

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 641**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2006 E 14176615 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2789697**

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

30 Prioridad:

18.02.2005 US 654742 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2017

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (50.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 , US y
MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 641 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y sondas para detectar cáncer de esófago

Antecedentes de la invención

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

15 Las etapas histológicas que conducen al adenocarcinoma de esófago en pacientes con EB son las siguientes: 1) metaplasia intestinal (MI) del epitelio escamoso estratificado normal, 2) displasia de bajo grado (DBG), 3) displasia de alto grado (DAG), y 4) AE. Los pacientes a los que se ha diagnosticado EB deberían someterse a una vigilancia regular del desarrollo de lesiones neoplásicas, que incluyen DBG, DAG y AE. Los pacientes con AE y DAG se deben tratar de forma agresiva con esofagectomía distal o terapias desarrolladas más recientemente tales como terapia fotodinámica u otras técnicas ablativas para prevenir el avance a la enfermedad metastásica e incurable. Los pacientes con DBG están en riesgo de avanzar a la DAG y por lo tanto requieren una vigilancia regular, pero no esofagectomía. La supervivencia global a 5 años para pacientes con AE es solo de 20%. Serán necesaria la detección temprana y precisa y el tratamiento de los precursores neoplásicos del AE (es decir, MI, DBG y DAG) para que haya un aumento de la tasa de supervivencia de pacientes con neoplasia asociada al EB.

25 Los resultados histológicos se consideran actualmente el patrón referencial para determinar si un paciente tiene displasia y/o AE. Actualmente se recomienda vigilar en los pacientes con EB el desarrollo de DAG y AE, llevando a cabo exámenes endoscópicos del esófago con regularidad y obteniendo biopsias en cuatro cuadrantes de cada 1-2 cm de esófago afectado. Sin embargo, esta recomendación con frecuencia no se sigue, debido principalmente al periodo de tiempo prolongado necesario para llevar a cabo este procedimiento, en especial en paciente con EB de segmento largo. Los problemas asociados con el uso de biopsias para la vigilancia de los pacientes de Barrett para el desarrollo de neoplasia incluyen: 1) muestra limitada de la mucosa afectada, 2) imposibilidad de tomar biopsias en cuatro cuadrantes cada 1-2 cm, y 3) mala reproducibilidad entre observadores patólogos para el diagnóstico de la DBG y la DAG. Se ha calculado que los protocolos de vigilancia endoscópica que usan las biopsias en cuatro cuadrantes cada cm solo toman muestra de aproximadamente 1-2% de la mucosa afectada. Esta toma de muestras limitada puede conducir a resultados de patología falsos negativos o a la subestimación (p. ej., resultados de patología que muestran solo MI o DBG en un paciente que tiene DAG o AE). Por lo tanto, hay una necesidad de métodos y composiciones mejorados para distinguir las muestras de pacientes con DAG y AE de DBG + MI + normal y DBG de normal + MI.

Resumen de la invención

40 Un objeto de la invención es proporcionar un método para el cribado del carcinoma de esófago o lesión precursora. El método implica el uso de la hibridación in situ para detectar anomalías cromosómicas asociadas con un carcinoma de esófago o lesión precursora. En este método, un conjunto de sondas de ácido nucleico marcadas se hibridan con células del esófago en una muestra, para detectar selectivamente un carcinoma de esófago y/o lesión precursora en la muestra. Después se evalúa el patrón de hibridación de las sondas y después se correlaciona con la presencia o ausencia de un carcinoma de esófago y/o lesión precursora.

45 La presente invención describe un método para determinar la evolución histológica de normal a un adenocarcinoma de esófago según la reivindicación 1.

50 Se describe un conjunto de sondas de ácido nucleico para usar en el método de la presente invención. El conjunto de sondas se caracteriza por la capacidad para detectar selectivamente un carcinoma de esófago y/o lesión precursora en la muestra biológica. El conjunto comprende sondas cromosómicas complementarias a regiones diana que llevan anomalías cromosómicas asociadas con la displasia de bajo grado (DBG) o la displasia de alto grado (DAG) y el adenocarcinoma de esófago (AE). Se pueden usar conjuntos de multisondas no solo para detectar la DBG, DAG y AE, sino también para distinguir DAG + AE de DBG + normal + MI y DBG de normal + MI.

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

sonda de recuento del cromosoma Y.

Las combinaciones de sondas individuales dentro de un conjunto de sondas de la presente invención deben elegirse para sensibilidad y especificidad combinadas cuando se usan en los métodos de la presente invención. Deben elegirse las sondas cromosómicas que detectan las pérdidas o ganancias cromosómicas más frecuentes asociadas con un carcinoma y/o displasia de esófago, así como sondas que se complementan una con otra basándose en la sensibilidad, especificidad y detectabilidad. En esta invención, los conjuntos de sondas elegidos para la identificación de la DBG tendrán valores de DFI que son como máximo aproximadamente 0,7. Los conjuntos de sondas elegidos para la identificación de DAG+AE tendrán valores de DFI que son como máximo aproximadamente 0,5. En cualquier caso, los valores de DFI menores de 0,5 normalmente proporcionarán mejores resultados, mientras que valores de DFI de como máximo aproximadamente 0,35 normalmente proporcionarán incluso mejores resultados.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran los porcentajes medios de células que presentan ganancia o pérdida de locus, respectivamente, para cada categoría histológica.

La figura 2 muestra curvas ROC que ilustran las relaciones entre sensibilidad y especificidad para detectar muestras de AE más DAG con respecto al grupo colectivo de muestras normales, MI y DBG para cuatro posibles combinaciones de sondas diferentes.

La figura 3 muestra curvas ROC que ilustran las relaciones entre sensibilidad y especificidad para detectar muestras de DBG con respecto al grupo colectivo de muestras normales + MI para posibles combinaciones de sondas diferentes.

La figura 4 muestra curvas ROC que ilustran las relaciones entre sensibilidad y especificidad para detectar individualmente muestras de AE, DAG, DBG y AE + DAG con respecto a muestras normales, así como para detectar muestras de AE + DAG con respecto a muestras normales + MI + DBG, así como muestras de DBG respecto a normales + MI, para un conjunto de sondas de 8q24.12-13, 9p21, 17q11.2-12 y 20q13.

La figura 5 muestra el método usado para llevar a cabo un recuento de 100 células.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que conjuntos de multisondas individuales son capaces de detectar un carcinoma de esófago o lesión precursora con alta sensibilidad y especificidad. La presente invención incluye composiciones y métodos para usar dichos conjuntos de sondas que comprenden sondas cromosómicas complementarias a regiones diana que llevan anomalías cromosómicas en la displasia de bajo grado (DBG), la displasia de alto grado (DAG) o el adenocarcinoma de esófago (AE). Los conjuntos de multisondas individuales de la presente invención proporcionan mayores sensibilidades y especificidades que las sondas individuales, y por lo tanto, las sondas dentro de cada conjunto comprenden colectivamente un mejor indicador de un carcinoma de esófago o lesión precursora que cada sonda individual contenida dentro del conjunto. Un conjunto de sondas de la presente invención proporciona una distinción precisa de displasia y/o adenocarcinoma. Antes de la presente invención, no se habían descrito conjuntos de sondas con la capacidad para detectar selectivamente el carcinoma de esófago o lesiones precursoras con alta especificidad y sensibilidad.

La presente invención también se basa en parte en el descubrimiento de que los conjuntos de multisondas individuales se pueden usar no solo para detectar la DBG, DAG y AE, sino también para discriminar la DAG y AE de la DBG + MI + normal, así como la BDG de MI y normal. Los métodos y conjuntos de sondas de la presente invención permiten una detección temprana y precisa del AE y/o precursores neoplásicos. La discriminación es una herramienta importante para determinar el tratamiento adecuado y prevenir el avance de la enfermedad a un estado incurable (véase Antecedentes de la invención).

La expresión "carcinoma de esófago" en el contexto de la presente invención se pretende que incluya el carcinoma intramucoso y adenocarcinoma de esófago o cáncer de esófago. La expresión "lesión precursora" se pretende que incluya la displasia de bajo y alto grado determinada por análisis histológico. La expresión "región diana" o "ácido nucleico diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos que reside en una posición cromosómica específica, cuya pérdida o ganancia es indicativa de la presencia de un carcinoma de esófago y/o lesión precursora. La "región diana" o "ácido nucleico diana" es reconocido específicamente por una sonda de la presente invención e hibrida con la misma en el método de la presente invención.

Sondas cromosómicas

Las sondas de la presente invención son para usar en conjunto con la tecnología de hibridación in situ, o más preferiblemente la tecnología de hibridación fluorescente in situ (FISH), cuyos métodos son bien conocidos en la técnica. En esta tecnología, se hibridan sondas de ácido nucleico marcadas in situ con sus respectivos ácidos nucleicos complementarios diana en una muestra biológica en la que se desea la identificación de la presencia o ausencia de un carcinoma de esófago o lesión precursora. Después la posterior detección de las sondas en la

muestra se correlaciona con un diagnóstico clínico de displasia o cáncer en el sujeto.

La expresión "sonda cromosómica" o "composición de sonda cromosómica" se pretende que signifique un polinucleótido o una mezcla de polinucleótidos con la capacidad para hibridar específicamente con una región de cromosoma. La región de cromosoma, también denominada la diana de la sonda, puede variar en longitud de una sonda a otra, estando típicamente en el intervalo de aproximadamente 70.000 nucleótidos a aproximadamente 800.000 nucleótidos, aunque se han detectado dianas de sondas tan pequeños como varios miles de nucleótidos, y algunas dianas de sondas que incluyen dianas de secuencia repetitivas pueden tener un tamaño de varias megabases. Las sondas cromosómicas a menudo están compuestas de fragmentos de polinucleótidos que varían en tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud, y solo están restringidas por su capacidad para detectar específicamente una región de interés. Los dianas de las sondas específicas de locus comprenden preferiblemente al menos 100.000 nucleótidos. Una sonda cromosómica de la presente invención se ha combinado o asociado con restos individuales que permiten la detección.

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

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

Un conjunto de sondas de la presente invención puede comprender sondas cromosómicas seleccionadas del grupo que consiste en una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 20q13, una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma 9, una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma 7, una sonda específica del locus 5q21-22, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 17p13.1, una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma 17 y una sonda específica del locus 9p21. El conjunto de sondas puede comprender además una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma Y. En una realización preferida, el conjunto puede comprender una sonda específica del locus 20q13, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 9p21 y una sonda específica del locus 8q24.12-13.

Las sondas individuales que aparecen habitualmente en conjuntos de sondas que son capaces de distinguir la DBG de MI + normal, incluyen una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma 7, una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma Y, y una sonda específica del locus 9p21. Las sondas individuales que aparecen habitualmente en conjuntos de sondas que son capaces de distinguir la DAG y AE de DBG + normal + MI, incluyen una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 5q21-22, una sonda específica del locus 9p21, una sonda de recuento cromosómico para el cromosoma 17, una sonda de recuento para el cromosoma 9, una sonda específica del locus 17p13.1, una sonda específica del locus 17q11.2-12 y una sonda específica del locus 20q13.

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

Las sondas de recuento de cromosomas y las sondas identificadoras específicas de locus se pueden obtener en el mercado de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Dichas sondas también se pueden preparar usando métodos convencionales, que son conocidos en la técnica. Las sondas cromosómicas se pueden preparar, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), o a partir de ADN humano clonado, tal como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales P1 (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Una región de interés se puede obtener por la amplificación por PCR o clonación. Alternativamente, las sondas cromosómicas se pueden preparar sintéticamente.

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

La unión de fluoróforos a sondas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se puede llevar a cabo mediante cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir covalentemente a un nucleótido particular, por ejemplo, y el nucleótido marcado se incorpora en la sonda usando técnicas convencionales, tales como la traslación de la muesca, el cebado aleatorio y el marcado con PCR. Alternativamente, el fluoróforo se puede unir covalentemente, a través de un conector, a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han transaminado. Los métodos para marcar sondas se describen en la patente de EE.UU. n.º 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., pág. 21-40, Humana Press.

Los fluoróforos que se pueden usar junto con la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), rojo Texas (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(y -6)-carboxi-X-rodamina, rodamina B de lisamina, 5-(y -6)-carboxifluoresceína; fluoresceína-5-isotiocianato (FITC); ácido 7-dietilaminocumarina-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-(y -6)-isotiocianato; 5-(y -6)-carboxitetrametilrodamina; ácido 7-hidroxycumarina-3-carboxílico; 6-[fluoresceína-5-(y -6)-carboxamido]hexanoico; ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropiónico; eosina-5-isotiocianato; eritrosina-5-isotiocianato; 5-(y -6)-carboxi-rodamina 6G; y acetilazida Cascade Blue (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Un experto en la técnica reconocerá que se pueden usar como restos que contienen marcador otros agentes luminiscentes o colorantes en lugar de fluoróforos. Otros agentes luminiscentes, que se pueden usar, incluyen, por ejemplo, restos que contienen marcadores radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Alternativamente, se puede usar la hibridación in situ de sondas cromosómicas con el uso de restos de detección visualizados por medios indirectos. Las sondas se pueden marcar con biotina o digoxigenina, utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, y luego procesarlas adicionalmente para la detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr mediante la posterior unión de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso la visualización y la distinción de las

sondas se pueden conseguir como se ha descrito anteriormente para FISH. Las sondas cromosómicas hibridadas con regiones diana se pueden visualizar, alternativamente, por reacciones enzimáticas de restos de marcadores con sustratos adecuados para la producción de productos coloreados insolubles. Cada sonda se puede distinguir de otras sondas dentro del conjunto, mediante la elección de un resto marcador distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar por la incubación posterior con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. El fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y azul de nitrotetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que la diaminobencidina sirve como un sustrato para HRP.

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

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

Hibridación in situ

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

Métodos de selección de sondas

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

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

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

tendrán valores de DFI que son como máximo de aproximadamente 0,5. Los valores de DFI que son menores de aproximadamente 0,5 normalmente proporcionan resultados incluso mejores. Los valores de DFI que son menores de aproximadamente 0,35 normalmente proporcionan resultados incluso mejores.

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

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

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

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

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

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

50 El método describe primero la obtención de una muestra biológica que comprende células del esófago de un sujeto que se sospecha que tiene un carcinoma de esófago o una lesión precursora. Después, la muestra se pone en contacto con un conjunto de sondas cromosómicas para detectar selectivamente un carcinoma de esófago o una lesión precursora en la muestra, si lo hubiera, en condiciones para hibridar de forma específica las sondas con sus ácidos nucleicos diana presentes en la muestra. Las sondas del conjunto pueden hibridar a la vez o secuencialmente, generando las imágenes de los resultados de cada hibridación, desprendiendo la sonda o sondas y después hibridando la muestra con la sonda o sondas restantes. También se pueden hibridar múltiples conjuntos de sondas con la muestra de esta manera. El conjunto de sondas cromosómicas se selecciona de modo que dicho conjunto es capaz de detectar selectivamente un carcinoma de esófago o una lesión precursora en la muestra biológica. Cualquier conjunto de sondas de la invención se puede usar junto con este método. Este método comprende además la detección de un patrón de hibridación del conjunto de sondas cromosómicas con la muestra biológica, en donde el patrón de hibridación es indicativo de la presencia o ausencia del carcinoma de esófago o lesión precursora en el sujeto. En una realización preferida, el patrón de hibridación se detecta por FISH, como se ha descrito anteriormente.

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

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

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

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

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

La primera técnica de recuento de células consecutivas puede ser necesaria si se tiene que determinar el porcentaje exacto de células que contienen una cierta anomalía, para saber si el caso es positivo para la anomalía. Por ejemplo, para determinar si un caso que muestra una pérdida homocigota o hemocigota de 9p21 es de hecho positivo para DBG, se tendría que conocer el porcentaje de células que muestran la anomalía. La primera técnica también es necesaria si las células neoplásicas no presentan anomalías citológicas significativas, como es el caso de la DBG. La desventaja de la primera técnica de recuento de células consecutivas es que requiere bastante tiempo y por lo tanto solamente es práctica para contar un número relativamente pequeño de células (p. ej., 50 o 100 células). El problema relacionado con esto es que frecuentemente hay miles de células en el portaobjetos y a veces

solo una fracción muy pequeña del número total de células son realmente células tumorales. Por consiguiente, mediante el uso de la primera técnica se corre el riesgo de obtener resultados falsos negativos debido a un muestreo limitado.

5 Afortunadamente, se puede usar una técnica de barrido (técnica número 2) que permite revisar rápidamente un gran número de células, para ayudar a evitar resultados falsos negativos debido al muestreo limitado. Esta técnica (descrita en la patente de EE.UU. n° 6.174.681) se lleva a cabo mediante el barrido visual del portaobjetos, por lo general el portaobjetos entero, en busca de células que tienen características citológicas que sugieren, aunque no sea un diagnóstico absoluto, neoplasia. El barrido se lleva a cabo mediante la visualización de cada campo de visión microscópico sobre el portaobjetos con bastante rapidez, buscando solo las células que tienen anomalías nucleares que sugieren neoplasia. La persona que realiza el barrido trata de revisar todos los campos de visión sobre el portaobjetos, pero no pierde tiempo evaluando los patrones de señales de una célula o células en un campo de visión, a menos que la célula o células tengan características citológicas anormales. (A veces se cuestiona por qué FISH es necesario si las características citológicas observadas con DAPI sugieren que las células son neoplásicas. La razón es que aunque las características sugieren neoplasia, no son totalmente un diagnóstico de neoplasia).
 10 Como se ha señalado anteriormente, el barrido permite que el recuento se centre en la fracción de células generalmente pequeña que es probable que tenga anomalías cromosómicas compatibles con un diagnóstico de neoplasia. El barrido permite un análisis más rápido y aumenta la probabilidad de que no se pierda un resultado positivo. El barrido, aunque generalmente se realiza con un contracolorante nuclear DAPI (dihidrocloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol), también se puede hacer con otros contracolorantes, tales como yoduro de propidio. El yoduro de propidio, que se usa típicamente en una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un colorante rojo fluorescente, específico de ADN que se puede observar con un máximo de emisión a la longitud de onda de 614 nm. DAPI, usado típicamente en una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml, es un colorante azul fluorescente específico de ADN que se puede observar con un máximo de emisión a la longitud de onda de 452 nm. El patrón de hibridación para el conjunto de sondas cromosómicas se detecta y se registra para las células seleccionadas para una evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. La hibridación se detecta por la presencia o ausencia de las señales particulares generadas por cada una de las sondas cromosómicas. La expresión "patrón de hibridación" se entiende que se refiere a la cuantificación del número de señales de hibridación cromosómica para cada una de las señales de las sondas para las células elegidas para dicha evaluación, mediante una de las dos técnicas descritas anteriormente.
 20 Una vez que se determina el número de regiones diana dentro de cada célula, evaluado por el número de regiones que muestran hibridación con cada sonda, se pueden cuantificar las ganancias y/o pérdidas cromosómicas relativas. Para sondas que hibridan con un autosoma, más de dos señales de la sonda por célula se considera una ganancia, mientras que menos de dos se considera una pérdida. Para una sonda de recuento de cromosomas para el cromosoma Y, más de una señal de la sonda por célula en varones se considera una ganancia, mientras que menos de una señal de la sonda por célula se considera una pérdida. Se registrarán los porcentajes de células con ganancia y/o pérdida (células anormales) para cada locus. Una muestra se puede considerar positiva para una anomalía (p. ej., DBG, DAG o AE) si el porcentaje de células anormales con respecto cualquiera de los locus ensayados, excede el valor de corte para ese locus.
 25
 30
 35

40 No es posible determinar el porcentaje exacto de células que muestran anomalías con la técnica de barrido, ya que la persona que realiza el análisis no hace un seguimiento del número exacto de células totales que se han evaluado mediante el barrido (frecuentemente miles). Sin embargo, no es necesario conocer el número exacto de células visualizadas en el portaobjetos con la técnica de barrido, ya que las células que se están buscando (en concreto, células que muestran anomalías cromosómicas marcadas, tales como polisomía) son prácticamente un diagnóstico de la presencia de neoplasia, independientemente del número total de células presentes en el portaobjetos. En otras palabras, cuando se utiliza la técnica de barrido, lo que se usa es el número absoluto de células que muestran una anomalía en lugar del porcentaje de células que muestran una anomalía, para determinar si un caso es positivo o negativo para neoplasia. Estudios previos realizados por los autores de la invención y otros, han demostrado que tan solo cuatro células anormales (independientemente del número total de células de apariencia normal en el portaobjetos) con polisomía (es decir, una célula que muestra ganancias para dos o más sondas) son suficientes para que un caso se defina con seguridad como positivo para una anomalía (véase, Sokolova IA, et al., J. *Molecular Diagnostics*, 2000).
 45
 50

55 Como se ha señalado anteriormente, la inclusión de múltiples sondas en un solo conjunto de sondas, aumenta la sensibilidad del ensayo frente a la obtenida con una sola sonda. Sin embargo, este aumento de la sensibilidad puede estar acompañado por una pérdida de especificidad, ya que aumentan las posibilidades de que cualquiera de las múltiples sondas de un resultado falso positivo. Para mantener una especificidad elevada, se pueden desarrollar criterios de corte estrictos para células que muestran una anomalía en un solo locus. Por ejemplo, se podría establecer que al menos 30% de las células tienen que mostrar una pérdida homocigota de 9p21 para que un caso se defina como positivo para la anomalía. Además, para los casos que no excedan estos puntos de corte para sondas individuales, se puede establecer que dos o más locus muestran ganancia o pérdida dentro de la misma célula, con el fin de considerar esa célula anormal, y después se aplica un punto de corte adecuado para establecer si el espécimen era positivo o no. Por ejemplo, cuando las ganancias son indicativas de una neoplasia esofágica o una lesión precursora, una muestra se podría considerar positiva si contiene, por ejemplo, al menos cuatro células que muestran ganancias de al menos dos o más regiones diana (véase, Sokolova IA, et al, J. *Molecular Diagnostics*,
 60

2000).

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

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

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

Ejemplos

20 Ejemplo 1

Selección de sondas

Conjuntos de sondas de FISH

25 Se llevó a cabo FISH con tres conjuntos de sondas únicas. Cada conjunto de sondas contenía cuatro sondas de recuento cromosómico (CEP®) o identificadores específicos de locus (LSI®) para centrómeros o locus específicos de cromosomas que habían mostrado estar alterados con frecuencia en pacientes con neoplasia asociada con EB (Tabla 1). Se incluyeron las sondas CEP 7, CEP 9 y CEP 17 para determinar la ganancia o pérdida alélica de las correspondientes sondas LSI en esos cromosomas (p. ej., 9p21 en el cromosoma 9) o aneusomía de esos cromosomas.

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

Conjunto de sondas	Rojo	Verde	Aguamarina	Oro
I	LS/9p21 (<i>P16</i>)	LSI 5p15	CEP9	LSI 5q21-22 (<i>APC</i>)
II	CEP Y	LSI 17q11.2-12 (<i>HER2/NEU</i>)	CEP17	LSI 17p13.1 (<i>P53</i>)
III	LSI 20q13.2	LSI 8q24.12-13 (<i>C-MYC</i>)	CEP7	LSI 7p12 (<i>EGFR</i>)

30 Con la excepción de la sonda LSI® 5q21-22 (APC), las sondas LSI® y CEP® están disponibles en el mercado en Vysis, Inc. (Downers Grove, IL, www.vysis.com) marcadas con SpectrumOrange®. En lugar del marcador SpectrumOrange®, el material de partida de ácido nucleico se transaminó y después se marcó químicamente utilizando Texas Red (rojo), ácido 6-[fluoresceína-5-(y 6-)-carboxamido]hexanoico (verde), ácido 7-dietilaminocumarina-3-carboxílico (aguamarina) y 5-(y 6-)-carboxiroadamina 6G (oro). El proceso de transaminación y marcado se describe en Bittner, et al., patente de EE.UU. nº 5.491.224.

35 La sonda LSI® 5q21-22 (APC) se preparó a partir de dos clones BAC (núm. de identificación RPC11-60p20 y RPC11-141i11 obtenidos de Invitrogen). El tamaño del cóntigo era de aproximadamente 246 kb y el gen APC se localizó aproximadamente en el centro del cóntigo. La sonda se transaminó y se marcó como se ha descrito anteriormente.

40 Población de estudio

Se obtuvo la aprobación de la Junta de revisión institucional (IRB) para este estudio y se obtuvo el consentimiento

informado de todos los pacientes incluidos. El estudio incluía 174 pacientes atendidos en la Clínica Mayo, Rochester, desde 2002 hasta 2003. Los pacientes fueron incluidos en el estudio si tenían EB comprobado por patología identificado previamente o EB comprobado por patología en el momento de entrar en el estudio. Se estudiaron 17 mujeres y 153 varones de edades comprendidas entre 31 a 87.

5 Muestras y resultados patológicos

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

10

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

15

Aislamiento de células para el análisis de FISH

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

20

25

Preparación de portaobjetos para el análisis de FISH

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

30

Hibridación FISH

La hibridación FISH se llevó a cabo de la siguiente manera: los portaobjetos se incubaron en 2X solución salina de citrato estándar (SSC) a 37°C durante 13 minutos, pepsina 0,05 mg/ml en HCl 10 mM a 37°C durante 14 minutos, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente (t.a.) durante cinco minutos, formaldehído al 1% a t.a. durante cinco minutos y PBS a t.a. durante cinco minutos. Los portaobjetos después se pusieron a t.a. en soluciones de etanol al 70%, 85% y 100% durante dos minutos en cada una y se dejaron secar al aire. Después de este pretratamiento, se aplicaron 5 µl (1,5 µl de sonda, 3,5 µl de tampón de hibridación LSI/WCP) de la mezcla de sondas adecuada, en la zona designada. Los portaobjetos se cubrieron entonces con cubreobjetos, los bordes del cubreobjetos se sellaron con pegamento de caucho y se colocaron en un sistema de desnaturalización/hibridación de Vysis HYBrite® en donde la sonda y el ADN diana se codesnaturalizaron a 73°C durante tres minutos y luego se incubaron a 37°C durante aproximadamente 15 horas. Después de hibridación durante la noche, los portaobjetos se lavaron en 2X SSC/0,1% de NP-40 a 73°C durante 40 segundos y se enjuagaron en 2X SSC/0,1% de NP-40 a temperatura ambiente durante varios minutos. A continuación, se aplicaron 10 µl de contracolorante DAPI I a cada área hibridada y después los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos.

35

40

45

Recuento de las señales de FISH

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

50

55

Análisis de los datos de recuento

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

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

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

15 El valor discriminante (VD), definido como $(x_1 - x_2)^2 / (s_1^2 + s_2^2)$, en donde x_1 y s_1 se refieren a uno de los grupos de MI, displasia o cáncer, y x_2 y s_2 se refieren al grupo de las muestras normales, se usó como una medida de la capacidad de ganar o perder un locus para distinguir entre una muestra del grupo de pacientes que tienen DBG, DAG o AE y una muestra del grupo de pacientes que no presentan una de estas anomalías (es decir, grupo de pacientes MI y normal). Valores de VD más elevados son indicativos de una mayor capacidad para distinguir entre los dos grupos de pacientes. Como otra medida de la discriminación, se aplicó la prueba t de Student a los porcentajes de células anormales de dos grupos de muestras diferentes, para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas (probabilidades <0,05 se consideraron significativas).

Las sensibilidades y las especificidades se calcularon aplicando puntos de corte para los porcentajes de células que

mostraban ganancias o pérdidas para cada uno de los 12 locus. Una muestra se consideraba positiva para la ganancia o pérdida de un locus, si el porcentaje de células con la ganancia o pérdida correspondiente excedía el punto de corte para ese locus. La sensibilidad para la detección de muestras con un diagnóstico particular era igual a la fracción de muestras en ese grupo que eran positivas. Las muestras que no proporcionaron al menos 50 células con señales de FISH de calidad suficiente para el recuento, fueron excluidas del cálculo. La especificidad en relación con un grupo de control se calculó como uno menos la fracción de las muestras del grupo de control que eran positivas usando los mismos criterios (falsos positivos). Para combinaciones de sondas, se aplicaron puntos de corte a cada locus objetivo de forma independiente. Si alguno de los locus a los que se dirigía la combinación de sondas, era positivo para el punto de corte respectivo, entonces la muestra se consideró positiva. El parámetro "distancia del ideal" (DFI), que incorpora tanto la sensibilidad como la especificidad, se usó para evaluar el rendimiento relativo de cada sonda o combinación de sondas. DFI se define como $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$. DFI es 0 para un ensayo con un rendimiento del 100% de sensibilidad y 100% de especificidad y aumenta a 1,414 para un ensayo con 0% de especificidad y 0% de sensibilidad.

La complementación de las sondas se evaluó mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores DFI para todas las combinaciones posibles de sondas, hasta combinaciones de cuatro sondas, a lo largo de una amplia gama de valores de corte. Solo se usaron sondas que proporcionaban valores de p menores de 0,05 en el análisis de discriminación (tabla 4), en estos cálculos con el fin de reducir la probabilidad de que valores de DFI bajos fueran el resultado de la combinación de eventos aleatorios, y para reducir el tiempo de cálculo. Los valores de corte se calcularon entre 0 y 100% de células anormales en incrementos de 1% para cada sonda individual. Dado que cada sonda en una combinación puede tener un valor de corte óptimo diferente, los valores de corte variaban independientemente para cada sonda en una combinación particular. La variación independiente de los valores de corte entre 0 y 100% e incrementos de 1% de células no era práctica para las combinaciones de sondas, por lo que se calcularon primero los valores de corte basados en las desviaciones estándar del porcentaje medio de células anormales para cada locus y cada grupo de diagnóstico. Los valores de corte se generaron como $x + n*s$, donde x y s son la media y la desviación estándar para un locus particular en el grupo de muestras de control (x y s para DBG se usaron para distinguir AE + DAG, y x y s para MI se usaron para distinguir DBG), y n es un multiplicador típicamente en el intervalo de -1 a 5 en incrementos de 0,2. Se calculó el valor de corte para las combinaciones de sondas usando x y s para cada sonda en la combinación de forma individual, pero usando el mismo valor de n. Este procedimiento proporcionó valores de corte ajustados a cada sonda, basándose en el nivel de anomalía y el grado de variación en el grupo de control. Para una primera aproximación, basándose en valores de corte en x y múltiplos comunes de s, se establece una especificidad similar con respecto al grupo de control para cada sonda en la combinación de un conjunto particular de valores de corte (suponiendo una distribución normal del porcentaje de células anormales dentro del grupo de control). Las sondas y combinaciones de sondas en cada valor de corte o conjunto de valores de corte se ordenaron de menor a mayor DFI, con el fin de identificar los mejores rendimientos. Los valores de corte óptimos para las combinaciones de sondas con mejor rendimiento (valores DFI más bajos) se refinaron adicionalmente mediante puntos de corte que variaban independientemente en incrementos de 1% de células anormales que flanqueaban los puntos de corte óptimos establecidos empleando x y s del grupo de muestras de control.

Las gráficas de rendimiento diagnóstico (*Receiver Operator Characteristics*, ROC) se generaron por representación gráfica de la sensibilidad frente a 1 - especificidad para una sonda particular o una combinación de sondas en el intervalo de valores de corte examinados (véase antes). Puesto que los valores de corte variados de forma independiente en las combinaciones de sondas generan múltiples valores de sensibilidad para cada valor de especificidad, solo se representó el mayor valor de sensibilidad en cada valor de especificidad, lo que representaba la combinación óptima de valores de corte para cada especificidad. El rendimiento relativo de una sonda o una combinación de sondas se pudo evaluar a partir de estas curvas por las áreas bajo las curvas (mejor rendimiento indicado por áreas mayores) o por la distancia más cercana de aproximación al punto (0,1) en la gráfica (100% de especificidad, 100% de sensibilidad). Obsérvese que la distancia de cualquier punto en las curvas al punto (0, 1) es igual al valor de DFI, y las combinaciones de sondas con valores más bajos de DFI tienen mejor rendimiento que las que tienen valores más altos de DFI. Los valores de corte de células asociados con valores más bajos de DFI, se pueden utilizar a continuación como base para establecer valores de corte óptimos del ensayo, a pesar de que se pueden seleccionar puntos en la curva ROC con valores de DFI algo inferiores, después de considerar la importancia clínica relativa de la sensibilidad y la especificidad. Por ejemplo, se podría elegir un punto en la curva con una sensibilidad ligeramente superior, pero menor especificidad, frente a otro punto en la curva que tiene una sensibilidad menor y especificidad mayor, dependiendo de la necesidad médica.

Resultados

Análisis de discriminación

La capacidad de cada sonda FISH para discriminar entre el grupo de pacientes que tienen DBG, DAG y AE y los pacientes que no tienen estas anomalías (es decir, los pacientes con diagnóstico "normal" o MI) se examinó inicialmente comparando la frecuencia de células anormales (no disómicas) dentro de cada categoría histológica. La tabla 2 indica el número de muestras evaluadas (N), el porcentaje medio de células con ganancia o pérdida y la desviación estándar del porcentaje de células con ganancia o pérdida para cada locus y la proporción de locus dentro del grupo de muestras normales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada una de las

5 categorías histológicas, pero por razones de brevedad, solo se indican los valores para DAG en la tabla 3. La tabla 3 también muestra los VD y valores de p, cantidades que reflejan la capacidad de las sondas particulares o proporciones de sondas para diferenciar entre muestras de DAG y normales. Los VD y valores de p para todos los grupos histológicos en comparación con el grupo de muestras normales se indican en la tabla 4. Los VD y valores de p eran compatibles porque los valores de p inferiores estaban acompañados por VD mayores. Las entradas de NA en la tabla 4 para VD y los valores de p indican que la media del grupo de diagnóstico era menor que la del grupo normal.

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

SONDA	Conjunto de muestras de DGA									
	N	Porcentaje medio de células con ganancia	DE - Porcentaje de células con ganancia	VD - Ganancia	Valor de p - Ganancia	Porcentaje medio de células con pérdida	DE - Porcentaje de células con pérdida	VD - Pérdida	Valor de p - Pérdida	
5p15	66	9,69	21,26	0,20	<0,01	5,52	10,91	0,11	0,01	
5q21-22	66	5,45	11,46	0,20	<0,01	5,27	10,29	0,08	0,04	
CEP 7	67	17,08	26,03	0,41	<0,01	2,27	1,84	0,01	0,49	
7p12	67	17,40	25,85	0,42	<0,01	1,99	2,30	<0,01	0,65	
8q24.12-13	67	21,64	27,44	0,59	<0,01	1,63	1,65	0,01	0,54	
CEP 9	66	7,79	15,34	0,25	<0,01	4,33	8,44	0,04	0,13	
9p21	66	1,95	3,48	0,14	<0,01	27,20	30,26	0,61	<0,01	
CEP 17	67	9,85	19,29	0,25	<0,01	5,72	4,33	0,01	0,43	
17p13.1	67	1,56	2,34	0,13	0,01	12,82	16,46	0,23	<0,01	
17q11.2-12	67	14,99	23,88	0,35	<0,01	3,08	3,27	0,04	0,17	
20q13	67	18,18	24,84	0,49	<0,01	1,85	1,82	0,01	0,62	
CEP Y	62	2,03	10,45	0,03	0,22	27,39	31,64	0,64	<0,01	
5p15/5q21-22	66	9,82	19,58	0,15	<0,01	4,90	10,64	0,08	0,03	
7p12/CEP 7	67	3,68	3,92	0,18	<0,01	2,86	4,79	0,07	0,05	
9p21/CEP 9	66	2,08	2,28	0,08	0,06	26,69	30,16	0,59	<0,01	
17p13.1/CEP 17	67	4,06	2,91	<0,01	0,67	18,95	23,81	0,42	<0,01	
17q11.2-12/CEP17	67	11,99	15,53	0,18	<0,01	3,86	3,63	0,01	0,45	
17q11.2-12/17p13.1	67	24,15	26,80	0,52	<0,01	2,41	1,84	0,18	0,01	

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

SONDA	Muestras de MI			Muestras de DBG			Muestras de DAG			Muestras de AE							
	VD, ganancia	p, ganancia	VD, pérdida	p, ganancia	VD, pérdida	p, pérdida	VD, ganancia	p, ganancia	VD, pérdida	p, pérdida	VD, ganancia	p, ganancia	VD, pérdida	p, pérdida			
5p15	0,12	0,08	<0,01	0,94	0,27	0,02	<0,01	0,74	0,20	0,20	<0,01	0,11	0,01	0,45	0,02	0,08	0,26
5q21-22	0,03	0,35	N/A	N/A	0,07	0,20 -	N/A	N/A	0,20	0,20	<0,01	0,08	0,04	0,43	0,02	0,31	0,03
CEP 7	0,23	0,02	<0,01	0,62	0,08	0,19	0,05	0,25	0,41	0,41	<0,01	<0,01	0,49	0,52	0,01	0,03	0,44
7p12	0,12	0,08	0,04	0,31	0,08	0,19	0,04	0,31	0,42	0,42	<0,01	<0,01	0,65	0,70	<0,01	N/A	N/A
8q24.12-13	0,11	0,08	0,12	0,07	0,09	0,16	0,02	0,50	0,59	0,59	<0,01	N/A	N/A	0,54	<0,01	0,06	0,29
CEP 9	0,06	0,20	N/A	N/A	0,09	0,16	N/A	N/A	0,25	0,25	<0,01	0,04	0,13	0,49	0,01	N/A	N/A
9p21	<0,01	1,00	0,15	0,05	0,05	0,26	0,49	<0,01	0,14	0,14	<0,01	0,61	<0,01	0,28	0,05	0,51	0,01
CEP 17	0,17	0,05	0,02	0,45	0,06	0,24	0,04	0,31	0,25	0,25	<0,01	0,01	0,43	0,72	<0,01	N/A	N/A
17p13.1	<0,01	0,96	0,06	0,22	<0,01	0,71	0,06	0,25	0,13	0,13	<0,01	0,23	<0,01	0,26	0,06	0,15	0,14
17q 11.2-12	N/A	N/A	<0,01	0,75	0,06	0,26	N/A	N/A	0,35	0,35	<0,01	N/A	N/A	0,69	<0,01	N/A	N/A
20q13	0,10	0,10	0,09	0,12	0,09	0,17	<0,01	0,89	0,49	0,49	<0,01	<0,01	0,62	0,54	<0,01	N/A	N/A
CEP Y	0,04	0,33	0,05	0,28	N/A	N/A	0,19	0,08	0,03	0,03	0,22	0,64	<0,01	0,06	0,35	0,83	<0,01
5p/5q	<0,01	0,98	N/A	N/A	N/A	N/A	0,04	0,32	0,15	0,15	<0,01	0,08	0,03	0,41	0,02	0,04	0,44
7p/CEP7	0,03	0,41	<0,01	0,79	0,01	0,57	N/A	N/A	0,18	0,18	<0,01	0,07	0,05	0,25	0,07	N/A	N/A
9p/CEP9	N/A	N/A	0,15	0,05	N/A	N/A	0,48	<0,01	N/A	N/A	N/A	0,59	<0,01	N/A	N/A	0,60	<0,01
17p/CEP17	0,01	0,58	0,09	0,14	0,02	0,47	0,13	0,09	N/A	N/A	N/A	0,42	<0,01	N/A	N/A	0,51	0,01
17q/CEP17	0,02	0,51	0,04	0,31	0,10	0,13	<0,01	0,62	0,18	0,18	<0,01	0,01	0,45	0,40	0,02	N/A	N/A
17q/17p	0,06	0,24	<0,01	0,74	0,11	0,12	N/A	N/A	0,52	0,52	<0,01	N/A	N/A	0,54	<0,01	N/A	N/A

- Los valores de p que figuran en la tabla 4 indican que las ganancias de los centrómeros de los cromosomas 7 y 17 se producen en un porcentaje de células significativamente mayor en muestras de MI que en las muestras normales. Además, la pérdida del locus 9p21 se produce en un porcentaje de células significativamente mayor para muestras de MI que para las muestras normales. Para las muestras de DBG, la pérdida del locus 9p21, medida ya sea por el número de señales por célula o por la relación respecto al número de señales CEP 9, era significativa. Valores de p menores y VD mayores para las muestras de DBG, en comparación con las muestras de MI, indican que la pérdida del locus 9p21 puede distinguir mejor las muestras de DBG que las muestras de MI de las muestras normales. La ganancia del locus 5p15 era significativamente más frecuente en el grupo de muestras de DBG que en el grupo de muestras normales.
- 5 El número de locus anormales era considerablemente mayor para las muestras de DAG que para muestras de MI o DBG (tablas 3 y 4), mostrando todos los locus individuales y las relaciones de locus, ganancias significativamente elevadas en relación con el grupo normal, excepto para CEP Y y las relaciones de 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17. Niveles significativamente más elevados de pérdida eran evidentes para 5p15, 5q21-22, 9p21, 17p13.1, CEP Y, 5p15/5q21-22, 7p12/CEP 7, 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17.
- 10 De manera similar a las muestras de DAG, muchas muestras de AE (tabla 4) mostraron un aumento significativo de los porcentajes de células con ganancia, en relación con las muestras normales, incluyendo todos los locus y relaciones de locus analizados excepto 17p13.1, CEP Y, 7p12/CEP 7, 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17. Se encontró un aumento significativo de los porcentajes de células con pérdida para 5q21-22, 9p21, CEP Y, 9p21/CEP 9 y 17p13.1/CEP 17.
- 15 Anomalía frente a evolución histológica
- Las figuras 1A y 1B muestran el porcentaje medio de células que presentan ganancias o pérdidas, respectivamente en cada locus o relación de locus para cada categoría histológica. Para un locus particular o relación de locus, los porcentajes medios de células con ganancia de locus, normalmente aumentaban con la evolución de normal a AE, teniendo lugar los aumentos máximos en las transiciones de DBG a DAG y DAG a AE. Las únicas desviaciones claras de esta tendencia fueron ganancia de CEP Y y las relaciones de 9p/CEP 9 y 17p/CEP 17. El mayor aumento en el número de células que mostraba ganancia de CEP Y se produjo en la transición de normal a MI, mientras que el nivel de ganancia era bastante insensible al estadio histológico para las relaciones de 9p/CEP 9 y 17p/CEP 17.
- 20 El aumento más señalado en los porcentajes de células con ganancia de locus ocurrió generalmente en la transición de DBG a DAG. Esto era cierto para 5p15, CEP 7, 7p12, 8q24, CEP 9, CEP 17, 17q, 20q, 5p/5q y 17q/17p. Para 9p21, 17p, 7p/CEP 7 y 17q/CEP 17 el mayor aumento en el porcentaje de células que mostraban ganancia llegó con la evolución de DAG a AE, mientras que CEP Y era el único locus que mostraba el mayor aumento en la transición de normal a MI.
- 25 Solo 9p21, 17p, CEP Y, 9p/CEP 9 y 17p/CEP 17 mostraron claramente aumento de los niveles de pérdida con la evolución de la categoría histológica de normal a AE. Para 9p21 y su relación con CEP 9, el aumento más acusado en el porcentaje de células que mostraban estas anomalías, se observó en la transición de MI a DBG, mientras que para 17p, 17p/CEP 17 y CEP Y el mayor aumento fue en la transición de DBG a DAG.
- 30 Valores de las sensibilidades, especificidades y DFI para sondas individuales
- Se calcularon las sensibilidades, especificidades y los valores de DFI para sondas individuales en un intervalo de valores de corte. Para los grupos combinados de AE y DAG frente a los grupos de normal a DBG, los mejores valores de DFI (es decir, los valores más bajos de DFI) se obtuvieron por pérdida de CEP Y y ganancia de 8q24.12-13, 17q11.2-12, CEP 17, 7p12 y 20q13. De estas sondas, la pérdida de CEP Y y la ganancia de 8q24.12-13, 7p12 y 20q13 se identificaron consecuentemente por los diferentes métodos de evaluación del rendimiento de una sonda individual, en lo que se refiere a la transición de DBG a DAG. Además, las ganancias de 17q11.2-12, 17q11.2-12/CEP 17 y 17q11.2-12/17p12, todas destacaron con los diferentes métodos de análisis.
- 35 Un análisis similar para el grupo de DBG frente a los grupos normal y MI combinados, puso de manifiesto los mejores valores de DFI (es decir, los valores más bajos de DFI) para 9p21, 9p21/CEP 9, 5p15, CEP Y y CEP 17, así como la ganancia de 8q24.12-13 y 20q13. De estas sondas, 9p21 y 9p21/CEP 9 y en menor medida 5p15, se identificaron consecuentemente por los diferentes métodos de evaluación del rendimiento de sondas individuales, en lo que se refiere a la transición de MI a DBG.
- 40 Análisis de complementación
- Con el fin de determinar qué sondas funcionan mejor en combinación, se realizó un análisis de complementación. Se calcularon las sensibilidades, especificidades y los valores de DFI para todas las posibles combinaciones de sondas para cada una de las categorías de diagnóstico. Se analizaron combinaciones de hasta 4 sondas, ya que cuatro sondas se combinan fácilmente en un conjunto de sondas multicolor, adecuado para ver a través del microscopio (marcadores que emiten luz visible). En el análisis inicial, se generaron valores de corte como la media más múltiplos (n) de las desviaciones estándar de los porcentajes de células con ganancia o pérdida del grupo menos anormal de los dos grupos de muestras que se estaban comparando (por ejemplo, muestras de normal + MI cuando
- 45
- 50
- 55

se comparaban con muestras de DBG). La tabla 5A indica las combinaciones con mejor rendimiento de 4 sondas basadas en la DFI de los grupos de adenocarcinoma + DAG, en relación con los grupos de normal + MI + DBG con los valores correspondientes de n, DFI, sensibilidad y especificidad. La tabla 6A indica las combinaciones con mejor rendimiento de 4 sondas basadas en la DFI del grupo de DBG frente a los grupos de normal + MI. Las tablas 5C y 6C indican combinaciones de cuatro sondas y sus respectivos valores de DFI para DBG frente a normal + MI (meta), DAG frente a normal + MI + DBG, AE frente a normal + MI + DBG + DAG, y AE + DAG frente a normal + MI + DBG.

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

Curvas de rendimiento diagnóstico

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

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

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

Sonda 1	Sonda 2	Sonda 3	Sonda 4	C/O n	MI		DBG		DAG		AE		AE + DAG		DFI frente a norm-LGD	DFI frente a norm-LGD
					N	sens	N	sens	N	sens	N	sens	N	sens		
ganancia 20q	ganancia CEP 9	ganancia 7p	ganancia 5q	-0,2	28	0,29	23	0,30	67	0,81	16	0,94	83	0,83	0,20	0,28
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia CEP 9	ganancia 5p	0,0	26	0,15	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,25	0,29
pérdida 17p	ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 5p	0,0	26	0,19	23	0,30	67	0,73	16	0,94	83	0,77	0,24	0,29
ganancia CEP 9	ganancia 8q	ganancia 7p	ganancia 5q	-0,2	28	0,29	23	0,43	67	0,81	16	0,94	83	0,83	0,18	0,30
ganancia CEP 9	ganancia 7p	ganancia 5q	ganancia 5p	-0,2	28	0,29	23	0,35	67	0,76	17	0,88	84	0,79	0,22	0,30
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia 5q	ganancia 5p	0,0	26	0,15	23	0,30	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,26	0,30
pérdida 17p	ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 9p	0,2	25	0,08	23	0,30	67	0,70	15	0,93	82	0,74	0,29	0,31
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia CEP 17	ganancia 5p	0,0	26	0,19	23	0,35	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,26	0,31
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia 8q	ganancia 5p	0,0	26	0,27	23	0,30	67	0,73	16	0,94	83	0,77	0,24	0,31
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia 7p	ganancia 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,25	0,31
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia CEP 7	ganancia 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,25	0,31
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 8q	ganancia 5p	0,0	26	0,27	23	0,30	67	0,72	16	0,94	83	0,76	0,24	0,31
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 9p	ganancia 8q	0,0	25	0,20	23	0,26	67	0,73	15	0,93	82	0,77	0,29	0,31
pérdida 17p	ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 9p	0,0	25	0,16	23	0,30	67	0,75	15	0,93	82	0,78	0,30	0,31
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 7p	ganancia 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,26	0,31
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia CEP 7	ganancia 5p	0,0	26	0,23	23	0,30	67	0,70	16	0,94	83	0,75	0,26	0,31

ES 2 644 641 T3

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

Sondas				Valores de corte del porcentajes de células				Rendimiento		
1	2	3	4	Sonda 1	Sonda 2	Sonda 3	Sonda 4	sens	espec frente a norm-LGD	DFI frente a norm-LGD
ganancia 20q	ganancia CEP 9	ganancia 7p	ganancia 5q	11	1	2	1	0,82	0,81	0,26
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia CEP 9	ganancia 5p	14	4	4	1	0,76	0,85	0,28
pérdida 17p	ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 5p	13	14	4	1	0,77	0,84	0,28
ganancia CEP 9	ganancia 8q	ganancia 7p	ganancia 5q	1	3	2	2	0,81	0,80	0,28
ganancia CEP 9	ganancia 7p	ganancia 5q	ganancia 5p	1	2	1	2	0,79	0,81	0,28
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia 5q	ganancia 5p	15	4	2	1	0,76	0,85	0,28
pérdida 17p	ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 9p	15	12	4	1	0,78	0,83	0,28
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia CEP 17	ganancia 5p	15	4	10	1	0,75	0,85	0,29
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia 8q	ganancia 5p	15	7	3	1	0,81	0,79	0,28
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia 7p	ganancia 5p	17	6	2	1	0,80	0,79	0,29
pérdida 17p	ganancia 17q	ganancia CEP 7	ganancia 5p	15	4	17	1	0,76	0,84	0,29
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 8q	ganancia 5p	12	7	3	1	0,80	0,79	0,29
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 9p	ganancia 8q	15	7	1	3	0,80	0,79	0,29
pérdida 17p	ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 9p	15	12	4	1	0,78	0,83	0,28
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia 7p	ganancia 5p	11	10	2	1	0,80	0,79	0,29
ganancia 20q	ganancia 17q	ganancia CEP 7	ganancia 5p	14	4	14	1	0,84	0,75	0,30

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

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

ES 2 644 641 T3

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

Sondas				Valores de corte del porcentaje de células				Rendimiento		
1	2	3	4	Sonda 1	Sonda 2	Sonda 3	Sonda 4	sens	espec frente a norm-IM	DFI frente a norm-IM
pérdida 9p	pérdida CEP Y	ganancia CEP 9	pérdida CEP 7	14	13	1	4	0,80	0,80	0,29
pérdida CEP Y	pérdida 9p	pérdida CEP 7	ganancia 5q	13	13	4	2	0,75	0,82	0,31
pérdida CEP Y	pérdida 17q	pérdida 9p	pérdida CEP 7	4	6	12	4	0,75	0,76	0,35
pérdida CEP Y	ganancia 20q	pérdida 9p	pérdida CEP 7							
pérdida CEP Y	pérdida 9p	pérdida 7p	pérdida CEP 7							
pérdida CEP Y	pérdida 9p	ganancia 8q	pérdida CEP 7							
ganancia 20q	ganancia 17g	pérdida 9p	ganancia 8q	1	6	12	7	0,70	0,73	0,41

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

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

Casos positivos anticipados

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

Ejemplo 2

Detección de cáncer de esófago

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

Recogida de células

Un tubo de centrifuga de 50 ml y un tubo de microcentrifuga de 1,8 ml se marcaron con identificadores de pacientes apropiados. El recipiente de la muestra (recipiente de solución PreservCyt® que contenía el cepillo esofágico) se agitó vigorosamente de forma manual para volver a suspender las células. La solución en el recipiente de la muestra se transfirió al tubo de centrifuga de 50 ml, asegurándose de dejar el cepillo citológico en el recipiente de la muestra. Se añadieron 20 ml de fijador metanol:ácido acético 3:1 al recipiente de la muestra. El contenido del recipiente de la muestra (fijador y cepillo) después se transfirieron a una placa Petri. El cepillo se raspó manualmente con un escalpelo en el fijador y la solución en la placa Petri después se puso de nuevo en el recipiente de la muestra. El cepillo se descartó. Después, la solución en el recipiente de la muestra se transfirió al tubo de 50 ml marcado. Se añadieron 10 ml de fijador metanol:ácido acético 3:1 al recipiente de la muestra. El recipiente de la muestra se agitó fuertemente manualmente para eliminar cualquier célula residual y se transfirió al tubo de 50 ml. El recipiente de la muestra se descartó.

La solución en el tubo de 50 ml se centrifugó a 800 g durante ocho minutos. Todo menos aproximadamente 5 ml del material sobrenadante se eliminó por aspiración con vacío. Se añadieron 10 ml de metanol:ácido acético 3:1 al tubo de 50 ml y el sedimento celular se volvió a suspender suavemente. Después, la solución se centrifugó a 300 g durante ocho minutos. El material sobrenadante después se aspiró, asegurándose de dejar aproximadamente 2 ml de la solución en la parte superior del sedimento. El sedimento se volvió a suspender de nuevo. La muestra se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,8 ml marcado previamente, usando una pipeta desechable y se almacenó a 4°C. Para la conservación a largo plazo, la muestra se almacenó en el mismo tubo de microcentrífuga de 1,8 ml a -70°C, asegurándose de que el tubo se llenaba hasta la parte superior con fijador metanol:ácido acético 3:1 antes del almacenamiento.

5

10 Preparación de portaobjetos

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

15

20

Pretratamiento

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

25

Desnaturalización/hibridación

Se colocaron 4 µl de la mezcla de sondas en el anillo impreso sobre el portaobjetos que contenía las células a las que se iban a hibridar las sondas. Un cubreobjetos circular de 12 mm se colocó sobre la zona de la hibridación y después los bordes del cubreobjetos se sellaron con un reborde continuo de pegamento de caucho. El portaobjetos se colocó en un sistema de desnaturalización/hibridación HyBrite® y los canales se llenaron con agua. Los portaobjetos se calentaron a 73°C durante tres minutos y luego se mantuvieron a 37°C durante un mínimo de ocho horas.

30

35

Lavado y contratinción

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

40

45

Análisis

Se puso una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos directamente encima del anillo hibridado. Los portaobjetos se evaluaron con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros para ver la contratinción DAPI, los fluoróforos Spectrum-Red/Spectrum-Green®, Spectrum-Red®, Spectrum-Green®, Spectrum-Aqua® y Spectrum-Gold®. Se realizó una exploración inicial rápida del portaobjetos para evaluar la calidad de la señal y para determinar si la hibridación había tenido éxito. El portaobjetos se analizó después al microscopio empezando en un borde del anillo de hibridación y procediendo de una manera sistemática hacia el extremo opuesto del anillo, usando un objetivo de 40x o 63x (figura 5). Después, los patrones de las señales para cada una de las cuatro sondas (p. ej., 8q24, 9p21, 17q11, 20q13) se registraron para 100 células consecutivas no escamosas, no inflamatorias. En los casos en los que solo se observaban células escamosas, se contaron los patrones de señales en estas células, asegurándose de que solo se observaban células escamosas. Si se observan cinco o más células con polisomía (es

50

55

decir, ganancias de dos o más de las cuatro sondas) en el recuento inicial de 100 células, no se requiere un análisis adicional. Sin embargo, si se observan menos de cinco células con polisomía, se puede hacer el barrido del resto del portaobjetos en busca de células que tienen características morfológicas nucleares sospechosas de neoplasia (p. ej., agrandamiento nuclear, irregularidad nuclear, tinción moteada de la cromatina) y los patrones de señales de esas células se registraron indicando que se habían observado mediante barrido y no como parte del recuento de 100 células. Obsérvese que este proceso de barrido es esencialmente idéntico al descrito en las patentes de EE.UU. nº 6.376.188 y 6.17468.

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

10 Criterios para el diagnóstico.

Las muestras se consideraron positivas si cumplían los siguientes criterios:

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

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

Paciente 1

30 Los resultados del recuento de 100 células para este paciente se muestran a continuación (tabla 7). Las células con patrones de señales anormales (es decir, células cuyos patrones de señales no mostraban dos copias para cada una de las cuatro sondas) se muestran primero. Los resultados del recuento ponen de manifiesto que 41 de las células (las 41 primeras mostradas en la tabla) presentaban polisomía (es decir, ganancias de dos o más de las cuatro sondas). Las 59 células restantes se consideraron normales. Las dos células (células 42 y 43) que no tenían el patrón normal esperado de dos señales por locus, no se consideraron anormales ya que no se alcanzó el valor de corte para este tipo de anomalía. Esta muestra del paciente se consideró positiva para tumor y los resultados son más acordes con el diagnóstico de DAG/AE.

Tabla 7 - Muestra de paciente considerada positiva para DGA/AE

Célula	n° de señales				Célula	n° de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	4	6	5	7	51	2	2	2	2
2	4	6	5	8	52	2	2	2	2
3	4	5	4	8	53	2	2	2	2
4	4	5	5	8	54	2	2	2	2
5	4	4	5	8	55	2	2	2	2
6	4	4	5	8	56	2	2	2	2
7	3	4	5	6	57	2	2	2	2
8	3	3	5	6	58	2	2	2	2
9	3	3	6	5	59	2	2	2	2
10	3	5	4	6	60	2	2	2	2
11	3	5	4	6	61	2	2	2	2
12	3	5	4	6	62	2	2	2	2
13	3	4	4	6	63	2	2	2	2
14	3	4	4	5	64	2	2	2	2
15	3	4	4	5	65	2	2	2	2
16	3	4	4	5	66	2	2	2	2
17	3	4	4	5	67	2	2	2	2
18	3	4	4	5	68	2	2	2	2
19	3	4	4	4	69	2	2	2	2
20	2	4	4	6	70	2	2	2	2
21	3	3	4	6	71	2	2	2	2
22	3	3	4	6	72	2	2	2	2
23	3	3	4	6	73	2	2	2	2
24	3	3	4	6	74	2	2	2	2
25	3	3	4	6	75	2	2	2	2
26	3	3	4	6	76	2	2	2	2
27	3	3	4	5	77	2	2	2	2
28	3	2	4	6	78	2	2	2	2
29	3	2	4	6	79	2	2	2	2
30	3	2	4	6	80	2	2	2	2
31	3	2	4	4	81	2	2	2	2
32	2	2	3	6	82	2	2	2	2
33	2	2	4	6	83	2	2	2	2
34	2	2	4	4	84	2	2	2	2
35	2	2	4	4	85	2	2	2	2
36	1	2	4	4	86	2	2	2	2
37	1	2	4	4	87	2	2	2	2
38	1	2	4	4	88	2	2	2	2
39	1	2	4	4	89	2	2	2	2
40	2	2	3	5	90	2	2	2	2
41	2	2	4	4	91	2	2	2	2
42	1	2	2	2	92	2	2	2	2
43	2	1	2	2	93	2	2	2	2
44	2	2	2	2	94	2	2	2	2
45	2	2	2	2	95	2	2	2	2
46	2	2	2	2	96	2	2	2	2
47	2	2	2	2	97	2	2	2	2
48	2	2	2	2	98	2	2	2	2
49	2	2	2	2	99	2	2	2	2
50	2	2	2	2	100	2	2	2	2

* Las células polisómicas están en negrita

5 Paciente 2

Los resultados del recuento de 100 células para este paciente se muestran a continuación (tabla 8). Las células con

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

5 Tabla 8 - Muestra de paciente considerada positiva para DGA/AE

Célula	nº de señales				Célula	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	1	2	5	2	51	2	2	2	2
2	1	2	4	2	52	2	2	2	2
3	2	2	4	2	53	2	2	2	2
4	2	2	4	2	54	2	2	2	2
5	1	2	3	2	55	2	2	2	2
6	2	1	3	2	56	2	2	2	2
7	2	2	3	2	57	2	2	2	2
8	2	2	3	2	58	2	2	2	2
9	2	2	3	2	59	2	2	2	2
10	2	2	3	2	60	2	2	2	2
11	2	2	3	2	61	2	2	2	2
12	2	2	3	2	62	2	2	2	2
13	2	2	3	2	63	2	2	2	2
14	2	2	3	2	64	2	2	2	2
15	2	2	3	2	65	2	2	2	2
16	2	2	3	2	66	2	2	2	2
17	2	2	3	2	67	2	2	2	2
18	2	2	3	2	68	2	2	2	2
19	2	2	3	2	69	2	2	2	2
20	2	2	3	2	70	2	2	2	2
21	2	2	3	2	71	2	2	2	2
22	2	2	3	2	72	2	2	2	2
23	2	2	3	2	73	2	2	2	2
24	2	2	2	2	74	2	2	2	2
25	2	2	2	2	75	2	2	2	2
26	2	2	2	2	76	2	2	2	2
27	2	2	2	2	77	2	2	2	2
28	2	2	2	2	78	2	2	2	2
29	2	2	2	2	79	2	2	2	2
30	2	2	2	2	80	2	2	2	2
31	2	2	2	2	81	2	2	2	2
32	2	2	2	2	82	2	2	2	2
33	2	2	2	2	83	2	2	2	2
34	2	2	2	2	84	2	2	2	2
35	2	2	2	2	85	2	2	2	2
36	2	2	2	2	86	2	2	2	2
37	2	2	2	2	87	2	2	2	2
38	2	2	2	2	88	2	2	2	2
39	2	2	2	2	89	2	2	2	2
40	2	2	2	2	90	2	2	2	2
41	2	2	2	2	91	2	2	2	2
42	2	2	2	2	92	2	2	2	2
43	2	2	2	2	93	2	2	2	2
44	2	2	2	2	94	2	2	2	2
45	2	2	2	2	95	2	2	2	2
46	2	2	2	2	96	2	2	2	2
47	2	2	2	2	97	2	2	2	2
48	2	2	2	2	98	2	2	2	2
49	2	2	2	2	99	2	2	2	2
50	2	2	2	2	100	2	2	2	2

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

10 Paciente 3

Los resultados del recuento de 100 células para este paciente se muestran a continuación (tabla 9). Las células con

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

Tabla 9 - Muestra de paciente considerada positiva para DBG

Célula	n° de señales				Célula	n° de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	0	1	2	2	51	1	2	2	2
2	0	2	2	2	52	1	2	2	2
3	0	2	2	2	53	2	2	1	2
4	0	2	2	2	54	2	2	2	2
5	0	2	2	2	55	2	2	2	2
6	0	2	2	2	56	2	2	2	2
7	0	2	2	2	57	2	2	2	2
8	0	2	2	2	58	2	2	2	2
9	0	2	2	2	59	2	2	2	2
10	0	2	2	2	60	2	2	2	2
11	0	2	2	2	61	2	2	2	2
12	0	2	2	2	62	2	2	2	2
13	0	2	2	2	63	2	2	2	2
14	0	2	2	2	64	2	2	2	2
15	0	2	2	2	65	2	2	2	2
16	1	1	2	2	66	2	2	2	2
17	1	2	1	2	67	2	2	2	2
18	1	2	2	2	68	2	2	2	2
19	1	2	2	2	69	2	2	2	2
20	1	2	2	2	70	2	2	2	2
21	1	2	2	2	71	2	2	2	2
22	1	2	2	2	72	2	2	2	2
23	1	2	2	2	73	2	2	2	2
24	1	2	2	2	74	2	2	2	2
25	1	2	2	2	75	2	2	2	2
26	1	2	2	2	76	2	2	2	2
27	1	2	2	2	77	2	2	2	2
28	1	2	2	2	78	2	2	2	2
29	1	2	2	2	79	2	2	2	2
30	1	2	2	2	80	2	2	2	2
31	1	2	2	2	81	2	2	2	2
32	1	2	2	2	82	2	2	2	2
33	1	2	2	2	83	2	2	2	2
34	1	2	2	2	84	2	2	2	2
35	1	2	2	2	85	2	2	2	2
36	1	2	2	2	86	2	2	2	2
37	1	2	2	2	87	2	2	2	2
38	1	2	2	2	88	2	2	2	2
39	1	2	2	2	89	2	2	2	2
40	1	2	2	2	90	2	2	2	2
41	1	2	2	2	91	2	2	2	2
42	1	2	2	2	92	2	2	2	2
43	1	2	2	2	93	2	2	2	2
44	1	2	2	2	94	2	2	2	2
45	1	2	2	2	95	2	2	2	2
46	1	2	2	2	96	2	2	2	2
47	1	2	2	2	97	2	2	2	2
48	1	2	2	2	98	2	2	2	2
49	1	2	2	2	99	2	2	2	2
50	1	2	2	2	100	2	2	2	2

10

* Las células con una pérdida de la sonda 9p21 están en negrita.

Paciente 4

5 Los resultados del recuento de 100 células para este paciente se muestran a continuación (tabla 10). Las células con patrones de señales anormales (es decir, células cuyos patrones de señales no mostraban dos copias para cada una de las cuatro sondas) se muestran primero. Los resultados del recuento muestran tres células (células 1-3) que no tenían el patrón normal esperado de dos señales por locus, sin embargo estas células no fueron consideradas anormales, ya que no se alcanzó al valor de corte para ninguna anomalía. Esta muestra del paciente se consideró negativa.

Tabla 10 - Muestra de paciente considerada negativa

10

Célula	nº de señales				Célula	nº de señales			
	9p21	17q11	8q24	20q13		9p21	17q11	8q24	20q13
1	1	1	2	2	51	2	2	2	2
2	2	1	2	2	52	2	2	2	2
3	2	2	2	1	53	2	2	2	2
4	2	2	2	2	54	2	2	2	2
5	2	2	2	2	55	2	2	2	2
6	2	2	2	2	56	2	2	2	2
7	2	2	2	2	57	2	2	2	2
8	2	2	2	2	58	2	2	2	2
9	2	2	2	2	59	2	2	2	2
10	2	2	2	2	60	2	2	2	2
11	2	2	2	2	61	2	2	2	2
12	2	2	2	2	62	2	2	2	2
13	2	2	2	2	63	2	2	2	2
14	2	2	2	2	64	2	2	2	2
15	2	2	2	2	65	2	2	2	2
16	2	2	2	2	66	2	2	2	2
17	2	2	2	2	67	2	2	2	2
18	2	2	2	2	68	2	2	2	2
19	2	2	2	2	69	2	2	2	2
20	2	2	2	2	70	2	2	2	2
21	2	2	2	2	71	2	2	2	2
22	2	2	2	2	72	2	2	2	2
23	2	2	2	2	73	2	2	2	2
24	2	2	2	2	74	2	2	2	2
25	2	2	2	2	75	2	2	2	2
26	2	2	2	2	76	2	2	2	2
27	2	2	2	2	77	2	2	2	2
28	2	2	2	2	78	2	2	2	2
29	2	2	2	2	79	2	2	2	2
30	2	2	2	2	80	2	2	2	2
31	2	2	2	2	81	2	2	2	2
32	2	2	2	2	82	2	2	2	2
33	2	2	2	2	83	2	2	2	2
34	2	2	2	2	84	2	2	2	2
35	2	2	2	2	85	2	2	2	2
36	2	2	2	2	86	2	2	2	2
37	2	2	2	2	87	2	2	2	2
38	2	2	2	2	88	2	2	2	2
39	2	2	2	2	89	2	2	2	2
40	2	2	2	2	90	2	2	2	2
41	2	2	2	2	91	2	2	2	2
42	2	2	2	2	92	2	2	2	2
43	2	2	2	2	93	2	2	2	2
44	2	2	2	2	94	2	2	2	2
45	2	2	2	2	95	2	2	2	2
46	2	2	2	2	96	2	2	2	2
47	2	2	2	2	97	2	2	2	2
48	2	2	2	2	98	2	2	2	2
49	2	2	2	2	99	2	2	2	2
50	2	2	2	2	100	2	2	2	2

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para determinar la evolución histológica de normal a un adenocarcinoma de esófago en un sujeto, comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células del esófago del sujeto con un conjunto de tres o más sondas cromosómicas, en condiciones para la hibridación específica de las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, en donde dichas sondas en dicho conjunto de sondas detectan ganancias o pérdidas, y se seleccionan del siguiente conjunto de sondas:
- i) una sonda específica del locus 8q24, una sonda específica del locus 20q13, una sonda específica del locus 17q11.2-12 y una sonda específica del locus 9p21;
- 10 en donde el conjunto de tres o más sondas cromosómicas contiene una sonda específica de locus para 20q13; y
- b) detectar un patrón de hibridación de las ganancias o pérdidas para el conjunto de sondas cromosómicas en la muestra biológica, en donde el patrón de hibridación es indicativo de la mayor probabilidad del desarrollo de un carcinoma de esófago o lesión precursora en el sujeto, comparado con un sujeto sin el patrón de hibridación detectado.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra biológica comprende células obtenidas de una muestra seleccionada del grupo que consiste en una biopsia, una muestra citológica y una muestra extirpada.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la muestra biológica comprende un espécimen citológico por cepillado.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las sondas cromosómicas están marcadas con fluorescencia.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al sujeto se la ha diagnosticado una afección seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad por reflujo gastroesofágico crónica y esófago de Barrett.
- 25 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra biológica está insertada en parafina.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el patrón de hibridación se detecta en células de la muestra biológica que se preseleccionan basándose en anomalías en el tamaño nuclear, forma nuclear o tinción nuclear.

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

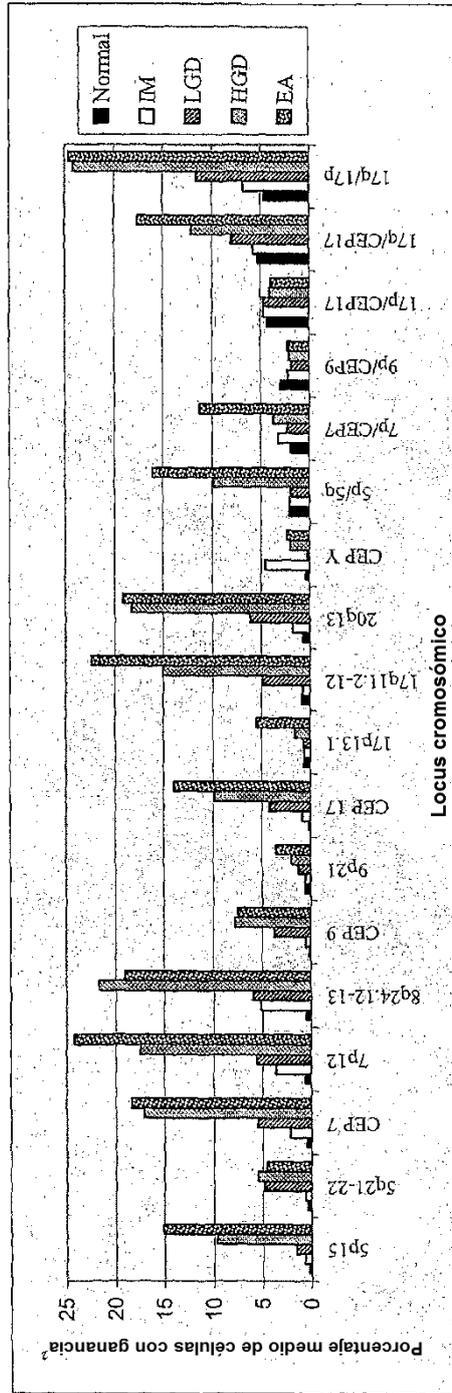


FIG. 1A

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

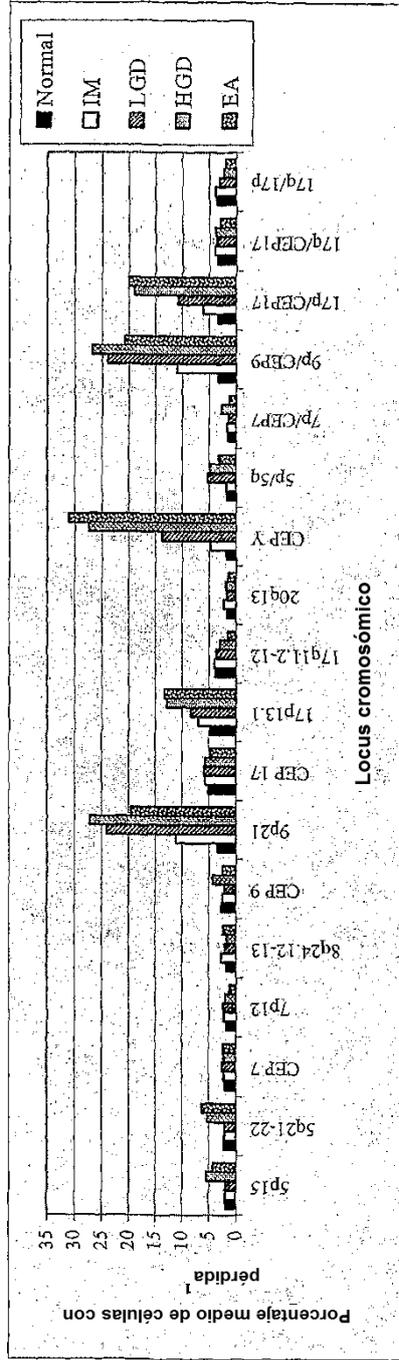


FIG. 1B

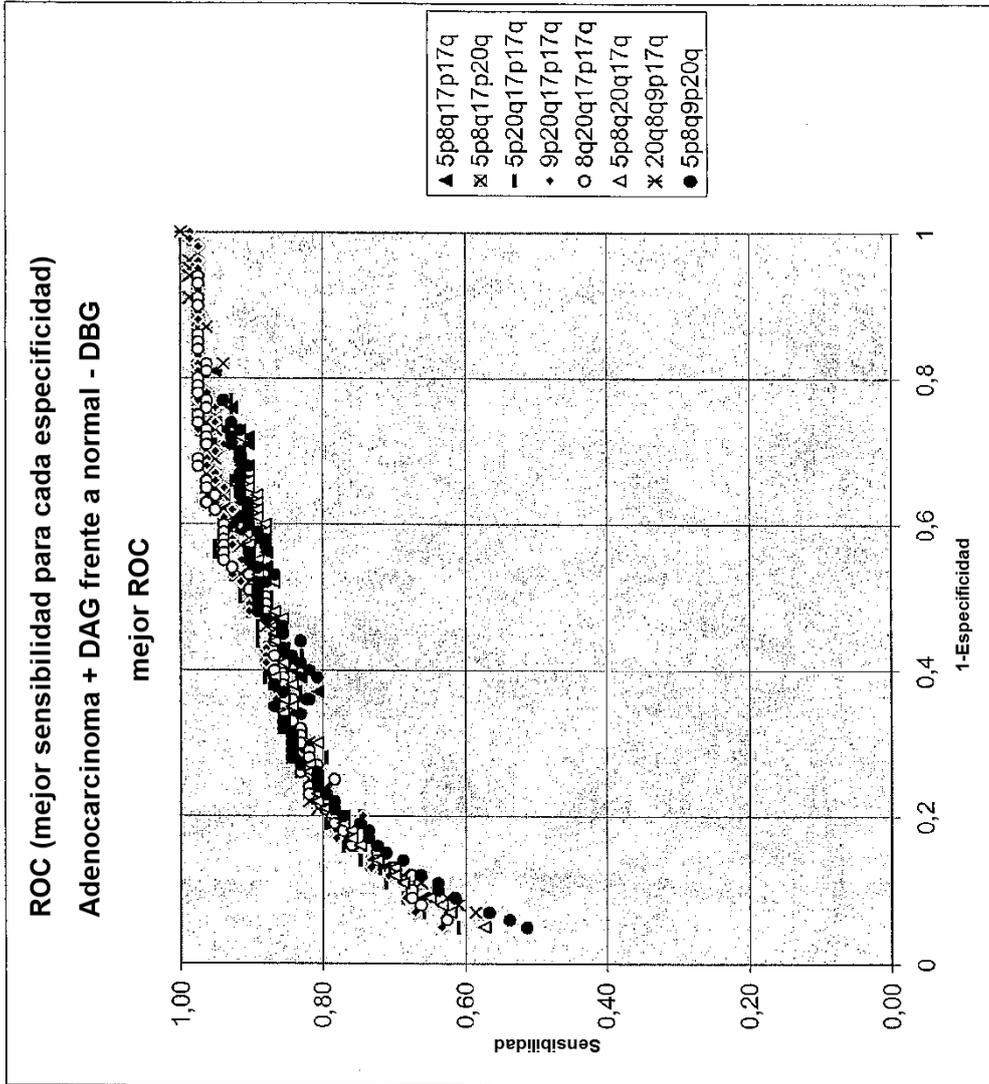


FIG. 2

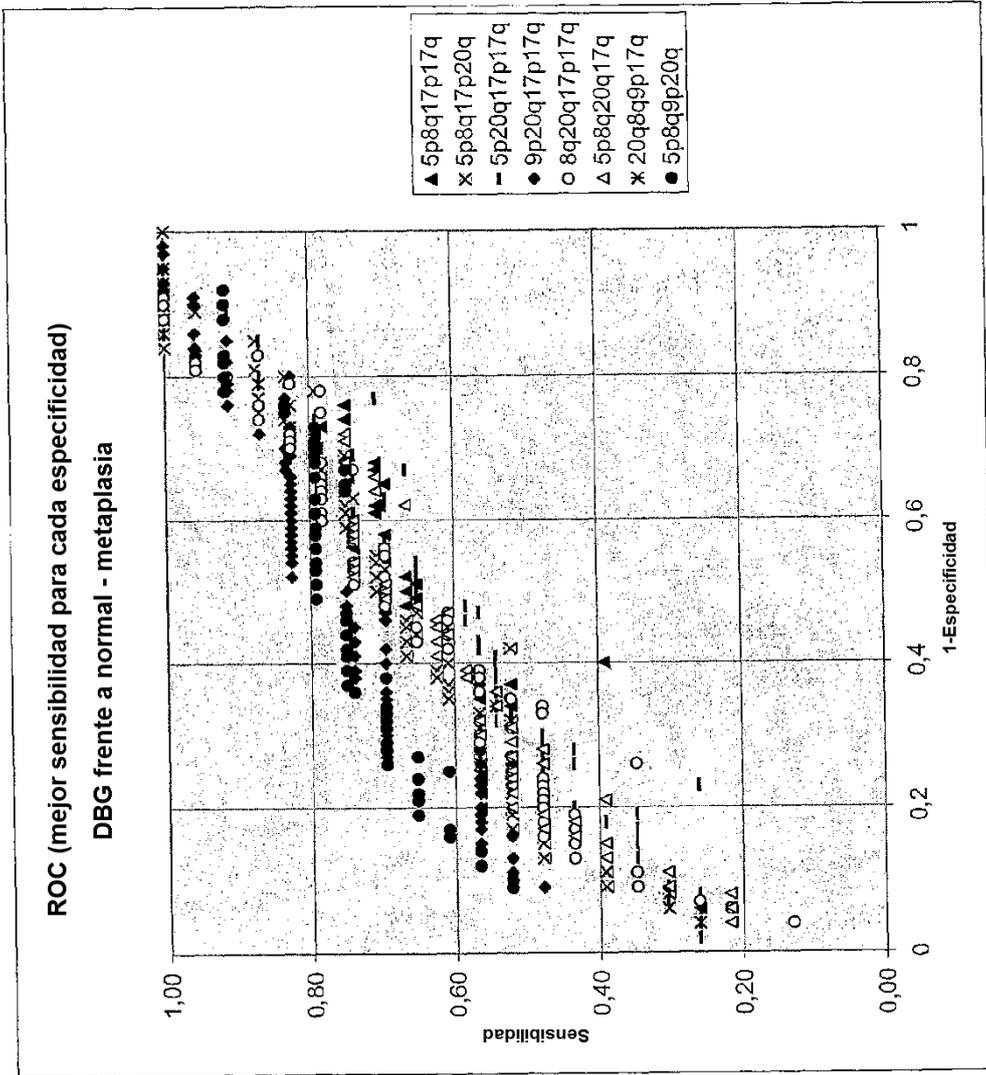


FIG. 3

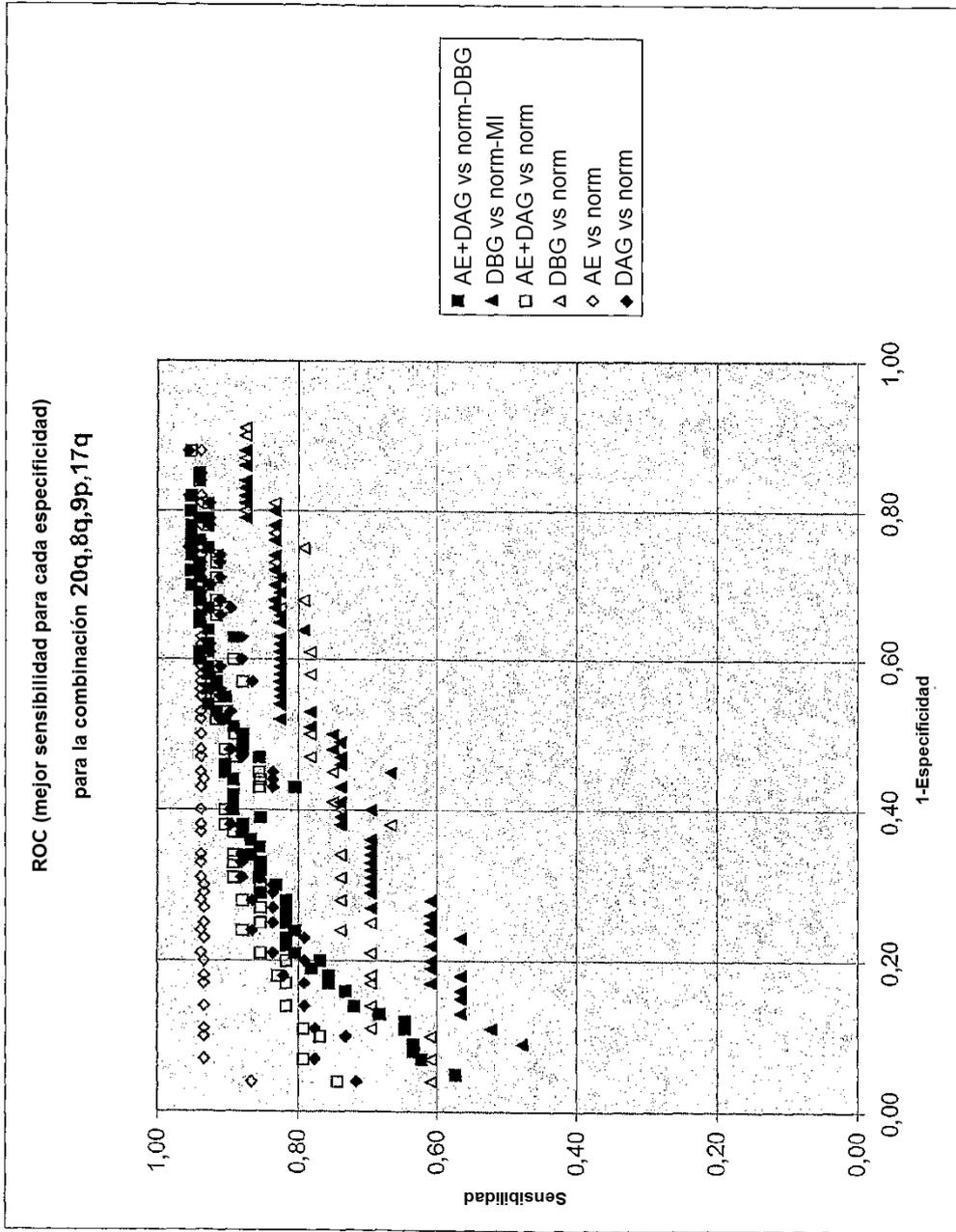
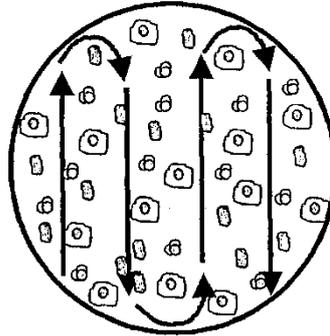


FIG. 4



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

FIG. 5