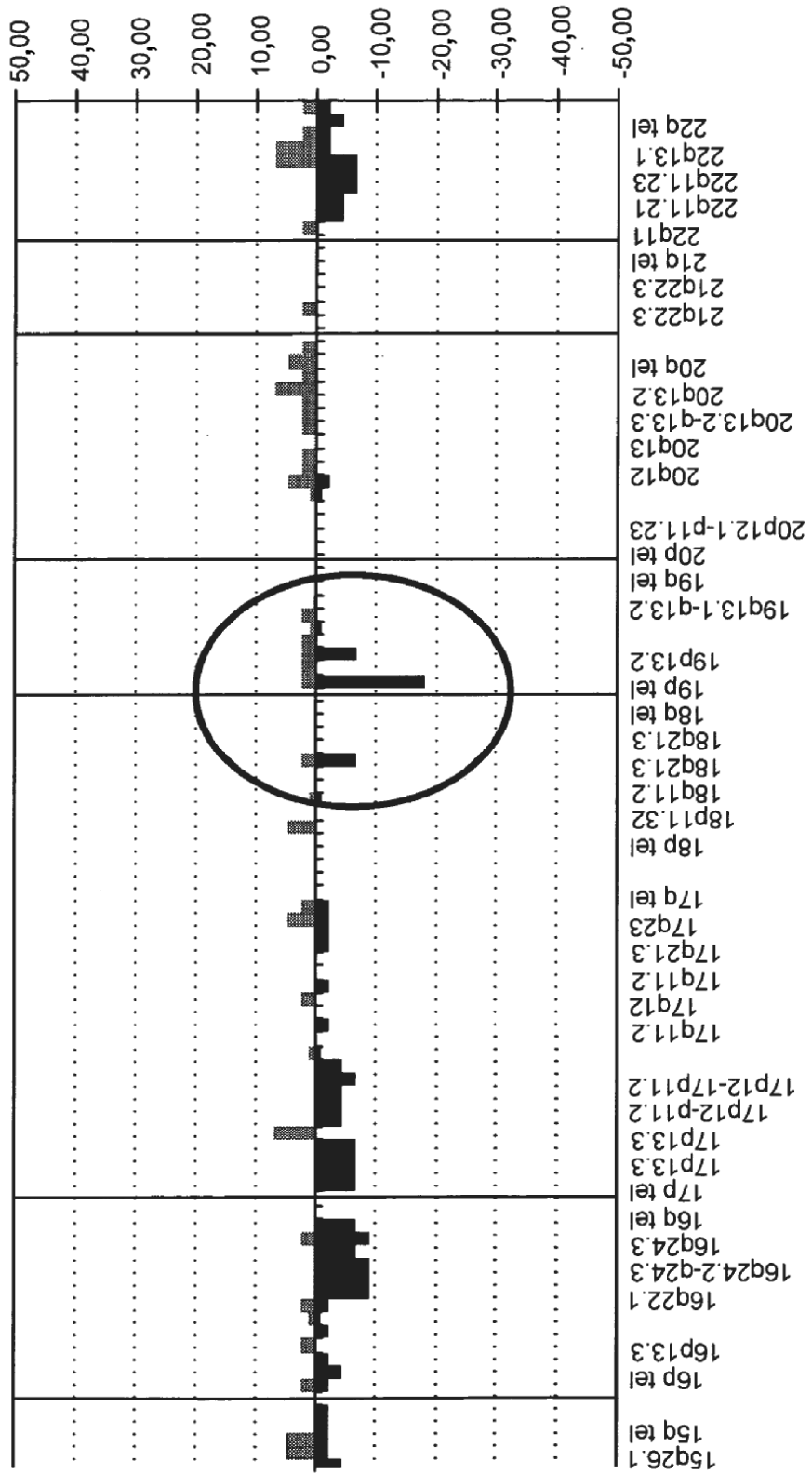


FIG. 4F

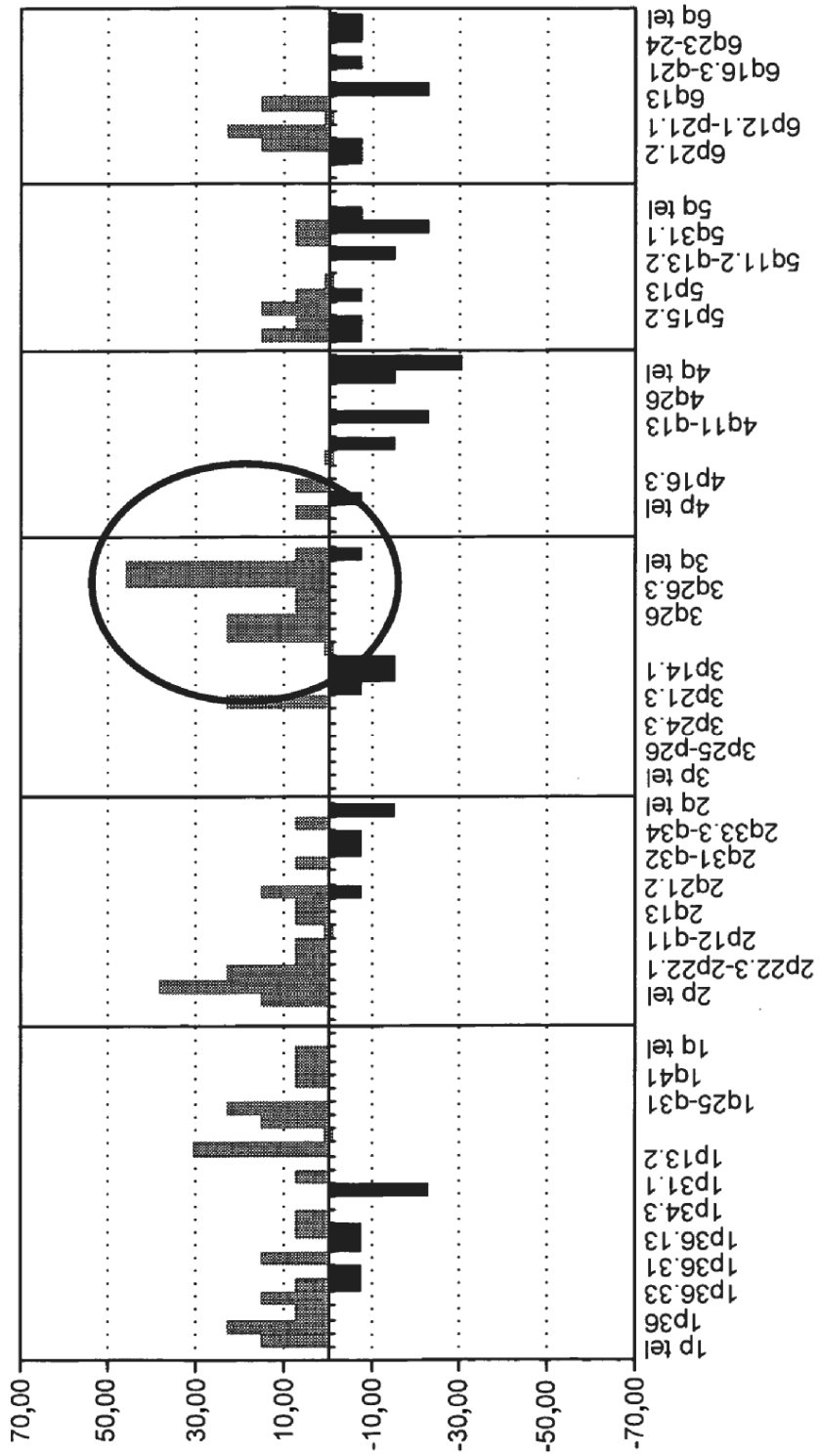


FIG. 4G

Frecuencia de cambios genómicos en todos los cánceres NE (%)

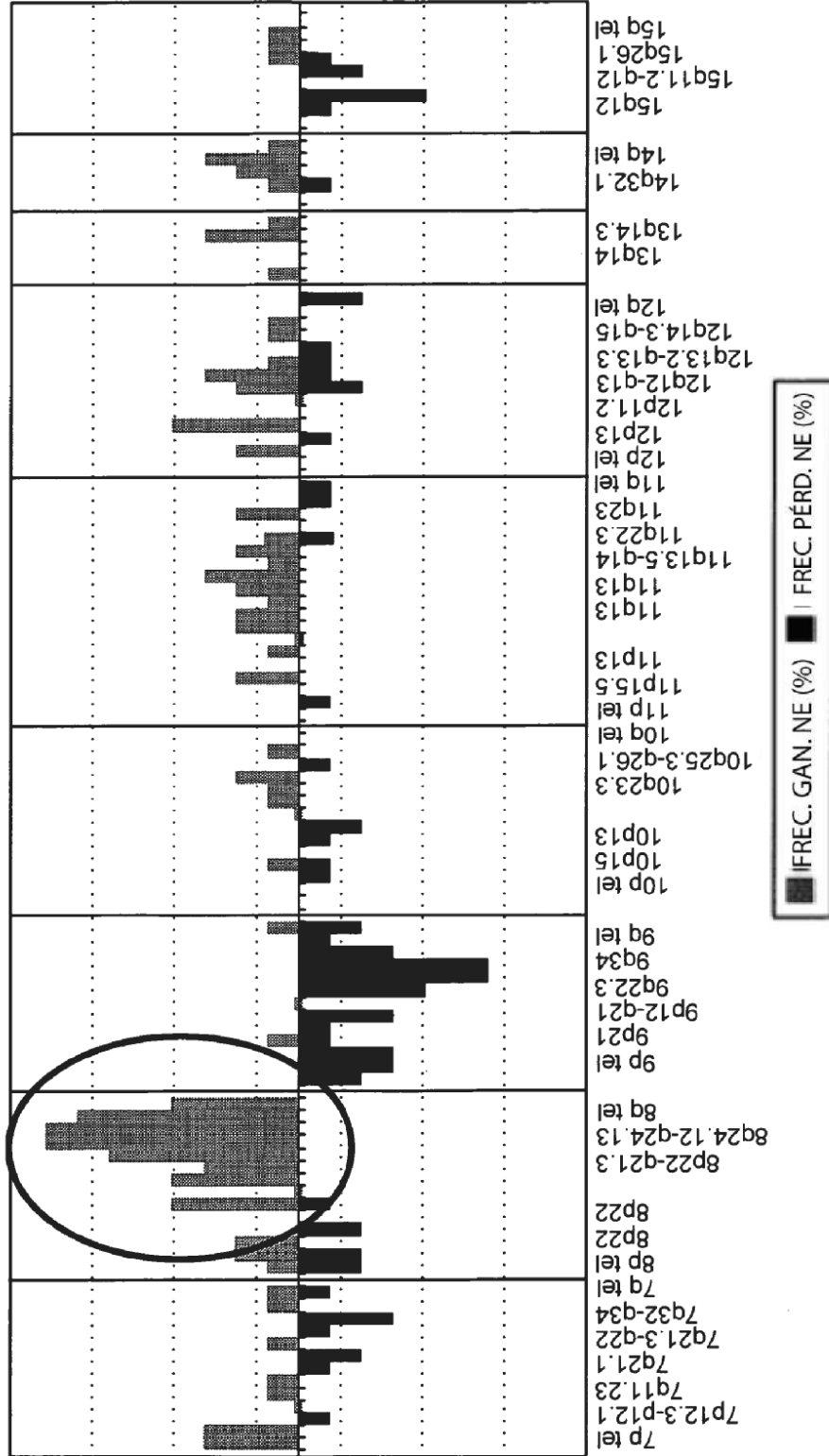


FIG. 4H

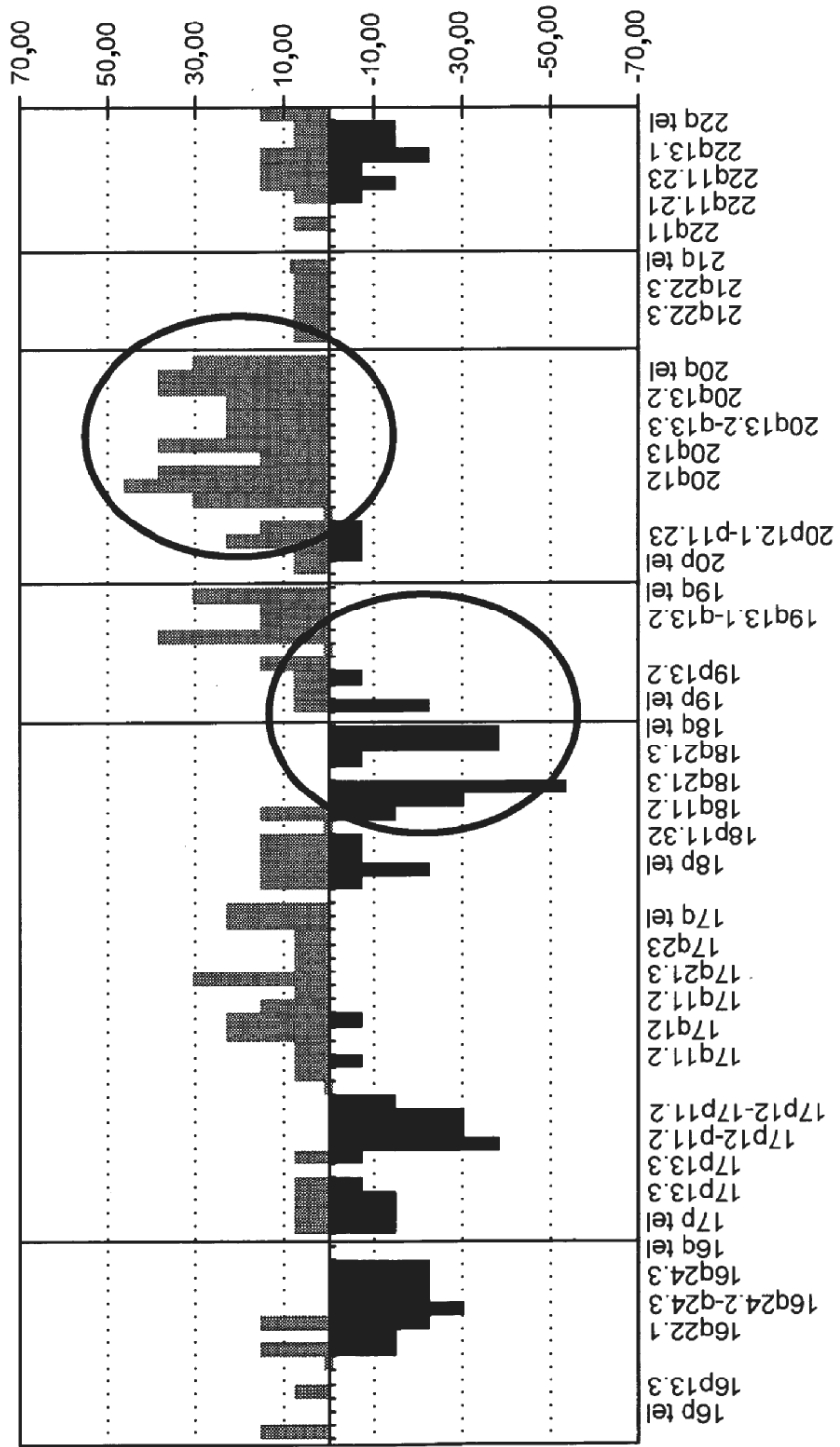


FIG. 4I

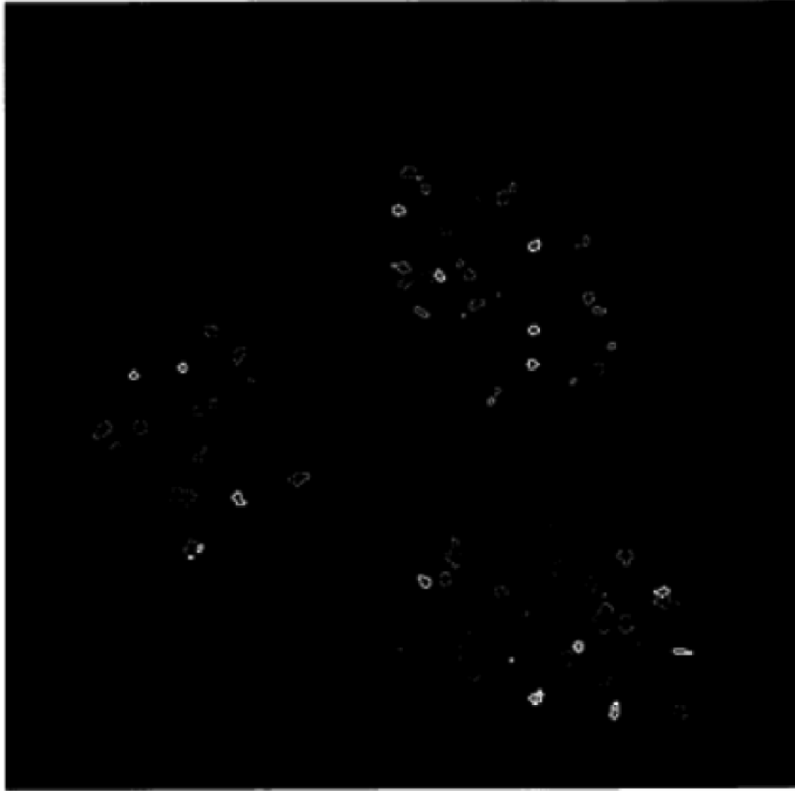


FIG. 5

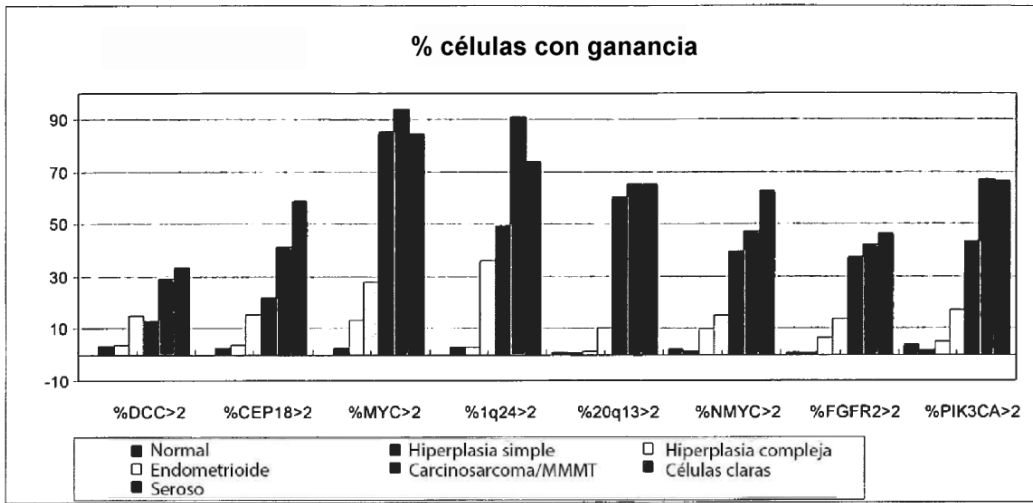


FIG. 6A

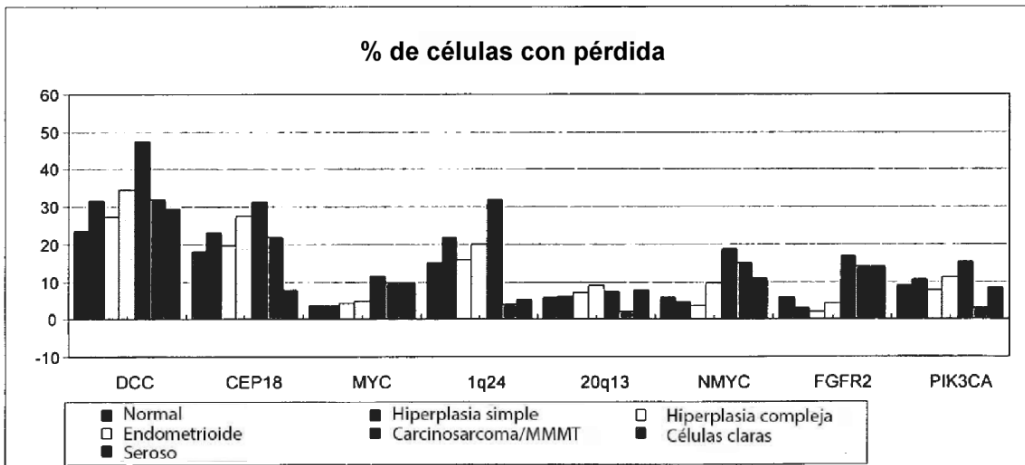


FIG. 6B

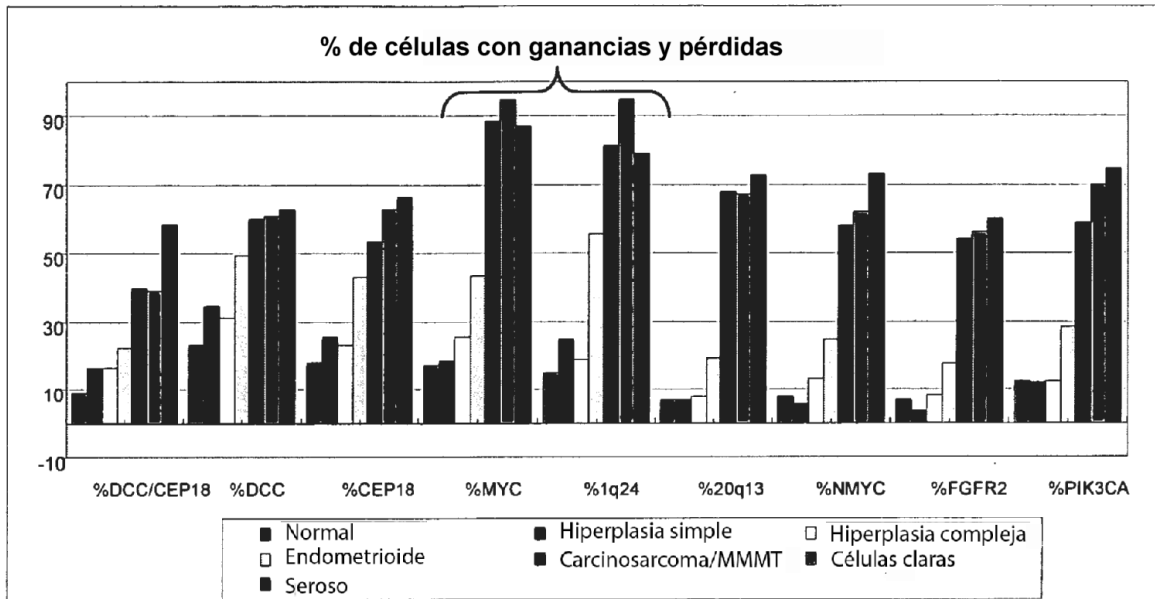


FIG. 6C

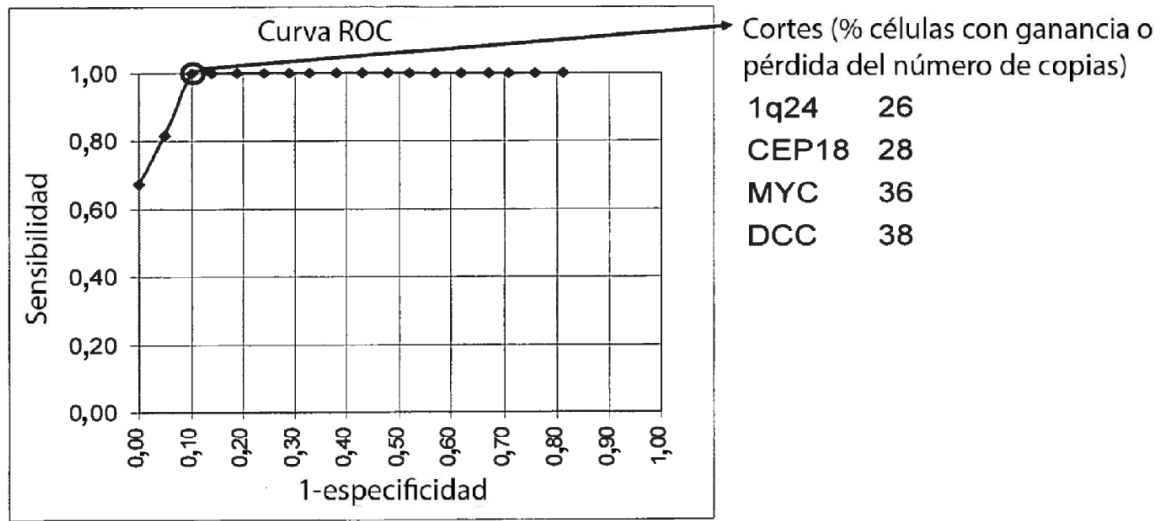


FIG. 7

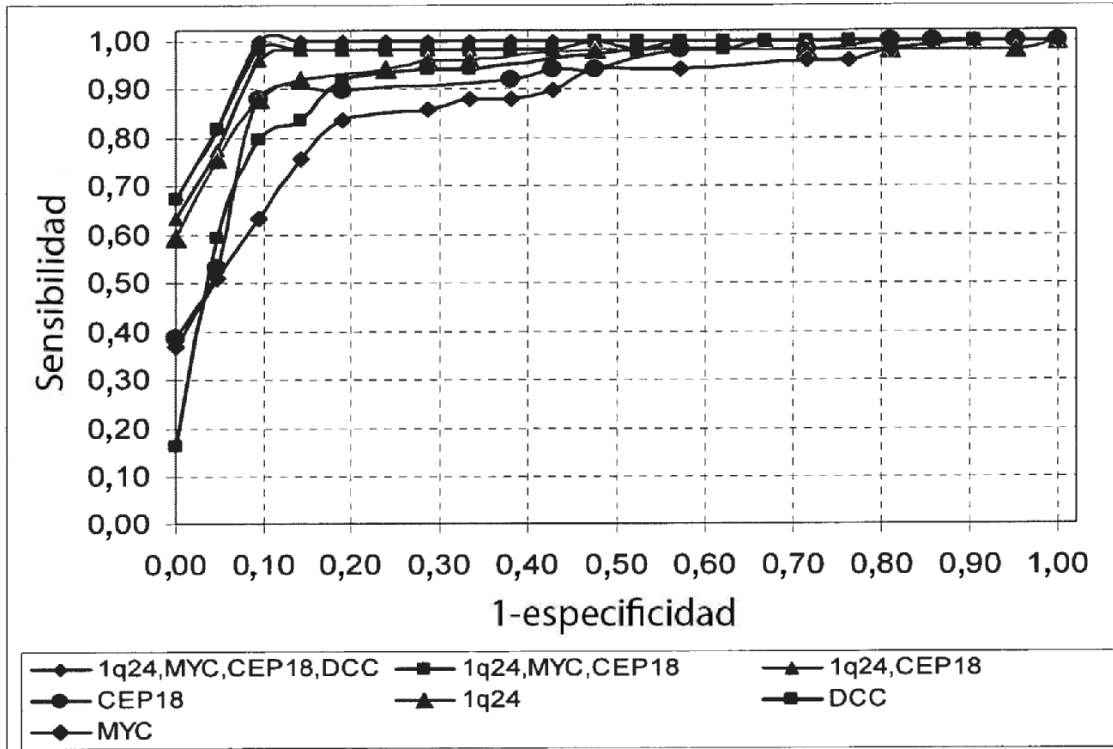


FIG. 8

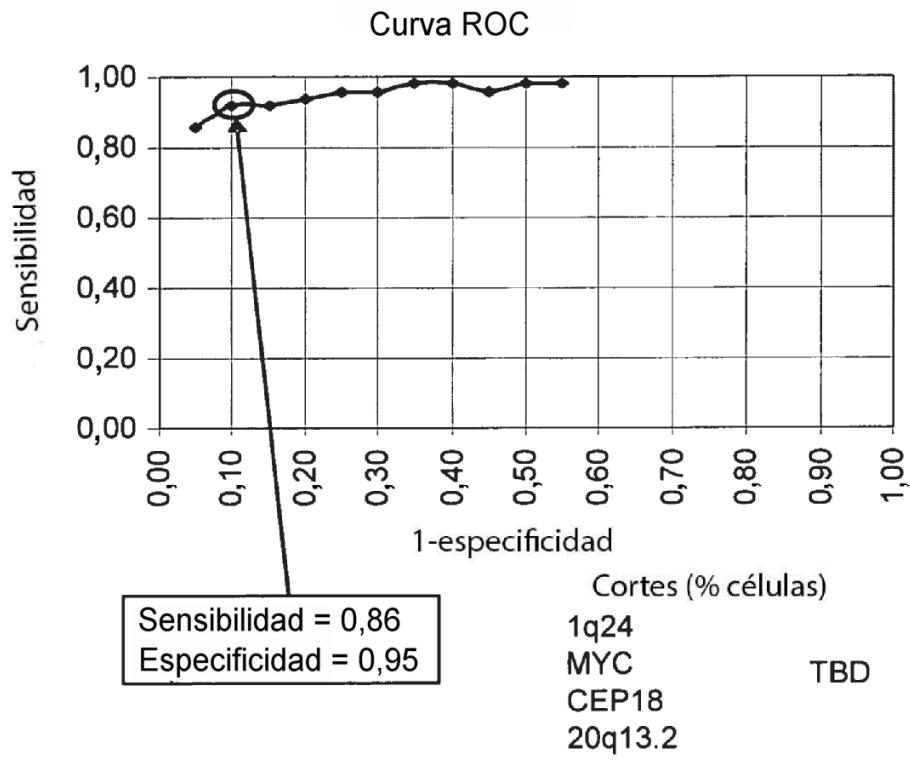


FIG. 9

Tipo de tumor		¿Test o Ref?	Sp n.º Edad	MYC%	CPE18%	1q24%	20q13,2%	MÁX	Máx	CEP10%	CPE10%	FGFR%	PTEN %		
Sp n.º	Gr n.º			gan >4	gan >4	% gan >6	% gan >4	de 4	/50	I >12	pérd >10	>1	pérd >18		
101	1	Normal	N+Hiper	101	Edad=64	0	0	0	0	0	10	10	0	12	
102	1	Normal	N+Hiper	102	Edad=40	0	0	0	0	0	6	6	0	6	
103	1	Normal	N+Hiper	103	Edad=48	0	0	0	0	0	8	8	0	14	
104	1	Normal	N+Hiper	104	Edad=47	0	0	0	4	4	2	2	0	8	
105	1	Normal	N+Hiper	105	Edad=64	0	0	0	0	0	6	6	0	18	
106	1	Normal	N+Hiper	106	Edad=60	0	0	0	0	0	4	4	0	4	
107	1	Normal	N+Hiper	107	Edad=83	0	0	0	0	0					
108	1	Normal	N+Hiper	108	Edad=55	0	0	0	0	0					
109	1	Normal	N+Hiper	109	Edad=62	0	0	0	0	0					
110	1	Normal	N+Hiper	110	Edad=38	0	0	0	4	4					
86	2	Hiperplasia simple	N+Hiper	86	Edad=72	0	2	2	0	2	1	26	26	0	28
88	2	Hiperplasia simple	N+Hiper	88	Edad=78	12	6	8	0	12	6	8	8	0	10
96	2	Hiperplasia simple	N+Hiper	96	Edad=50	0	2	2	0	2					
97	2	Hiperplasia simple	N+Hiper	97	Edad=50	0	2	2	4	4	2	10	10	0	14
100	2	Hiperplasia simple	N+Hiper	100	Edad=55	0	0	0	0	0	0	8	8	0	10
85	3	Hiperplasia compleja	N+Hiper	85	Edad=68	72	8	6	2	72					
87	3	Hiperplasia compleja	N+Hiper	87	Edad=59	2	4	0	2	4	2	2	2	0	6
89	3	Hiperplasia compleja	N+Hiper	89	Edad=38	0	2	0	0	2	1	4	4	0	6
90	3	Hiperplasia compleja	N+Hiper	90	Edad=52	4	2	2	0	4					
91	3	Hiperplasia compleja	N+Hiper	91	Edad=58	0	4	4	0	4					
93	3	Hiperplasia compleja	N+Hiper	93	Edad=60	2	2	6	2	6					
2	4	Ca grado endometroide		2	Edad=58	0	0	0	0	0	0	18	18	2	26
3	4	Ca grado endometroide		3	Edad=58	58	8	10	4	58	29	18	14	0	18
4	4	Ca grado endometroide		4	Edad=77	14	8	82	12	82	41	12	8	0	8
5	4	Ca grado endometroide		5	Edad=79	28	16	38	10	38	19	26	12	24	14
14	4	Ca grado endometroide		14	Edad=47	56	44	38	16	56	28	28	8	12	10
15	4	Ca grado endometroide		15	Edad=60	4	4	4	10	10	5	18	18	2	18
16	4	Ca grado endometroide		16	Edad=64	0	2	4	4	4	2	26	26	4	28
18	4	Ca grado endometroide		18	Edad=0	8	10	80	0	80	40	8	4	2	4
56	4	Ca grado endometroide		56	Edad=57	0	4	0	0	4	2	22	22	0	26
57	4	Ca grado endometroide		57	Edad=58	8	2	2	0	8	4	22	22	0	26
58	4	Ca grado endometroide		58	Edad=76	2	6	2	12	12	6	26	16	8	16
59	4	Ca grado endometroide		59	Edad=65	0	0	8	2	8	4	16	16	0	22
61	4	Ca grado endometroide		61	Edad=81	4	8	6	2	8	4	14	12	0	12
63	4	Ca grado endometroide		63	Edad=81	8	6	86	2	86	43	14	10	0	14
65	4	Ca grado endometroide		65	Edad=55	2	6	2	0	6	3	34	34	4	38
7	5	Ca grado endometroide		7	Edad=69	74	16	8	0	74					
8	5	Ca grado endometroide		8	Edad=54	14	10	2	4	14					
33	5	Ca grado endometroide		33	Edad=86	6	14	88	2	88					
34	5	Ca grado endometroide		34	Edad=70	26	0	2	4	26	13	10	8	52	16
35	5	Ca grado endometroide		35	Edad=70	18	6	12	2	18					
36	5	Ca grado endometroide		36	Edad=79	62	28	68	56	68					
37	5	Ca grado endometroide		37	Edad=54	10	12	70	2	70					
66	5	Ca grado endometroide		66	Edad=59	14	24	90	10	90					
67	5	Ca grado endometroide		67	Edad=85	0	0	0	2	2					
70	5	Ca grado endometroide		70	Edad=60	80	8	12	4	80					
83	5	Ca grado endometroide		83	Edad=48	28	10	26	12	28					
9	6	Ca grado endometroide		9	Edad=44	62	18	18	0	62					
42	6	Ca grado endometroide		42	Edad=77	16	18	82	16	82					
43	6	Ca grado endometroide		43	Edad=71	80	30	92	10	82					
44	6	Ca grado endometroide		44	Edad=66	14	12	90	4	90					
45	6	Ca grado endometroide		45	Edad=42	24	28	32	6	32					
47	6	Ca grado endometroide		47	Edad=68	98	76	78	80	98					
75	6	Ca grado endometroide		75	Edad=56	30	18	34	10	34					
76	6	Ca grado endometroide		76	Edad=59	42	0	28	16	42					
77	6	Ca grado endometroide		77	Edad=47	82	88	58	44	88					
1	7	Seroso	Ca	1	Edad=60	74	50	64	48	74					
6	7	Seroso	Ca	6	Edad=92	84	76	84	74	84					
10	7	Seroso	Ca	10	Edad=64	94	72	50	50	94					
49	7	Seroso	Ca	49	Edad=42	94	100	92	86	100					
50	7	Seroso	Ca	50	Edad=76	82	22	64	34	82					
51	7	Seroso	Ca	51	Edad=80	92	66	84	98	98					
79	7	Seroso	Ca	79	Edad=77	62	30	64	82	82					
80	7	Seroso	Ca	80	Edad=87	96	42	84	98	98					
94	7	Seroso	Ca	94	Edad=59	84	70	78	18	84					
11	8	Carcinosarcoma/MMMT	Ca	11	Edad=88	90	2	6	56	90					
12	8	Carcinosarcoma/MMMT	Ca	12	Edad=68	76	12	56	66	76					
78	8	Carcinosarcoma/MMMT	Ca	78	Edad=67	90	52	86	60	90					
54	9	Células claras	Ca	54	Edad=75	94	22	92	88	94					
81	9	Células claras	Ca	81	Edad=84	94	60	90	42	94					
Total						42	41	38	29			14	12	9	7

FIG. 10