



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 334 866**

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **98946419 .3**

⑨6 Fecha de presentación : **24.08.1998**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1007740**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2000**

⑤4 Título: **Procedimiento para la caracterización de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas.**

③0 Prioridad: **22.08.1997 DE 197 36 691**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2010

⑦3 Titular/es: **Michael Giesing**
Zum Herzfeld 5
49536 Lienen, DE

⑦2 Inventor/es: **Giesing, Michael;**
Austrup, Frank;
Driesel, Gerhard;
Eder, Claudine;
Feifel, Nico;
Holewa, Beatrix;
Suchy, Bernhard y
Uciechowski, Peter

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento para la caracterización de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la caracterización de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas mediante análisis de ácidos nucleicos y al uso de este procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de cáncer y para otros fines.

10 El diagnóstico del cáncer en el ser humano representa al igual que antes uno de los mayores desafíos de la medicina actual. Los procedimientos de diagnóstico corrientes permiten el reconocimiento de tumores de tipo canceroso que a continuación deberán denominarse en conjunto tumores (sarcomas, carcinomas, neoplasias sistémicas hematológicas), frecuentemente sólo cuando el tumor ya ha alcanzado un estadio avanzado. A pesar de los considerables avances en los procedimientos de obtención de imágenes, a su aplicación satisfactoria siempre se le supone un cierto tamaño mínimo del tumor. Además, con los procedimientos de este tipo, dado el caso, sólo se obtiene muy poca información
15 secundaria sobre el tipo y la constitución del tumor. Por tanto, los procedimientos de obtención de imágenes que requieren mucho tiempo y de costes extremadamente altos sólo sirven generalmente como ayudas para la orientación para el otro procedimiento, frecuentemente directo, generalmente una extracción de tejido. Pero esta última medida significa una intervención invasiva en el cuerpo del paciente que, dependiendo de la localización y constitución del tumor, puede ser muy desagradable e incluso peligrosa para el paciente.

20 Si mediante una extracción de tejido tal se identifica un tumor, normalmente siguen otras investigaciones que deberán describir, por ejemplo, el potencial de diseminación, es decir, la formación de metástasis de este tumor.

25 Si se diagnostica, por ejemplo, cáncer de mama, de la paciente afectada se extirpan generalmente de 20 a 30 ganglios linfáticos y se determina el número de ganglios linfáticos que presentan células cancerosas. La opinión prevaleciente se basa en que la posibilidad de supervivencia de una paciente disminuye al aumentar el número de ganglios linfáticos afectados. No obstante, los hallazgos más recientes indican que la aparición de tales metástasis de los ganglios linfáticos es más bien una medida de la edad que de la malignidad o el potencial de metastatización del tumor.

30 Como consecuencia del desarrollo avanzado de procedimientos de biología molecular y el creciente conocimiento sobre las bases genéticas de la degeneración celular, en los últimos años se han abierto nuevos caminos para diagnosticar cáncer. Se partió de que las células cancerosas expresan marcadores característicos debido a los cuales deberán diferenciarse de células no degeneradas y así identificarse como células cancerosas. Con el desarrollo de la técnica del hibridoma y el cultivo así hecho posible de anticuerpos monoclonales se diseñó una pluralidad de inmunoensayos que
35 deberán contribuir al diagnóstico del cáncer mediante la detección de determinados marcadores. Ejemplos de tales marcadores son el antígeno carcinoembrionario (CEA), la α -fetoproteína (AFP) o el antígeno prostático específico (PSA). En el documento EP 0 747 705 se propuso recientemente investigar sólo la glicofoma de 90 kDa de un grupo estructuralmente asociado a CEA de proteínas (NCA) en la sangre ya que aparentemente sólo esta glicofoma se libera al torrente sanguíneo. El documento WO 96/21862 especifica que la medición de la concentración de A-proteína en la sangre permitiría el diagnóstico de cáncer, pero también establece que las esperanzas depositadas en los marcadores
40 investigados hasta la fecha, como CEA, AFP o PSA, no se han cumplido. Otros procedimientos basados en la detección inmunológica de determinadas proteínas se describen, por ejemplo, en los documentos DE 195 00 723; WO 97/26271; WO 97/28186; WO 96/01907; US 5.633.142; US 5.620.848; US 5.589.579; y US 5.563.247. No obstante, un diagnóstico fiable de cáncer no parece ser posible de esta forma al menos en este momento.

45 Por el contrario, otros equipos de investigadores se han concentrado en el análisis del material genético de células cancerosas. Así, el documento WO 93/04200 propone para estimar una predisposición para cáncer de mama aislar ADN de una muestra de sangre de la paciente, restringir este ADN de determinada forma y, debido al patrón de restricción, hacer un diagnóstico correspondiente. No obstante, con este procedimiento no es posible una detección de células tumorales en la sangre.

55 El documento WO 96/02671 describe además un procedimiento con el que se investiga ADN genómico o ADNc de tejido neoplásico, sangre u otro fluido corporal solo mediante análisis de secuencias (secuenciación o hibridación) para mutaciones de un gen que codifica una proteína cuya alteración de la función está relacionada con cáncer. En los documentos WO 97/26271; WO 97/28186; WO 96/15262; WO 96/01907; WO 93/22456; US 5.620.848; US 5.149.628 y WO 96/21021 se informa de enfoques similares.

60 También se ha propuesto reiteradamente investigar el ADN y/o ARN presente libre en el plasma sanguíneo para mutaciones o deleciones oncógenas, mutaciones o deleciones de genes supresores de tumores o modificaciones del patrón de microsatélites (véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/16792; DE 37 21 400; DE 37 17 212; y WO 93/22456).

65 Finalmente, el documento WO 94/10343 también describe un procedimiento para el diagnóstico de cáncer, concretamente para reconocer micrometástasis de cáncer de próstata investigando el ARN de la sangre de un paciente que codifica el antígeno prostático específico. No obstante, en este procedimiento se obtienen en aproximadamente dos tercios de los casos las denominadas respuestas positivas falsas ya que las inflamaciones o lesiones de la próstata también aumentan la concentración de la proteína en la sangre. Por otra parte, debido a las insuficiencias de la prue-

ba, supuestamente el 30% de las enfermedades cancerosas quedan sin detectar al igual que antes. En el documento US 5.601.990 se elige una manera de proceder similar para el diagnóstico de cáncer de intestino metastatizante. El documento WO 96/35808 se ocupa de la detección de una proteína (hCRG). El documento WO 96/17080 describe la detección de tumores y/o su metastatización mediante la detección de CK20. El procedimiento descrito en Noguchi, S. y col., Cancer, tomo 74, n° 5, 1994, páginas 1595-1600, se basa en la amplificación de ARNm de MUC1. Pittman, K. y col., Annals of Oncology, tomo 7, 1996, páginas 297-301 y van der Velde-Zimmermann, D. y col., American Journal of Pathology, tomo 149, n° 3, 1996, páginas 759-764, recurren al ARNm de tirosinasa para la detección de las células de melanoma en circulación. En Burchill, S. A. y col., British Journal of Cancer, tomo 71, 1995, páginas 278-281, se expone que el ARNm de CK20 podría servir posiblemente para la detección de células tumorales metastatizadas de origen epitelial, mientras que CK8 y CK19 no serían adecuadas para esto. El documento WO 97/07242 trata procedimientos inmunológicos y el documento WO 97/07242 describe una RT-PCR en PSA.

En Pantel, K. y Rietmüller, G., Onkologie, tomo 18, 1995, páginas 394-401, se toman cartas en los análisis de PCR específicos para mutaciones (Ki-ras y p53), así como en los planteamientos de RT-PCR para la detección de los denominados antígenos específicos para tejidos (CK19, CEA, PSA, PSM). Mientras que los análisis específicos para mutaciones se aplican a tumores primarios, los análisis de RT-PCR también deberán utilizarse en muestras de sangre. No obstante, cada uno de los marcadores de ARNm específicos para epitelio considerados se trata por sí mismo y sin referencia a otros. Jung, R. y col., European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, tomo 35, n° 1, 1997, páginas 3-10, tratan distintos trabajos originales que se basan respectivamente en análisis de RT-PCR individuales. Schmitz-Dräger, B. J. y col., World Journal of Urology, tomo 14, 1996, páginas 190-196, agrupan distintos planteamientos de otros grupos de trabajo que analizan tumores primarios y de éstos derivan factores relevantes para la metastatización.

El documento WO 96/29430 describe un procedimiento denominado "ensayo de marcadores múltiples" ("Multiple Marker Assay") para detectar metástasis de melanoma o de cáncer de mama con el que se investiga más de 1 parámetro. Además, no obstante se utiliza exclusivamente la metodología de RT-PCR para la detección de ARNm que normalmente no están presentes en el fluido corporal investigado. Así, por ejemplo, el recubrimiento de Buffy se obtiene a partir de sangre y se investiga correspondientemente. Pelkey, J. P. y col., Clinical Chemistry, tomo 42, 1996, páginas 1369-1381, en tanto que se excede la analítica de parámetros individuales, sólo tratan el trabajo basado en el documento WO 96/29430.

Resumiendo, por tanto, puede establecerse que el estado de la técnica no permite ningún diagnóstico fiable del cáncer.

Por tanto, la presente invención se basa en el objetivo de lograr un procedimiento *in vitro* con el que pueden reconocerse y valorarse de forma fiable y con suficiente exactitud todas las formas de cáncer de mamíferos y especialmente de seres humanos, también para pacientes individuales, y que haga posible seguir el progreso de una terapia contra el cáncer adecuada. El procedimiento deberá hacer posible además probar principios activos para una acción antineoplásica.

Este objetivo se alcanza según la invención mediante un procedimiento para la caracterización de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas mediante analítica de ácidos nucleicos en el que

- i) las células obtenidas a partir del fluido corporal de un individuo se investigan para por lo menos un ARNm de un primer gen específico para cáncer; y
 - ii) las células cancerosas separadas a partir del fluido corporal de un individuo se investigan para por lo menos un ADN o ARNm de un segundo gen específico para cáncer o asociado a cáncer y la misma investigación se realiza con células no cancerosas del mismo individuo para la comparación,
- siendo distintos el primer y el segundo gen.

Por caracterización se entiende según la invención todas las medidas que pueden realizarse en células de mamíferos y especialmente de seres humanos para registrar cualitativa o cuantitativamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, 6 a 10, 11 a 20 o más genes específicos para cáncer y/o asociados a cáncer de estas células. Debido a los resultados obtenidos por la caracterización, luego puede realizarse la identificación de las células. Esto comprende según la invención no sólo la detección cualitativa de las células cancerosas en circulación, sino que también puede incluir su cuantificación y/o información sobre su procedencia y comportamiento, por ejemplo, en lo referente a la formación de metástasis o en las conductas terapéuticas más distintas, por ejemplo citotóxicas.

A las células cancerosas en circulación pertenecen según la invención sobre todo aquellas células cancerosas que se han desprendido del tumor primario, es decir, células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas. A continuación se habla de células cancerosas en circulación con el fin de simplificación. Como la diseminación de estas células depende generalmente de la vascularización del tumor primario, las células cancerosas en circulación pueden encontrarse especialmente en la sangre, siendo también adecuados médula ósea y ganglios linfáticos. Correspondientemente, según la invención se investigan fluidos corporales como sangre, linfa, orina, médula ósea y distintos fluidos de irrigación de órganos como lavado bronquial, fluido de irrigación pancreático o de la vejiga.

Según la invención se diferencia entre genes específicos para cáncer y asociados a cáncer. Específico para cáncer en el sentido según la invención son aquellos genes mediante los cuales una célula cancerosa en circulación puede reconocerse como tal. Por el contrario, los genes asociados a cáncer no son específicos para células cancerosas. También pueden expresarse en células sanas o en una pluralidad de otras enfermedades distintas, por ejemplo, inflamaciones. No obstante, su expresión puede modularse de forma característica en células cancerosas en comparación con células no cancerosas de manera que son posibles otras conclusiones sobre el tipo y el comportamiento de las células cancerosas.

En este sentido, naturalmente también es posible que un gen determinado pueda contribuir a la caracterización tanto específica para cáncer como asociada a cáncer. Por ejemplo, un gen puede presentar una mutación que conduce a la expresión anómala de una proteína reguladora del ciclo celular y por consiguiente a la degeneración de la célula afectada. Por tanto, este gen mutado es específico para cáncer y la investigación según la invención para la detección de este gen mutado sirve para la caracterización específica para cáncer. Además, un análisis de la expresión anómala de este gen también puede contribuir a la caracterización asociada a cáncer ya que el tipo o la cantidad de productos de expresión correspondientes son importantes para el ciclo celular y de esta manera son posibles otras conclusiones sobre el tipo y el comportamiento de las células cancerosas.

La investigación de genes específicos para cáncer y asociados a cáncer puede realizarse en cualquier forma concebible para el experto. Así puede investigarse un gen según la invención al nivel del ADN, al nivel del ARN y/o al nivel de las proteínas. Al nivel del ADN se investiga preferiblemente ADN genómico para mutaciones, amplificaciones, LOH, translocaciones y/o polimorfismos. Al nivel del ARN y al nivel de las proteínas se investigan productos de expresión, concretamente preferiblemente productos de transcripción como ARNm o productos de traducción como proteínas. Se prefieren procedimientos con cuya ayuda puede evaluarse la participación de un gen en el estado de células en circulación en el momento de la investigación, por ejemplo, la investigación de ARNm especialmente en cuanto a la cantidad presente en una célula de un ARNm determinado. Si el procedimiento según la invención incluye una investigación de un fluido corporal para proteínas, entonces se trata especialmente de aquellas que son expresadas por los genes específicos para cáncer y/o asociados a cáncer. A continuación, siempre y cuando no se especifique otra cosa, se habla en conjunto de una investigación o análisis de los genes según la invención.

Los genes específicos citados en la siguiente descripción se denominan frecuentemente con abreviaturas o códigos que normalmente se usan y, por tanto, con conocidos para el experto. Además, para aclaración puede remitirse al glosario adjunto al final de la presente descripción.

A los genes específicos para cáncer según la invención pertenecen especialmente dos clases de genes que desempeñan una función esencial en la carcinogénesis: oncogenes, que se forman mediante la mutación de los denominados proto-oncogenes, y los genes supresores de tumores mutados. Ambos dirigen en su forma normal el ciclo vital de una célula: los proto-oncogenes promueven el crecimiento celular, los genes supresores de tumores lo inhiben. Los oncogenes son favorecedores del cáncer ya que estimulan a la célula para una proliferación excesiva, mientras que los genes supresores de tumores contribuyen luego a la carcinogénesis, si se inactivan mediante mutación, y como consecuencia la célula pierde un inhibidor del crecimiento por lo que normalmente se previene una proliferación inadecuada. Los oncogenes codifican, por ejemplo, factores de crecimiento y sus receptores, proteínas señal, factores de transcripción y una pluralidad de otras proteínas de las que algunas desempeñan una función importante, por ejemplo, en la apoptosis. A los oncogenes pertenecen, por ejemplo, genes como la familia de bcl-2, mdm2, c-abl, la familia de myc, por ejemplo c-, N-, R-, L- y B-myc, la familia de ras, por ejemplo, H-, K- y N-ras, erb-B2, que también se llama neu, erb-B, PDGF, RET y oncogenes virales de distintos virus tumorales como papovavirus, por ejemplo virus SV40, del poliovirus y papiloma como HPV, adenovirus, determinados herpesvirus, poxvirus, virus de la hepatitis B (gen HBx), virus de la hepatitis C, HTLV-1, transcrito de fusión E1A en adenovirus, transcritos de fusión E6 y E7 en HPV y EBV en el linfoma de Burkitt.

Según la invención, los oncogenes preferidos son genes de la familia de ras, erb-B2, erb-B, c-myc, mdm2, bcl-2, virus de la hepatitis B (gen HBx), virus de la hepatitis C, HTLV1, transcrito de fusión E1A en adenovirus, transcritos de fusión E6 y E7 en HPV y EBV en el linfoma de Burkitt. Se prefieren muy especialmente c-myc, k-ras y erb-B2.

A los genes supresores de tumores pertenecen, por ejemplo, los genes de la familia de APC (FAP), DCC, DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, RB, p53, WT1, BRCA1, BRCA2, VHL, MSH2, MLH1 y WAF1.

Según la invención, los genes supresores de tumores preferidos son p53, RB, APC, DCC, BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1 y WAF1. Se prefieren muy especialmente p53, RB, APC, DCC y DPC4.

A los genes específicos para cáncer también pertenecen, además de los oncogenes y los genes supresores de tumores mutados anteriores, genes que están desactivados en células no cancerosas en los fluidos corporales investigados según la invención, es decir, no se expresan o sólo en cantidades insignificantes. Por tanto, si se detectan productos de transcripción y/o de traducción de estos genes en un fluido corporal, por ejemplo, sangre, esto indica la presencia de células cancerosas en circulación en el fluido corporal afectado.

A éstos pertenecen, por ejemplo, hCG, hTG, calcitonina, albúmina, proteínas tensioactivas, telomerasa, distintas translocaciones, Stat5a, variantes de receptores esteroideos (ER, AR), receptor de progesterona, distintos genes que presentan una LOH, CEA, PSM, PSA, AFP, tirosinasa, MAGE3, Muc18, MUC1, citoqueratina, especialmente CK20 y CK19, investigaciones de LOH en distintas secciones de cromosomas mediante numerosos microsatélites, hormona del

tracto gastrointestinal como motilina, enteroglucagón, GIP, gastrina, CCK o PYY, y neurotensina. Según la invención se prefieren CEA, PSM, MUC1 (variante de corte y empalme específica para tumores), AFP, citoqueratina, tirosinasa, MAGE3, MUC18, variantes de corte y empalme específicas para tumores del receptor de estrógeno y andrógeno, y EGP.

A los genes de este tipo también pertenecen los genes específicos para tejidos citados más adelante que, debido a su especificidad por tejidos, contribuyen a la caracterización asociada a cáncer según la invención, pero que, debido a la particularidad del objeto de investigación, concretamente células cancerosas en circulación en un fluido corporal desprendidas del tumor primario, también puede recurrirse a la caracterización específica para cáncer.

Además, también puede recurrirse a oncoproteínas pronósticas como anti- p53, pan p53, p53 o c-erb-B2 para la investigación específica para cáncer.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, un fluido corporal se investiga para por lo menos un gen específico para cáncer y por lo menos un gen asociado a cáncer. Además, adicionalmente se investigan células obtenidas a partir del fluido corporal de un individuo para por lo menos un gen asociado a cáncer que esencialmente no se expresa en células no cancerosas del fluido corporal investigado; y/o adicionalmente se investigan células cancerosas separadas a partir del fluido corporal de un individuo para por lo menos un gen asociado a cáncer y la misma investigación se realiza con células no cancerosas del mismo individuo para la comparación.

Los genes asociados a cáncer según la invención comprenden un amplio espectro de funciones. Especialmente son adecuados genes específicos para tejidos, es decir, genes organotípicos (morfogenes) que proporcionan información sobre la procedencia de las células cancerosas en circulación de manera que puede deducirse la localización del tumor primario, la fuente de diseminación; genes que caracterizan la capacidad de metastatización de células cancerosas; genes que codifican receptores de hormonas esteroideas de manera que son posibles informaciones sobre el estado del receptor de las células cancerosas; genes de quimiorresistencia; o genes cuya expresión guarda una relación con la modulación de la respuesta inmunitaria, así como con la proliferación celular y la apoptosis de células cancerosas en circulación. La expresión de estos genes asociados a cáncer puede modularse de forma característica en células cancerosas de manera que el patrón de expresión resultante también pueda dar una indicación de cáncer.

Los genes específicos para tejidos asociados a cáncer codifican frecuentemente marcadores organotípicos, es decir, proteínas o antígenos, debido a los cuales puede deducirse la procedencia de la célula que expresa el gen. A éstos pertenecen, por ejemplo, genes específicos para el hígado como albúmina o AFP; específicos para la próstata como AR, PSM, hK2 o PSA; específicos para mama, ovario y/o cuello de útero como β -hCG, AR, PR, SCCA-1, maspina o BA46; específicos para colorrectal como CCK, enteroglucagón, GIP, gastrina, motilina o PYY; específicos para el páncreas como PYY; específicos para melanoma como MAGE1, MAGE3, Muc18 o tirosinasa; específicos para glándulas tiroideas como hTG; específicos para los pulmones como SF, SF-R, proteínas tensioactivas, por ejemplo SP-A y SP-C, CC10, N-CoR o RAR β 2; específicos para la vejiga como EGF-R y β -hCG; específicos para el endometrio como SCCA.

Para la caracterización específica para tejidos también puede recurrirse a oncogenes y/o genes supresores de tumores mutados cuando indican determinadas formas de cáncer. Ejemplos de éstos son mutaciones asociadas a tumores como translocación 14;18 (bcl-2) para linfomas, translocación 9;22 (BCR/ABL) para leucemias mieloides crónicas, translocación 15;11 para leucemias no linfocíticas agudas, translocación 2;13 (PAX3-FKHR) y translocación 1;13 (PAX7-FKHR) para rhabdomyosarcomas alveolares, translocación 11;22 para sarcomas de Ewing, translocación 12;16 para liposarcomas mixoides, translocación x;18 para sarcomas sinoviales; BRCA-1 y BRCA-2 para carcinomas de mama, DPC-4 para carcinomas de páncreas, erb-B para glioblastomas, MLH-1 y MSH-2 para CCHNP (cáncer de colon hereditario no polipósico "hereditary nonpolyposis colon cancer"), NF-2 para neurofibromatosis-1, NF-1 para neurofibromatosis, RET para carcinomas de las glándulas tiroideas, RB para retinoblastomas, VHL para carcinomas de riñón, WT-1 para tumores de riñón y k-ras para carcinomas de colon.

La caracterización de la capacidad de metastatización de células cancerosas en circulación ocupa una posición especial según la invención. Para este fin, las células se investigan especialmente para genes que codifican factores de angiogénesis, de crecimiento y de motilidad, factores de degradación de la matriz como proteasas y sus inhibidores, o factores de adhesión, como adherinas.

A los factores de angiogénesis pertenecen, por ejemplo, aFGF y bFGF, así como sus receptores aFGF-R y bFGF-R, VEGF y sus receptores VEGF-R1 y VEGF-R2, así como GD-AIF.

A los factores de crecimiento pertenecen, por ejemplo, TGF- α y TGF- β , IGF, IGF-BP3, erb-B (EGF-R), PDGF y EGF.

A los factores de motilidad estimulantes de la migración pertenecen, por ejemplo, el factor de dispersión SF-L y su receptor SF-R (c-met).

Las proteasas y sus inhibidores comprenden, por ejemplo, hidrolasas de matriz como MMP (metaloproteasas de matriz), MT-MMP, UPA (activador de plasminógeno tipo urocinasa) o sus inhibidores, como PAI1 y PAI2 (inhibidor del activador de plasminógeno) o TIMP (inhibidores de tejido de metaloproteasas).

A las adherinas pertenecen proteínas de adhesión como cadherinas, por ejemplo E-cadherina, cateninas, por ejemplo β -catenina, selectinas, por ejemplo E-, P- y L-selectina, así como sus receptores, CD44 (variantes estándar y de corte y empalme), integrinas e ICAM.

5 Según la invención, los genes preferidos para la caracterización de la capacidad de metastatización son factores de angiogénesis (bFGF y bFGF-R; VEGF y VEGF-R), proteasas (UPA; PAI; MMP; TIMP), adherinas (E-cadherina; α -catenina; β -catenina; selectina-L y -R; CD44), factores de motilidad SF-L y c-met y el supresor de metástasis nm23.

10 De los genes receptores de hormonas esteroideas se utilizan según la invención preferiblemente los genes que codifican el receptor de estrógeno, progesterona o andrógeno (ER, PR o AR).

15 La caracterización de genes de quimiorresistencia de células cancerosas en circulación también es según la invención de gran importancia ya que las células cancerosas son frecuentemente resistentes a fármacos, en parte también son determinadas terapias contra el cáncer, ejemplos de tales genes de quimiorresistencia son MDR1, que codifica la P-glicoproteína, nm23, hMLH1, gp170, MRP1, el gen de la topoisomerasa, el gen de glutatión-S-transferasa-pi, el gen LRP y los genes que codifican α - o β -tubulina.

20 Los genes de quimiorresistencia preferiblemente investigados según la invención son MDR1, MRP1, el gen de la topoisomerasa II, el gen LRP, el gen de β -tubulina y el gen de glutatión-S-transferasa-pi.

25 Para la caracterización de una modulación de la respuesta inmunitaria puede servir, por ejemplo, la evaluación de la citotoxicidad mediada por células T y NK y/o la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Para este fin pueden investigarse células efectoras inmunológicas, especialmente células NK, H1/TH2 y CD8, por una parte, y células cancerosas en circulación, por otra parte, por ejemplo, para el gen de TNF- α (factor de necrosis tumoral), genes que codifican interferones, por ejemplo α - y γ -IFN, genes de ligandos de FAS y receptores de FAS, perforina, bcl-2, bax y granzimas. Se prefieren FAS-R y FAS-L, perforina y granzimas.

30 Las propiedades de proliferación y apoptosis de células cancerosas en circulación se investigan según la invención mediante genes que guardan relación con el estado de proliferación y apoptosis de células, especialmente de células cancerosas. Además, entre otros también pertenecen algunos de los oncogenes o proto-oncogenes anteriormente mencionados y genes supresores de tumores o genes supresores de tumores mutados que, además de la caracterización específica para cáncer, también pueden contribuir a la caracterización asociada a cáncer debido a su patrón de expresión. Según la invención se recurre, por ejemplo, a p53, genes activados (Bax; FAS-L y -R; ciclinas A, B1, D1, D2, D3, E o G; GADD45; GD-AIF; HIC1; IGF-BP3; mdm2; p21) e inactivados (bcl-2; c-myc; bFGF, c-fos; HSP70; IL-6; MDR1; PCNA) transcripcionalmente de forma específica para secuencias por p53, genes expresados al inicio de la apoptosis y de la parada del ciclo celular (aparte de p53, TNF- α , TNF-R1, TNF-R2, DPC-4, IFN- γ y FAS-L y -R), así como genes que se presentan en el crecimiento sin regular como erb-B2, EGF y otros factores de crecimiento autocrinos (TGF- α ; PDGF). Se prefieren Bax, FAS, ciclinas, mdm2, p21, p16, bcl-2, c-myc, FGF, MDR1, TNF- α , IFN- γ , erb-B2, EGF y otros factores de crecimiento autocrinos.

45 Para la investigación biológica de tumores, es decir, para la caracterización de una modulación de la respuesta inmunitaria, de las propiedades de proliferación y apoptosis se investigan preferiblemente ciclinas, especialmente las ciclinas B1, D1 y E, Ki67, FAS-L, FAS-R, bax y/o bcl-2.

50 La investigación según la invención de fluidos corporales se realiza mediante análisis de ácidos nucleicos. A éstos pertenecen, por ejemplo, investigaciones de ADN o ARN, especialmente ARNm, con ayuda de técnicas que son conocidas para el experto como técnicas de secuenciación, técnicas de hibridación, por ejemplo, transferencia de Northern o Southern, hibridación en microchips, especialmente procedimientos que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también técnicas en las que el ADN o ARN que va a investigarse se transcribe y/o traduce inicialmente *in vitro*. Según la invención, cada fluido corporal puede investigarse con ayuda de un análisis de ácidos nucleicos. De manera ventajosa se recurre a sangre, especialmente cuando se investiga ARNm. Para la investigación de un gen también puede utilizarse naturalmente una combinación de diferentes análisis de ácidos nucleicos.

55 La investigación de un fluido corporal puede realizarse mediante la aplicación de procedimientos inmunológicos conocidos. A éstos pertenecen, por ejemplo, experimentos de inmunoprecipitación y competición, inmunofluorescencia, procedimiento de tinción inmunohistoquímica, transferencia de Western, citometría de flujo, ELISA, entre otros, así como procedimientos de espectrometría de masas. Como los procedimientos inmunológicos se refieren generalmente a determinadas interacciones antígeno-anticuerpo, tales procedimientos sirven preferiblemente para la investigación del fluido corporal en proteínas, tratándose especialmente de proteínas que se expresan por los genes anteriormente descritos. Para este fin, los anticuerpos eventualmente necesarios son o conocidos para el experto o pueden obtenerse según procedimientos habituales. Según la invención se utilizan procedimientos inmunológicos preferiblemente para la investigación de sangre y especialmente de médula ósea. Con los procedimientos inmunológicos pueden analizarse de manera ventajosa, por ejemplo, las siguientes proteínas: P53, ERB-B2 y antígenos tumorales mediante ELISA y procedimientos similares; ligando de FAS y receptor de FAS, fosfatidilserina, citocinas, perforina, citoqueratinas y ciclinas con ayuda de inmunofenotipado.

También puede ser ventajosa una combinación de procedimientos inmunológicos y análisis de ácidos nucleicos.

Muchos de los genes específicos para cáncer y asociados a cáncer se investigan preferiblemente mediante ARNm. Una técnica aplicada para este fin es la hibridación directa de ARNm y/o ADNc (cualitativamente/cuantitativamente) sobre una matriz sólida (por ejemplo, en forma de microchips) con oligonucleótidos inmovilizados o estreptavidina inmovilizada y oligonucleótidos biotinilados. En éstos se hibridan ARNm, ADNc o productos de PCR de cadena
 5 doble. Para la introducción de la señal están a disposición distintas formas, por ejemplo, extensión de cebadores mediante dNTP y ddNTP marcados. El principio de detección se elige correspondientemente al marcado: radiactividad, fluorescencia, quimioluminiscencia u otros procedimientos conocidos para el experto para este fin.

Especialmente se sirve de una técnica conocida que combina la transcripción inversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a continuación se denomina RT-PCR. En este procedimiento se aísla inicialmente el ARNm de las células de un fluido corporal según la invención. Éste se transcribe luego con ayuda de la transcriptasa inversa para dar ADNc, que se amplifica sucesivamente con ayuda de PCR. Los productos de PCR así obtenidos pueden introducirse luego o a un análisis de fragmentos, opcionalmente después de una purificación adecuada, secuenciarse directa o indirectamente mediante otros ciclos de clonación o también expresarse *in vitro*. La cuantificación del ARNm investigado se realiza mediante distintos controles internos, preferiblemente en forma de equivalentes de células o ADNc o ARNc clonados mediante cebadores marcados con fluorescencia, mediante PCR “en tiempo real” o mediante hibridación de ARN en microchips. La cuantificación específica para células de genes se realiza mediante patrones internos, especialmente de ARN independiente del tipo de célula (ADNc), que codifica, por ejemplo, GAPDH, β -microglobulina, L32 o β -actina. La especificidad se garantiza mediante extensos controles como muestras de desapareamiento o la secuenciación de ADNc.
 10
 15
 20

En los genes específicos para cáncer, que preferiblemente se caracterizan mediante análisis de ARNm en fluidos corporales, se trata especialmente de los genes anteriormente descritos que en el caso de células no cancerosas no se expresan esencialmente en el fluido corporal investigado.
 25

Los genes asociados a cáncer se caracterizan generalmente preferiblemente mediante análisis de ARNm de fluidos corporales. A éstos pertenecen especialmente los siguientes genes: bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R, MMP, TIMP, MDR1, MRP, LRP, topoisomerasa II, glutatión-S-transferasa, receptor de progesterona, Bax, bcl-2, FAS-L, FAS-R, mdm2, p21, p16, c-myc, TNF- α , IFN- γ , erb-B2 y EGF.
 30

Un análisis de ADN, especialmente el análisis de secuencias de ADN genómico, se prefiere generalmente para la investigación de oncogenes y/o genes supresores de tumores mutados y puede ser especialmente ventajoso en la caracterización de los siguientes genes: p53, familia de ras, erb-B2, c-myc, mdm2, BRCA1, BRCA2, APC, DCC, RB MSH2, MLH1, RET e investigaciones de LOH en distintas secciones de cromosomas mediante numerosos microsátélites.
 35

Los fluidos corporales pueden analizarse en el estado en el que se obtuvieron. No obstante, las muestras se preparan según la invención generalmente inicialmente mediante medidas por sí conocidas para la posterior investigación obteniéndose células o concentrados que contienen células o líquidos que contienen células a partir del fluido corporal. Esto es especialmente válido para el análisis de ácidos nucleicos. Así pueden usarse de manera ventajosa, por ejemplo en lugar de sangre, determinados líquidos que contienen células o concentrados celulares derivados de la misma, por ejemplo, el llamado recubrimiento de Buffy o fracciones celulares después de la centrifugación por densidad. Las células obtenidas a partir del fluido corporal pueden investigarse luego especialmente para tales genes que esencialmente no se expresan en células no cancerosas del fluido corporal investigado.
 40
 45

En la investigación de genes que también son expresados por células no cancerosas en el fluido corporal investigado o en investigaciones en ADN genómico generalmente se investiga según la invención células cancerosas separadas a partir del fluido corporal.

Para separar células cancerosas pueden utilizarse procedimientos conocidos, por ejemplo, procedimientos físicos como microfiltración o centrifugación en gradiente de densidad, o procedimientos de inmuoadsorción específicos para antígeno en los que los anticuerpos específicos marcan las células cancerosas de forma que a continuación puedan separarse. Los anticuerpos adecuados (por ejemplo, anti-EGP) están provistos, por ejemplo, de marcadores fluorescentes y especialmente magnéticos de manera que en el uso de un anticuerpo específico para células cancerosas marcado de esta forma pueden aislarse células cancerosas después de la unión de tales anticuerpos en los llamados citómetros. Para la elección de anticuerpos adecuados para los fines de aislamiento de determinadas células cancerosas puede recurrirse a la caracterización e identificación de estas células cancerosas sin aislamiento previo. Preferiblemente, las células cancerosas se aíslan en estado viable y especialmente capaz de proliferar. Los ARNm deberán estar especialmente intactos para las investigaciones anteriormente descritas.
 50
 55
 60

Las fracciones celulares obtenidas después de una separación deben cuantificarse luego contra marcadores independientes del tipo de célula (por ejemplo, GAPDH, β_2 -microglobulina, L32 o β -actina). Otra detección de la pureza puede realizarse mediante ARN que es específico para MNC (células mononucleares) (perforina, CD45). Las distintas fracciones celulares obtenidas después de la separación (fracción A: MNC incluidas las células tumorales; fracción B: MNC después de la eliminación de las células tumorales; fracción C: células tumorales purificadas) también se comparan luego entre sí investigándose las células cancerosas separadas y la misma investigación se realiza con células no cancerosas del mismo individuo para la comparación. De esta manera se incluyen controles propios de los pacientes en la investigación.
 65

Según una forma de realización especial de la presente invención, las células cancerosas individuales se separan del fluido corporal y éstas también se investigan por separado. Para este fin, un genoma modificado de una célula degenerada por separado puede analizarse mediante una llamada PCR de células individuales mediante amplificación del genoma.

El aislamiento de células cancerosas en circulación se realiza de manera ventajosa para investigaciones genómicas y la investigación de genes que también son expresados por células no cancerosas en el fluido corporal investigado, por ejemplo, los siguientes genes:

ADN: p53, familia de ras, erb-B2, c-myc, mdm2, RB, APC, DCC, investigaciones de LOH en distintas secciones de cromosomas mediante numerosos microsatélites:

ARN: bFGF, bFGF-R, VEGF-R, MMP, TIMP, MDR1, MRP, LRP, topoisomerasa, glutatión-S-transferasa, Bax, bcl-2, FAS, mdm2, p21, p16, c-myc, FGF, MDR1, TNF- α , IFN- γ y EGF, AR, ER, EGP y SF.

Determinadas investigaciones según la invención se realizan preferiblemente en cultivos celulares. Además, las células cancerosas en circulación pueden aislarse en el modo anteriormente descrito y a continuación cultivarse en condiciones adecuadas. Para la biología tumoral (por ejemplo, la modulación de la respuesta inmunitaria por células cancerosas o la proliferación) de estas células puede facilitarse especialmente información de cultivos *in vitro*.

Los genes que se caracterizan de manera ventajosa en células cancerosas cultivadas *in vitro* son, por ejemplo, los siguientes: Bax, FAS, ciclinas, mdm2, p21, p16, bcl-2, c-myc, FGF, MDR1, TNF- α , IFN- γ , erb-B2 y EGF.

El procedimiento según la invención puede aplicarse independientemente del estadio de un cáncer. Puede utilizarse solo o en combinación con otros procedimientos de diagnóstico del cáncer como procedimientos de obtención de imágenes o basados en marcadores tumorales convencionales. El procedimiento según la invención puede utilizarse para la prevención en la aparición de los primeros indicios de advertencia de cáncer o, por ejemplo, después de una terapia de un cáncer para el reconocimiento temprano de la reaparición. Es adecuado para la caracterización e identificación de todas las formas de cáncer siempre y cuando las células cancerosas en circulación correspondientes están presentes en los fluidos corporales investigados. A éstos pertenecen, por ejemplo, cáncer abdominal, cáncer anal, cáncer pélvico, cáncer del conducto biliar, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer cerebral, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de labio, cáncer de la boca, cáncer de riñón, cáncer de parótida, cáncer de lengua, cáncer inguinal, cáncer de tejido blando, linfomas, leucemias, leucemias múltiples y preferiblemente carcinomas de mama, sarcomas, carcinomas de ovario, carcinomas de pulmón, carcinomas de páncreas, carcinomas de colon, carcinomas de recto, carcinomas de próstata, carcinomas de hígado, carcinomas de vejiga, carcinomas de estómago, carcinomas de las glándulas tiroideas, carcinomas de cuello de útero, carcinomas de endometrio, melanomas, linfomas de no Hodgkin y leucemias mieloides crónicas.

Especialmente interesante es la utilización del procedimiento según la invención en formas de cáncer libres de ganglios linfáticos ya que en este caso fracasan los procedimientos convencionales basados en la investigación de ganglios linfáticos. Si se detectan células cancerosas en circulación en tumores NO (por ejemplo, un carcinoma de mama o de colon), debido a la constelación especial, es posible una información específica para la elección de terapia. Por tanto, en estos casos se indica preferiblemente una terapia curativa complementaria en tumores avanzados opcionalmente con una terapia inmunomoduladora adicional posterior.

Independientemente de si sólo se investigan genes específicos para cáncer o adicionalmente también genes asociados a cáncer, según la invención se investigan por lo menos dos genes distintos de manera que según la invención se proporciona un procedimiento para la caracterización múltiple de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas.

Una primera aplicación del procedimiento según la invención va dirigida a la detección de células cancerosas en circulación. Para este fin se mide preferiblemente la expresión de genes específicos para cáncer. Se prefieren especialmente análisis de expresión de múltiples parámetros de tales genes que están desconectados en células no cancerosas del fluido corporal investigado. Estos análisis pueden comprender hasta aproximadamente 40 genes. Generalmente se investigan hasta aproximadamente 25 genes, preferiblemente de aproximadamente 2 a 10 genes y especialmente de aproximadamente 3 a 7 genes. Preferiblemente se analizan los ARNm correspondientes, especialmente mediante RT-PCR.

Las combinaciones especialmente efectivas comprenden los genes CEA y CK20 prefiriéndose el análisis de los ARNm correspondientes. Estas combinaciones pueden complementarse ventajosamente opcionalmente mediante una investigación de MUC1 analizándose especialmente la relación entre la variante de corte y empalme 336BP específica para tumor y la variante de corte y empalme 309BP natural. Las investigaciones de este tipo son especialmente útiles para la detección de células cancerosas en circulación de tipo carcinoma. En este contexto se prefieren carcinomas ginecológicos como carcinomas de ovario, mama o distintos carcinomas de útero, carcinomas de colon, carcinomas de pulmón, carcinomas de estómago, carcinomas de glándulas tiroideas, carcinomas de vejiga, carcinomas de endometrio y carcinomas de próstata. La investigación puede realizarse sin separación previa de las células cancerosas. En investigaciones en sangre se usa preferiblemente la fracción de MNC.

Otras combinaciones efectivas comprenden el gen MAGE3 y de tirosinasa prefiriéndose el análisis de los ARNm correspondientes. Estas combinaciones pueden complementarse ventajosamente opcionalmente mediante una investigación en Muc18. Las investigaciones de este tipo son especialmente útiles para la detección de células cancerosas en circulación de tipo melanoma.

Los análisis de expresión previamente mencionados pueden complementarse mediante otros procedimientos de detección de genes específicos para cáncer. Para este fin se realizan preferiblemente investigaciones en oncogenes y/o genes supresores de tumores mutados recurriéndose especialmente a los genes preferidos según la invención anteriormente mencionados de este tipo. Los análisis de este tipo, especialmente para la detección de mutaciones, amplificaciones, LOH, translocaciones o polimorfismos, se realizan de manera ventajosa al nivel de ADN, por ejemplo mediante técnicas de secuenciación o hibridación de DNA, y pueden comprender hasta aproximadamente 40 genes. Generalmente se investigan hasta aproximadamente 20 genes, preferiblemente de aproximadamente 2 a 10 genes y especialmente de aproximadamente 3 a 7 genes.

Las combinaciones especialmente efectivas comprenden los genes p53 y/o erb-B2. En este caso se investiga p53 preferiblemente mediante el ADNc correspondiente para mutaciones y/o LOH y erb-B2 preferiblemente al nivel de ADN para amplificaciones. Estas combinaciones pueden complementarse ventajosamente opcionalmente mediante investigaciones de c-myc y/o K-ras, investigándose c-myc preferiblemente al nivel de ADN para la amplificación y K-ras para mutaciones, y/o mediante investigaciones de RB, APC, DCC y/o DPC4, preferiblemente mediante LOH.

Esta primera aplicación puede complementarse investigando las células cancerosas en circulación para genes que permiten informaciones sobre su origen, es decir, permiten una localización de órganos de la fuente de diseminación. Esto también puede producirse en forma de análisis de expresión de múltiples parámetros en los que se miden morfogenes organotípicos. Tales análisis pueden comprender hasta aproximadamente 36 genes. Generalmente se investigan hasta aproximadamente 14 genes, preferiblemente de aproximadamente 1 a 8 y especialmente de 2 a 5 genes.

Las combinaciones especialmente efectivas comprenden los genes maspina y/o PR especialmente para la detección de carcinomas de mama analizándose preferiblemente los ARNm correspondientes. Ventajosamente, esta combinación puede complementarse mediante investigaciones en β -hCG y/o ER. Lo mismo rige para la detección de carcinomas de ovario y de cuello de útero pudiendo complementarse en este caso ventajosamente mediante una investigación de SCCA.

Otras combinaciones especialmente efectivas comprenden los genes PSM y/o PSA especialmente para la detección de carcinomas de próstata analizándose preferiblemente los ARNm correspondientes. Ventajosamente, esta combinación puede complementarse mediante investigaciones de hK2.

Otras combinaciones especialmente efectivas comprenden el gen gastrina especialmente para la detección de carcinomas de colon analizándose preferiblemente los ARNm correspondientes. Una combinación de GIP y/o motilina también ofrece una posibilidad de detección efectiva de carcinomas de colon.

Otras combinaciones especialmente efectivas comprenden SP-A y SP-C especialmente para la detección de carcinomas de pulmón analizándose preferiblemente los ARNm correspondientes. Ventajosamente, esta combinación puede complementarse mediante investigaciones de β hCG.

Otras combinaciones especialmente efectivas comprenden EGF-R y β hCG especialmente para la detección de carcinomas de vejiga.

Otra aplicación del procedimiento según la invención se refiere a la creación de un perfil de riesgo de células cancerosas en circulación detectadas debido al cual puede hacerse un pronóstico. Para este fin se evalúan preferiblemente las propiedades de metastatización de estas células cancerosas.

El potencial de riesgo del tumor se describe además por el análisis de mutaciones y amplificaciones y/o expresión reforzada/reducida de determinados genes que influyen en el comportamiento de crecimiento de las células cancerosas (por ejemplo: c-myc, c-erb-B2, c-fos, erb-B, mdm2, nm23, p16, p21).

Otro factor importante para estimar el riesgo es la sensibilidad del tumor a ataques inmunológicos del organismo afectado. Muchos mecanismos efectores producen la apoptosis de las células diana (células tumorales). Cuando un tumor se resiste a estos mecanismos de defensa, esto es una enorme ventaja para éste. Los genes relevantes para la apoptosis pueden mostrar en qué grado un tumor es resistente o sensible a los ataques de las células de defensa, o eventualmente incluso pueden atacar por sí mismos a las células efectoras (por ejemplo: perforina, granzima, bax, bcl-2, fas, fas-L, GADD45, p53, TNF-R1, TNF-R2).

También es de enorme importancia la cuantificación de células tumorales en la sangre. Es decisivo si se diferencia el número de células tumorales en circulación antes y después de la intervención quirúrgica o terapia. Una cuantificación de las células cancerosas mediante los genes específicos para cáncer anteriormente especificados proporciona una información tal con ayuda de patrones longitudinales.

ES 2 334 866 T3

Para crear un perfil de riesgo tal se prefieren análisis de expresión de múltiples parámetros. Éstos pueden comprender hasta aproximadamente 50 genes. Generalmente se investigan hasta aproximadamente 25 genes, preferiblemente de aproximadamente 2 a 15 genes y especialmente de aproximadamente 4 a 12 genes.

5 Para estimar el riesgo se prefiere especialmente la evaluación de las propiedades de metastatización; en este caso se refiere preferiblemente a la capacidad de las células cancerosas para la degradación de la matriz y para controlar la angiogénesis. En este contexto se recurre especialmente a los factores de angiogénesis y/o proteasas anteriormente mencionados, así como a sus antagonistas.

10 Las combinaciones especialmente efectivas para la caracterización de las propiedades de metastatización comprenden bFGF, bFGF-R, VEGF-R1 y/o VEGF-R2 opcionalmente junto con VEGF, investigándose preferiblemente los ARNm correspondientes. Estas combinaciones pueden complementarse opcionalmente mediante investigaciones de MMP, especialmente MMP2, y/o TIMP, especialmente TIMP3, investigándose también en este caso preferiblemente los ARNm correspondientes.

15 Las combinaciones efectivas para la investigación biológica de tumores comprenden los genes FAS-L- y FAS-R que se investigan preferiblemente mediante los ARNm correspondientes. Ventajosamente, esta combinación puede complementarse mediante investigaciones en ciclinas, especialmente ciclina B1, D1 y E, Ki67, bax y/o bcl-2.

20 Una ventaja especial del procedimiento según la invención consiste en poder crear perfiles de riesgo individuales para pacientes individuales. Como el procedimiento es especialmente adecuado para la aplicación continua, es decir, puede repetirse en cualquier momento, mediante la modificación de tales perfiles de riesgo pueden facilitarse valiosas informaciones sobre el desarrollo de un cáncer para un paciente individual. Otra ventaja es que así no debe recurrirse a estadísticas que en general se basan en encuestas en las que se promedian pacientes con condiciones muy diferentes.

25 Otra aplicación del procedimiento según la invención se refiere a la terapia de un cáncer detectado. Así pueden facilitarse informaciones para la elección, control y resistencia de la terapia.

30 Para la elección de la terapia son importantes cuestiones que se refieren a la forma de terapia o la elección de medicamentos. A ésta pertenecen, por ejemplo, decisiones de si la terapia debe ser curativa o paliativa, complementaria o adaptada al riesgo, así como la evaluación de la eficacia de una terapia contra el cáncer. Por ejemplo, los agentes antineoplásicos (citostáticos) que conducen a la muerte celular programada (apoptosis) se comprueban para su eficacia investigándose genes asociados a la apoptosis. Para este fin son especialmente adecuados los análisis de distintos ARNm de los genes asociados a apoptosis anteriormente descritos. Estas pruebas se realizan preferiblemente en células cancerosas en circulación que se cultivan *in vitro*. Así no tiene que administrarse al paciente ningún citostático.

35 Por tanto, otro campo de aplicación también es el uso de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas caracterizadas según la invención para probar principios activos para su acción antineoplásica.

40 En principio, con el procedimiento según la invención pueden evaluarse todas las terapias contra el cáncer. A éstas pertenecen por ejemplo, vacunas, inmunomodulación, terapias moleculares como sustitución de genes, nucleótidos antisentido, ribozimas, anticuerpos monoclonales, inhibidores de MMP y virus atenuados, por ejemplo, virus atenuados con E1B para la citólisis de células cancerosas deficientes en p53wt.

45 Como el procedimiento según la invención se basa en investigaciones de biología molecular, es excelentemente adecuado para proporcionar información referente a la elección de terapia que se adapta a la dotación molecular de las células cancerosas investigadas.

50 Se parte de que una terapia contra el cáncer satisfactoria conduce a la reducción y, en el mejor de los casos, a la desaparición completa de células cancerosas en circulación y/o a la pérdida de factores de riesgo. Si una forma de cáncer no reacciona a una determinada terapia, generalmente se parte de que el número de células cancerosas en circulación no disminuye, sino que opcionalmente aumenta o que aumenta el riesgo específico para el paciente. Por tanto, es posible evaluar el progreso de una enfermedad cancerígena o su terapia mediante la aplicación reiterada del procedimiento según la invención. Por tanto, mediante una comparación dependiente del tiempo puede valorarse la eficacia de una terapia y también reconocerse de manera sencilla resistencias en comparación con determinadas formas de terapia. Además, su aparición puede confirmarse mediante investigaciones de células cancerosas en circulación para genes de quimiorresistencia después de la administración de fármacos a los pacientes.

55 Los análisis de distintos genes diana de determinados fármacos, como EGP (anticuerpo contra antígeno epitelial), c-erb-B2 (complejo de anticuerpo anti-erb-B2-mostaza), MMP (terapia anti-proteasa), PR y ER (terapia antihormonal), bFGF (terapia anti-bFGF) o topoisomerasa II (doxorubicina, entre otros), pueden proporcionar información sobre la acción específica de las sustancias cuantificándose directamente los "parámetros diana". El éxito de una terapia citostática con taxanos estabilizadores de microtúbulos (por ejemplo, taxol) puede predecirse mediante la detección de la expresión de ARN de las moléculas diana monoméricas (α - y β -tubulinas) cuya unión se previene con taxol. Una resistencia de células cancerosas contra citostáticos (por ejemplo, cisplatino) puede detectarse mediante la pérdida de la expresión de genes de reparación de ADN (por ejemplo, hMLH1). Además, mediante la generación de sistemas *in vitro* de células tumorales propias del paciente puede probarse previamente la acción de los fármacos más distintos para determinar de esta manera la mejor forma de tratamiento posible.

Las combinaciones especialmente efectivas para valorar una quimiorresistencia posiblemente existente comprenden los genes MDR1, MRP, topoisomerasa II y glutatión-S-transferasa-pi midiéndose, por ejemplo, los ARNm correspondientes. Adicionalmente, también pueden investigarse mutaciones de β -tubulina y la amplificación de MDR1. En relación con la investigación de MDR1 también se recurre frecuentemente al análisis de la bomba de MDR1 gp170 y/o a la prueba de doxorubicina de eflujo de MDR1.

Una ventaja especial del procedimiento según la invención consiste en poder caracterizar e identificar células resistentes a terapia (enfermedad mínima residual "minimal residual disease"; EMR) y, basándose en esto, una conducta terapéutica ya citada puede extenderse de una forma adaptada al riesgo para eliminar completamente las células cancerosas residuales.

Aunque el procedimiento según la invención se ha descrito en primera línea en cuanto a la caracterización de genes humanos, no debe limitarse a esto. Más bien, para el experto se abre una serie de otras aplicaciones como las aplicaciones en modelos de animales para responder planteamientos que se corresponden o al menos son similares a los anteriores.

Los agentes para la realización del procedimiento según la invención deberán manipularse lo más sencillamente posible y esencialmente estar listos para uso. Ventajosamente, los agentes para la realización del procedimiento según la invención se usan en forma de kit, por ejemplo, como kit de prueba y/o diagnóstico. Un kit tal contiene por lo menos un compartimento, por ejemplo un vial o tubo de ensayo, en el que los agentes para la investigación de los genes anteriores según la invención están contenidos, si es posible, en cantidades en alícuotas. Normalmente, el kit comprende varios compartimentos pudiendo asignarse a un compartimento de la investigación un determinado gen, pero también puede comprender agentes que pueden usarse para la investigación de varios genes. Eventualmente, también pueden asignarse varios compartimentos de la investigación a un determinado gen. Opcionalmente, el kit también comprende otro compartimento para recoger la muestra de fluido corporal. El contacto de la muestra de fluido corporal con los agentes para la realización del procedimiento según la invención puede tener lugar opcionalmente en otro compartimento. La elección de los agentes se basa en los genes investigados y el procedimiento elegido.

Según la invención, los kits de diagnóstico y/o de prueba pueden contener agentes para la preparación de la muestra de fluido corporal, por ejemplo, agentes para la concentración de células a partir de fluidos corporales como gradientes de densidad y/o filtros, agentes para el aislamiento y la purificación de ADN y/o ARN a partir de células, especialmente sistemas basados en guanidinisotiocianato, columnas de centrifugación con fases sólidas adecuadas y/o sistemas de oligo-dT; agentes para la realización de la transcripción inversa (RT), por ejemplo, transcriptasa inversa, tampones de RT, inhibidor de RNasa, cebadores y/o dNTP adecuados; agentes para la realización de la PCR, por ejemplo, polimerasa termoestable, tampones de PCR, $MgCl_2$ y/o dNTP; agentes para la realización de la digestión con enzimas de restricción (RD), por ejemplo, enzima de restricción y tampones de RD y/o agentes para el análisis de los productos obtenidos mediante RT, PCR y/o RD, por ejemplo, geles o agentes para la preparación de geles apropiados, ELISA, entre otros.

Por otra parte, muchos de los agentes necesarios para la realización de los procedimientos anteriores también pueden adquirirse, frecuentemente incluso en forma de kit, en el comercio de manera que para la realización del procedimiento según la invención sólo se requieren agentes complementarios. Los kits complementarios según la invención ponen a disposición preferiblemente cebadores, sondas y/o controles negativos/positivos apropiados, así como opcionalmente otros coadyuvantes.

Según la invención se prefieren kits o kits complementarios que hagan posible la investigación de la combinación de genes anteriormente descrita que resulta efectiva. Los kits de este tipo se usan con la finalidad de detectar cáncer en general, localizar tumores primarios, realizar una estimación del riesgo y del pronóstico o facilitar información en cuanto a una terapia. Para una valoración comprensiva de un cáncer, los kits de este tipo pueden combinarse en un tipo de sistema modular.

Por otra parte, los kits según la invención también pueden contener agentes que hacen posible investigaciones de genes para la caracterización específica para cáncer y asociada a cáncer de un determinado tipo de cáncer. Por ejemplo, un kit específico para melanoma puede contener por lo menos agentes para la investigación de tirosinasa y bFGF, un kit específico para colon por lo menos agentes para la investigación de CK20, bFGF y MMP2 y un kit específico para mama por lo menos agentes para la investigación de CK19, bFGF, MMP2 y PR.

Los siguientes ejemplos explicarán más detalladamente la invención sin limitarla.

Ejemplo de referencia 1

Aislamiento de células mononucleares (MNC) a partir de sangre

Se llena un tubo de centrifuga (50 ml) con 15 ml de medio de gradiente de densidad (DGM) 1,077 (RT) y cuidadosamente se recubre con 30 ml de sangre/PBS (sangre heparinizada o con EDTA). Después de centrifugar 30 minutos 30 (800 g, TA), todas las células de la interfase (MNC) se transfieren con una pipeta Pasteur a un nuevo tubo de centrifuga (15 ml) relleno de 6 ml de PBS/aditivo (PBS + BSA al 0,2%, azida de sodio al 0,02%, EDTA 1 mM). A partir

ES 2 334 866 T3

de aquí todas las etapas se realizan con enfriamiento (4°C). Se centrifuga (10 min a 600 g, 4°C), las células se recogen en 10 ml de PBS/aditivo y el número de células se determina mediante tinción con azul de tripano (95 µl de disolución TB + 5 µl de disolución celular) (número de células = número de células de 16 cuadrados pequeños (Neubauer) x 2x10⁶). Se centrifuga (10 min a 400 g, 4°C), las células se recogen en PBS/aditivo frío en hielo y se transfieren a un tubo de reacción Eppendorf (1,5 ml) (a un número de células de hasta 2,5 E7 en 0,5 ml; a de 2,5 E7 a 5E7 en 1 ml). La fracción A (1/4 vol. a 20 ml, 1/6 vol. a 30 ml) se extrae luego para el aislamiento de ARN/ADN, las células contenidas en ella se centrifugan (400 g, 3 min), el sedimento resultante se resuspende en 600 µl de tampón de RLT-Me (del kit RNEasy Blood de Quiagen) y se almacena a -80°C. Finalmente se añade reactivo de bloqueo de FC al 10%.

Ejemplo de referencia 2

Aislamiento de células tumorales epiteliales a partir de sangre completa

Se lavan perlas anti-epiteliales (40 µl/0,5 ml) dos veces con 800 µl de PBS/aditivo en una pista magnética. Se añaden 40 µl/0,5 ml de perlas lavadas a un tubo de reacción Eppendorf, el tubo de reacción se deja rotar en un rotor 25 min a 4°C y luego se coloca en una gradilla de tubos de reacción y la suspensión de la tapa del tubo de reacción se añade al tubo de reacción. El tubo de reacción se coloca 1 min en MPC, la suspensión celular se desecha, la pista magnética se quita (o se saca el tubo), se añaden 800 µl de PBS/aditivo y se resuspenden cuidadosamente. La última sucesión de pasos se repite 6 veces, resuspendiéndose por última vez en PBS/EDTA 1 mM (sin BSA).

El tubo de reacción se coloca 1 min en MPC y el sobrenadante se elimina completamente. Las perlas resultantes con células adherentes forman la fracción C. Ésta se resuspende para el aislamiento de ARN/ADN en 200 µl de trizol y se almacena a -80°C. Como marcador de pureza de la fracción C puede medirse ARNm de perforina.

La evaluación se realiza mediante la determinación del ARN asociado a tumor y específico para tumor, así como mediante la determinación del ARN de glicoproteína epitelial mediante cuantificación del ARN de GAPDH.

Ejemplo de referencia 3

Aislamiento de ADN/ARN

El aislamiento de ADN/ARN se realiza de una manera en sí conocida.

Ejemplo de referencia 4

Análisis de ARNm de CK20 y CEA mediante RT-PCR

Para detectar células epiteliales en sangre, el contenido de ARNm de CK20 se determina selectivamente para órganos (ovario, colon > mama) mediante biología molecular con una sensibilidad de más de 1 célula en 10⁶ leucocitos. Además, se investiga el contenido de ARNm de CEA. Esta detección de células que forman la adherina oncogénica CEA se realizó con una sensibilidad de una célula cancerosa en 10⁶ leucocitos.

Desarrollo del experimento

Transcripción inversa (RT):

Se mezclaron los siguientes reactivos (mezcla de RT):

2,35 µl de H₂O

4 µl de 5x tampón de la primera cadena

2 µl de DTT 0,1 M

0,15 µl de RNA-Guard (38950 U/ml)

0,5 µl de cebador al azar (500 µg/ml)

0,5 µl de mezcla de dNTP (20 mM de cada uno)

0,5 µl de M-MLV (200 U/µl)

ES 2 334 866 T3

Se desnaturalizan 10 μ l de ARN aislado de células mononucleares (5 ml de sangre) (aproximadamente 1 μ g) 1 min a 70°C, se enfrían inmediatamente sobre hielo 3 min, se mezclan sin burbujas de aire con 10 μ l de mezcla de RT, se incuban 60 min a 37°C, se incuban 3 min a 95°C, se enfrían inmediatamente sobre hielo 3 min y o se introducen directamente a la PCR o se congelan a -20°C. PCR:

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

	CK20	CEA
Tampón TaqMan (10x)	5,0	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	8,0	8,0
dNTP (cada vez 0,75 μ l; 2,5 mM)	3,0	3,0
Cebador A (20 pmol/ μ l)	0,75	0,75
Cebador B (20 pmol/ μ l)	0,75	0,75
Sonda TaqMan (20 pmol/ μ l)	0,5	0,5
Amplitaq-Gold (PE 5U/ μ l)	0,5	0,5
H ₂ O	28,5	28,5
ADNc de RT	3,0	3,0

La PCR se realiza en el detector de secuencias ABI 7700 (TaqMan). Se usa un procedimiento de PCR de dos etapas. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

Para CK20:

95°C **12 min** (activación inicial por calor)

95°C **30 s**

57°C* **60 s** 45x

20°C ∞

Para CEA:

95°C **12 min** (activación inicial por calor)

95°C **30 s**

58°C* **60 s** 45x

20°C ∞

Controles

Pos. (CK20): línea celular de adenocarcinoma NCI-H508

Neg. (CK20): línea celular de sarcoma de útero MES-SA/Dx5; linfocitos de un donante normal

Pos. (CEA): línea celular de adenocarcinoma NCI-H508; línea celular de carcinoma de mama MCF7

Neg. (CEA): linfocitos de un donante normal

Cebadores

	Cebador A	Cebador B	Sonda Taqman
CK20	CK20 sentido	CK20 antisentido	Sonda de CK20
CEA	CEA sentido	CEA antisentido	Sonda de CEA

ES 2 334 866 T3

Análisis de los productos de PCR

El rendimiento de la reacción de PCR que tiene lugar se mide online para cada ronda de ciclos en el detector de secuencias. La curva registrada en este caso del progreso de la reacción sirve de base para la determinación de la cantidad de ADNc que va a analizarse como equivalente del ARNm. La base es la determinación de la transición de la reacción de PCR en la fase exponencial.

Ejemplo de referencia 5

Análisis de ARNm de MUC1 mediante RT-PCR

Se realiza una determinación del ARNm de MUC1 para valorar la transcripción de mucina específica para carcinoma.

Desarrollo del experimento

Transcripción inversa (RT):

Se mezclan los siguientes reactivos (mezcla de RT):

4 μ l de $MgCl_2$ 25 mM

2 μ l de tampón de PCR II (10x)

2 μ l de dCTP 10 mM

2 μ l de dGTP 10 mM

2 μ l de dATP 10 mM

2 μ l de dTTP 10 mM

1 μ l de inhibidor de RNasa (2000 U)

1 μ l de M-MLV (5000 U)

1 μ l de hexámero al azar (5 nmol)

Se añaden 5 μ l de ARN (aproximadamente 1 μ g) aislado a partir de células mononucleares (5 ml sangre) a la mezcla de RT, se incuban 10 min a temperatura ambiente, 15 min a 42°C, 5 min a 99°C y 5 min a 5°C.

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

	MUC1
Tampón de PCR II (10x)	8,0
$MgCl_2$ (25 mM)	4,0
Cebador A (20 pmol/ μ l)	2,0
Cebador B (20 pmol/ μ l)	2,0
Amplitaq-Gold (PE 5U/ μ l)	0,75
H ₂ O	63,5
ADNc de RT	22,0

ES 2 334 866 T3

La PCR se realiza en el termociclador Perkin Elmer 9600 ó 2400. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

95°C 10 min
95°C 15 s
60°C 30 s 35 ciclos
72°C 7 min

La mezcla de PCR se enfría hasta 4°C.

Controles

Pos.: MES-SA/Dx 5 (línea celular de sarcoma de útero); sólo expresa la variante de corte y empalme de 336 pb

Neg.: linfocitos de un donante normal; sólo expresan la variante de corte y empalme de 309 pb

Cebadores

MUC1	Cebador A	Cebador B
	MUC S1 sentido	MUC S2 antisentido
	(5'-6-FAM)	

Análisis de los productos de PCR

Se mezclan 12 µl de formamida, 0,5 µl de Genescan Tamra 500 (PE) y 1 µl de mezcla de PCR, se desnaturalizan 3 min a 95°C, se incuban sobre hielo y se analizan en ABI Genescan 310 (tampón ánodo: 2% de polímero, 1x tampón Genetic Analyzer; tampón cátodo: 3% de polímero, 40% de urea, 1x tampón Genetic Analyzer; tiempo de inyección: 10 s; tensión de inyección: 7 kV; tensión de elución: 13 kV; temperatura de elución: 30°C; tiempo de elución: 18 min; módulo: Short Denatured C).

Para la evaluación se determinan las áreas de los picos de los productos de PCR (336 pb y 309 pb). Se forma el cociente entre el área de los picos de la variante de corte y empalme de 336 pb y la variante de corte y empalme de 309 pb (0,2 es normal, hasta 0,7 se corresponde con una expresión débil y > 0,7 con una expresión fuerte).

Ejemplo de referencia 6

Análisis de ARNm de GST-pi, FAS-R, FAS-L, MMP-2 mediante RT-PCR

Desarrollo del experimento

La transcripción inversa (RT) se realiza según el Ejemplo de referencia 4.

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (µl):

	GST-pi	FAS-R	FAS-L	MMP-2
Tampón de PCR II (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0
ROX TIB-MOLBIOL (100 µM)	0,75	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	6,0	8,0	8,0	8,0
dNTP (cada vez 0,75 µl) 2,5 mM	3,0	3,0	3,0	3,0
Cebador A (20 pmol/µl)	1,0	1,0	0,75	0,75
Cebador B (20 pmol/µl)	1,0	1,0	0,75	0,75
Sonda TaqMan (20 pmol/µl)	0,5	0,3	0,5	0,5
Amplitaq-Gold (PE 5U/µl)	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	29,25	27,7	28,0	28,0
ADNc de RT	3,0	3,0	3,0	3,0

ES 2 334 866 T3

La PCR se realiza en el detector de secuencias ABI 7700 (TaqMan). Se usa un procedimiento de PCR de dos etapas. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

5	Para GST-pi:		
	95°C	<u>10 min</u>	(activación inicial por calor)
	95°C	30 s	
10	<u>57°C</u>	<u>60 s</u>	40 x
	20°C	∞	
	Para FAS-R y FAS-L:		
15	<u>95°C</u>	<u>12 min</u>	(activación inicial por calor)
	95°C	30 s	
	<u>55°C</u>	<u>30 s</u>	45 x
20	20°C	∞	
	Para MMP-2:		
25	<u>95°C</u>	<u>10 min</u>	(activación inicial por calor)
	95°C	30 s	
	<u>58°C</u>	<u>60 s</u>	45 x
30	20°C	∞	
	Número de ciclos: (45 para FAS; MMP-2)		
35	<i>Controles</i>		
	Pos. (GST-pi):	MES	
40	MNC (GST-pi):	El valor límite de la expresión normal se fija mediante el valor de CT de los controles de MNC.	
	Pos. (FAS-R):	MNC (donante normal); ES-2; serie de dilución de ADNc de MNC	
	Neg. (FAS-R):	Agua destilada	
45	Pos. (FAS-L):	MNC (donante normal); ES-2; serie de dilución de ADNc de MNC	
	Neg. (FAS-L):	MCF-7 (carcinoma de mama); Daudi (linfoma de Burkitt)	
50	Pos. (MMP-2):	COLO-320	
	Neg. (MMP-2):	SW403; linfocitos de un donante normal	

55	<i>Cebadores</i>			
		Cebador A	Cebador B	Sonda TaqMan
	GST-pi	GST-pi sentido	GST-pi antisentido	Sonda de GST-pi
60	FAS-R	FAS-R sentido	FAS-R antisentido	Sonda de FAS-R
	FAS-L	FAS-L sentido	FAS-L antisentido	Sonda de FAS-L
	MMP-2	MMP-2 sentido	MMP-2 antisentido	Sonda de MMP-2

65 Las secuencias de cebadores y sondas para FAS se diseñaron según el n° de registro de GenBank M67454; las secuencias de cebadores y sondas para FAS-L se diseñaron según el n° de registro de GenBank U08137.

ES 2 334 866 T3

Análisis de los productos de PCR

Análogamente al Ejemplo de referencia 4.

Ejemplo de referencia 7

Análisis de ARNm de bFGF-R, bFGF, VEGF-R2 mediante RT-PCR

Desarrollo del experimento

La transcripción inversa (RT) se realiza según el Ejemplo de referencia 1.

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

	bFGF-R	bFGF	VEGF-R2
Tampón de PCR (10x)	5,0	5,0	5,0
dNTP (20 mM)	0,5	0,5	0,5
Cebador A (20 pmol/ μ l)	1	1	1
Cebador B (20 pmol/ μ l)	1	1	1
Taq-polimerasa (PE 5U/ μ l)	0,25	0,25	0,25
H ₂ O	31,55	31,55	31,55
ADNc de RT	5,0	5,0	5,0

La PCR se realiza en el termociclador Perkin Elmer 9600 ó 2400. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

95°C 5 min
95°C 60 s
53°C 60 s
72°C 60 s 45 x
72°C 10 min

La mezcla de PCR se enfría hasta 4°C.

Controles

Pos. (bFGF-R): ES-2 (carcinoma de ovario); NB-4 (ApML); MCF-7 (carcinoma de mama); 697 (cALL); Colo 829 (melanoma)

Neg. (bFGF-R): linfocitos (donante normal); NCI-H508 (adenocarcinoma); K562 (CML)

Pos. (bFGF): ES-2 (carcinoma de ovario); K562 (CML); MES-SA/Dx5 (sarcoma de útero); Colo 829 (melanoma)

Neg. (bFGF): linfocitos (donante normal); 697 (cALL); NCI-H508 (adenocarcinoma)

Pos. (VEGF-R2): ES-2 (carcinoma de ovario); Colo 829 (melanoma); EFM192A (carcinoma de mama)

Neg. (VEGF-R2): linfocitos (donante normal); NCI-H508 (adenocarcinoma)

ES 2 334 866 T3

Cebadores

	Cebador A	Cebador B
bFGF-R	bFGF-R sentido	bFGF-R antisentido
bFGF-L	bFGF-L sentido	bFGF-L antisentido
VEGF-R2	VEGF-R2 sentido	VEGF-R2 antisentido

Análisis de los productos de PCR

- a) 20-30 μ l de la mezcla de PCR se separan en un gel de agarosa al 2% (1xTBE).
- b) 6-10 μ l del producto de PCR se incuban con (+) o sin (-) enzima de restricción 1 hora a 37°C. Después de la separación en gel de agarosa al 2% pueden reconocerse dos fragmentos más pequeños.

Restricción	+	-
Reactivos	6 (10) μ l de producto de PCR 0,5 μ l de R-enzima 1 (1,5) μ l de tampón M 2,5 (3) μ l de agua destilada	6 (10) μ l de producto de PCR - 1 (1,5) μ l de tampón M 3 (3,5) μ l de agua destilada

Ejemplo de referencia 8

Análisis de ARNm de tirosinasa mediante RT-PCR

Desarrollo del experimento

La transcripción inversa (RT) se realiza según el Ejemplo de referencia 1.

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

	1ª ronda	2ª ronda
Tampón de PCR (10x)	5,0	5,0
MgCl ₂ (0,1 M)	0,8	0,8
Triton X-100 (1%)	5,0	5,0
dNTP (20 mM)	0,5	0,5
Cebador A (20 pmol/ μ l)	7,5	-
Cebador B (20 pmol/ μ l)	7,5	-
Cebador C (20 pmol/ μ l)	-	7,5
Cebador D (20 pmol/ μ l)	-	7,5
Taq-polimerasa (5U/ μ l) + Taq-anticuerpo 1:1	1,0	1,0

ES 2 334 866 T3

	1ª ronda	2ª ronda
H ₂ O	20,7	20,7
ADNc de RT	2,0	-
producto de PCR de la 1ª ronda	-	2,0*
* Diluir 100 veces el control positivo		

La PCR se realiza en el termociclador Perkin Elmer 9600 ó 2400. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

95°C 10 min
 95°C 60 s
 60°C 30 s
72°C 60 s 30 x
 72°C 10 min

La mezcla de PCR se enfría hasta 4°C.

Controles

Pos. (tirosinasa): COLO-829 ADNc (melanoma humano); 697 ADNc (leucemia de células pre-B)

Neg. (tirosinasa): Premezcla sin ADN de sondas (obligatorio); MES (sarcoma de útero); LNCAP (carcinoma de próstata)

Cebadores

	Cebador A	Cebador B	Cebador C	Cebador D
Tirosinasa	HTYR-1	HTYR-2	HTYR-3	HTYR-4

Análisis de los productos de PCR

10 µl del producto de PCR y 1,1 µl de tampón de sondas se someten junto con 10 µl de conductor de 100 pb a una electroforesis en gel de agarosa a una tensión de elución de 150 voltios y a un tiempo de elución de 20 min. La evaluación se realiza bajo una lámpara de UV a 254 nm o 312 nm. El producto de PCR después de la 1ª ronda posee un tamaño de 284 pb. El producto de PCR después de la 2ª ronda posee un tamaño de 207 pb. Como patrón de longitud se usa el conductor de 100 pb.

Ejemplo de referencia 9

Análisis de amplificación de *erb-B2*, *c-myc* y *mdr1*

Se coamplifican el gen *erb-B2*, *c-myc* y *mdr1* o el gen de β -globina usando cebadores de oligonucleótidos marcados con fluoresceína. La separación de los amplificados se realiza mediante electroforesis capilar.

ES 2 334 866 T3

Desarrollo del experimento

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

	erb-B2	c-myc	mdr1
Tampón de PCR (10x, PE)	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (25 mM, PE)	4,0	4,0	0,5
dNTP (20 mM)	0,25	0,25	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄ (100 mM)	7,5	7,5	7,5
Cebador A (20 pmol/ μ l)	1,5	2,0	5,0
Cebador B (20 pmol/ μ l)	1,5	2,0	5,0
Cebador c (20 pmol/ μ l)	0,5	0,2	0,5
Cebador d (20 pmol/ μ l)	0,5	0,2	0,5
Amplitaq-Gold (PE, 5U/ μ l)	0,4	0,4	0,25
H ₂ O (bidest)	25,85	25,45	23,5
ADN	3,0	3,0	2,0

La PCR se realiza en un termociclador Perkin Elmer 2400, 9600 ó 9700. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

Para erb-B2 y c-myc:

<u>95°C</u>	<u>10 min</u>	
95°C	1 min	
60°C	1 min	
<u>72°C</u>	<u>1 min</u>	32 x
72°C	3 min	

Para mdr1:

<u>94°C</u>	<u>5 min</u>	
95°C	1 min	
57°C	1 min	
<u>72°C</u>	<u>1 min</u>	35 x
72°C	5 min	

La mezcla de PCR se enfría hasta 4°C.

Controles

Pos. (erb-B2): DNA-A

Norm. (erb-B2): ADN humano

ES 2 334 866 T3

Pos. (c-myc): DNA-B; H82-DNA

Norm. (c-myc): ADN humano

5 Pos. (mdr1): ADN de CCRF

Norm. (mdr1): ADN humano

10 Cebadores

	Cebador A	Cebador B	Cebador C	Cebador D
15 erb-B2	hex-neu-3	neu-5	PCO-3F	PCO-4
c-myc	hex-myc-1	myc-2	PCO-3F	PCO-4
mdrl	hex-mdr1-5F	mdr1-5B	PCO-3F	PCO-4

20

Análisis de los productos de PCR

25 Los productos de PCR se aplican en un gel de agarosa al 2%. Después de la electroforesis capilar (Genetic-Analyzer ABI 310), para cada muestra de paciente y los controles se forma el cociente de la integral del área de erb-B2, c-myc o mdrl y de la integral del área de β -globina. Se presenta una amplificación de erb-B2, c-myc o mdrl en una muestra de paciente cuando el cociente es "significativamente" mayor que el del control normal, o de muestras simultáneamente medidas.

30 Ejemplo de referencia 10

Análisis de LOH de microsatélites (DxSy), DCC, APC, RB, p53

35 Desarrollo del experimento

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

40		DCC	APC	RB	p53	DxSy
	Tampón de PCR (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0
45	Mezcla de dNTP (20 mM; 10 mM para DxSy)	0,5	0,5	0,5	0,5	4,8
	MgCl ₂ (25 mM)	-	-	-	3,0	3,0
	Cebador A (20 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
50	Cebador B (20 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
	Taq-polimerasa (5U/ μ l) + Taq-anticuerpo 1:1	0,5	0,5	0,5	0,5 **	0,3 **
	H ₂ O	40,0	40,0	40,0	37, 0	14,7
55	ADN*	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
60	* 3 μ l de ADN (fracción C; fracción de células tumorales; frotis) 1 μ l de ADN (fracción A) + 2 μ l de H ₂ O					
	** Taq-polimerasa Amplitaq Gold					

65

ES 2 334 866 T3

La PCR se realiza en el termociclador Perkin Elmer 9600 ó 2400. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

Para DCC, APC y RB:

<u>95°C</u>	<u>5 min</u>	
94°C	30 s	
53°C	30 s	
<u>72°C</u>	<u>30 s</u>	30 x
72°C	5 min	

Para p53:

<u>94°C</u>	<u>10 min</u>	
94°C	30 s	
60°C	30 s	
<u>72°C</u>	<u>30 s</u>	40 x
72°C	5 min	

Para DxSy:

<u>95°C</u>	<u>10 min</u>	
94°C	1 min	
60°C	30 s	(D17S849 / D19S960)
53°C	30 s	(D16S265 / D11S528)
57°C	30 s	(D17S926 / D17S960)
<u>72°C</u>	<u>30 s</u>	40 x
72°C	10 min	

La mezcla de PCR se enfría hasta 4°C.

Controles

Neg.: Mezcla sin ADN

Cebadores

	Cebador A	Cebador B
DCC-LOH	hex-DCC LOH-1	DCC LOH-2
RB-LOH	FAM-RB LOH-1	RB LOH-2
APC-LOH	FAM-APC LOH-1	APC LOH-2
p53-LOH	FAM-p53 LOH-A	p53 LOH-B
D17S926-LOH	FAM-D17S926 a	D17S926 s
D17S695-LOH	FAM-D17S695 a	D17S695 s
D17S849-LOH	FAM-D17S849 a	D17S849 s
D17S960-LOH	FAM-D17S960 a	D17S960 s
D16S265-LOH	FAM-D16S265 a	D16S265 s
D11S528-LOH	FAM-D11S528 a	D11S528 s

ES 2 334 866 T3

Análisis de los productos de PCR

1. Detección de la función de la PCR en gel de agarosa

- 5 Se aplican 9 μ l (15 μ l para DxSy) de producto de PCR y 1 μ l (2 μ l) de 10x tampón de muestra TBE con azul de bromofenol en un gel de agarosa al 2% (10 μ l de disolución madre de bromuro de etidio, 10 mg/ml en 100 ml de gel) en 1x tampón TBE. La electroforesis se realiza a de 160 a 170 V a tensión constante.

2. Detección de la pérdida de alelos mediante ABI 310

- 10 Se desnaturalizan 12 μ l de formamida, 1 μ l de sonda y 0,5 μ l de Genescan Tamra 500 (PE) 2 min a 95°C y se colocan directamente sobre hielo. A continuación se realiza un análisis de fragmentos en ABI 310 (tampón de análisis; ánodo y cátodo: 1x tampón de análisis de fragmentos (PE) con EDTA; polímero: POP-4; tiempo de inyección: 5 s; tensión de inyección: 15 kV; tensión durante la elución: 15 kV; temperatura durante la elución: 60°C; tiempo de elución: 24 min; matriz: GS POP4C).

- 20 El análisis se realiza tanto en sangre completa, que refleja la relación de alelos en las células normales, como en la fracción C, que especifica representativamente el estado de las células cancerosas. Sólo puede realizarse un análisis satisfactorio cuando el paciente es heterocigoto para ambos alelos de un marcador. Los alelos se diferencian en su tamaño de al menos 4 pb. Los cocientes de las áreas de los picos de ambos alelos (alelo 1/alelo 2) en la fracción de sangre completa se comparan los de la fracción C. Cuando los valores se diferencian al menos el 50%, puede asumirse una LOH.

Ejemplo de referencia 11

25 Análisis de mutación de p53 y K-ras

Desarrollo del experimento

Por mezcla de PCR se mezclan los siguientes reactivos (μ l):

30		Cod. 175	Cod. 245	Cod. 248	Cod. 249	Cod. 273	k- ras
35	Tampón de PCR (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	Mezcla de dNTP (20 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
40	DMSO	-	-	2,5	2,5	-	-
	MgCl ₂ (25 mM)	-	-	-	-	-	6,0
	Cebador A (20 pmol/ μ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
45	Cebador B (20 pmol/ μ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Taq-polimerasa (5 U/ μ l) + Taq-anticuerpo 1:1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
50	H ₂ O	37,0	37,0	34,5	34,5	37,0	31,0
	ADN	5,0	3,0	5,0	5,0	3,0	5,0

- 55 La PCR se realiza en el termociclador Perkin Elmer 9600 ó 2400. Se utiliza el siguiente perfil de temperatura:

55	<u>95°C</u>	<u>5 min</u>	
	94°C	30 s	
60	55°C	30 s	
	<u>72°C</u>	<u>30 s</u>	37 (para k-ras 35x)
65	72°C	5 min	

La mezcla de PCR se enfría hasta 4°C.

ES 2 334 866 T3

Controles

Pos. (p53; 248): ADN de la línea celular de leucemia promielocítica aguda NB-4; ADN de la línea celular de carcinoma de colon Colo 320

Pos. (p53; 273): células de carcinoma de colon SW480

Pos. (K-ras): células de carcinoma de colon SW480 y SW403

Neg. (p53): mezcla sin DNA; mezcla sin restricción

Neg. (K-ras): ADN de linfocitos normales o DNA de una línea celular negativa

Cebadores

	Cebador A	Cebador B
p53 (175)	FAM-p53 175-S	p53 6-2
p53 (245)	FAM-p53 245-A	p53 245-S
p53 (248)	FAM-p53 7-1	p53 8-2
p53 (249)	FAM-p53 7-1	p53 8-2TET-p53 8-2
p53 (273)	p53 273-S	TET-p53 8-2
k-ras	k-ras sentido	K-105 antisentido marcado con FAM

Análisis de los productos de PCR

1. Detección de la función de la PCR en gel de agarosa

Se aplican 9 μ l de producto de PCR y 1 μ l de 10x tampón de muestra TBE con azul de bromofenol en un gel de agarosa al 2% (10 μ l de disolución madre de bromuro de etidio, 10 mg/ml en 100 ml de gel) en 1x tampón TBE. La electroforesis se realiza a de 160 a 170 V y tensión constante.

2. Digestión con restricción

Se incuban 7,3 μ l, 2,0 μ l de 10x tampón, 0,2 μ l de 100x BSA, 0,5 μ l de enzima de restricción y 10 μ l de producto de PCR (para el codón 245, 249 y 273: 7,5 μ l de H₂O (bidest), 2,0 μ l de 10x tampón, 0,5 μ l de enzima de restricción y 10 μ l de producto de PCR; para el codón 248: 7,75 μ l de H₂O (bidest), 2,0 μ l de 10x tampón, 0,25 μ l de enzima de restricción y 10 μ l de producto de PCR) 1 hora a 37°C. Dependiendo de la cantidad del producto de PCR, la valoración se realiza en un gel MetaPhor al 4% o mediante ABI 310.

Valoración en gel de agarosa MetaPhor

Se aplican 18 μ l de producto de PCR restringido y 2 μ l de 10x tampón de muestra TBE con azul de bromofenol en un gel de agarosa MetaPhor al 4% (10 μ l de disolución madre de bromuro de etidio, 10 mg/ml en 100 ml de gel) en 1x tampón TBE. La electroforesis se realiza a de 160 a 170 V y tensión constante. Para la comparación, sobre cada gel también se aplica el producto de PCR sin cortar de una muestra discrecional.

Detección mediante ABI 310

Se desnaturalizan 12 μ l de formamida, 1 μ l de sonda y 0,5 μ l de Genescan Tamra 500 (PE) 2 min a 95°C y se colocan directamente sobre hielo. A continuación se realiza un análisis de fragmentos en ABI 310 (tampón de análisis; ánodo y cátodo: 1x tampón de análisis de fragmentos (PE) con EDTA; polímero: POP-4; tiempo de inyección: 5 s; tensión de inyección: 15 kV; tensión durante la elución: 15 kV; temperatura durante la elución: 60°C; tiempo de elución: 24 min; matriz: GS POP4C).

*Longitudes de fragmentos***Codón 175**

5	Natural:	70 pb	227 pb	18 pb
	Mutado:	88 pb	227 pb	

Codón 245

10	Natural:	145 pb	23 pb	
	Mutado:	168 pb		

Codón 248

15	Natural:	77 pb		
----	----------	--------------	--	--

20	Mutado:	246 pb		
----	---------	---------------	--	--

Codón 249

25	Genotipo:			
	Natural:	81 pb		
	Mutado:	147 pb		

Codón 273

30	Natural:	116 pb	21 pb	
	Mutado:	137 pb		

Codón K-ras

35		12		
	Natural:	114 pb	29 pb	14 pb
	Mutado:	143 pb	14 pb	

40

Para la evaluación se forma la integral del área de 88 pb a 70 pb, 168 pb a 145 pb, 246 pb a 77 pb, 147 pb a 81 pb, 137 pb a 116 pb o 143 pb a 114 pb.

45 Ejemplo 1

*Preguntas diagnósticas*50 a) *Situación clínica de partida*

En la paciente que se investigó existía una mastopatía con sospecha de un carcinoma de mama. Se tomó una muestra de sangre.

55 b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis?

60

65

c) *Investigaciones y resultados*

	Investigación	Resultado
5	Mutación de p53 en células tumorales	NEGATIVO
	Mutación de p53 (exón 5)	NEGATIVO
	Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO
10	Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
	Mutaciones de p53 (exón 8)	NEGATIVO
15	erb-B2 después del aislamiento de células tumorales	POSITIVO
	c-myc después del aislamiento de células tumorales	POSITIVO
	ARNm de CK20	POSITIVO
20	ARNm de CEA	POSITIVO
	ARNm de MUC1	0,95
	Fracción C de ARNm de MUC1	1,40
25	ARNm de bFGF	NEGATIVO
	ARNm de bFGF-R	POSITIVO
	ARNm de VEGF	POSITIVO
30	ARNm de VEGF-R1	POSITIVO
	ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
	ARNm de TIMP3	NEGATIVO
35	ARNm de MMP2	NEGATIVO
	ARNm de progesterona-R	POSITIVO
40	ARNm de maspina	POSITIVO
	Perforina después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO

45 d) *Evaluación*

En la paciente pudieron detectarse células hematógicamente en circulación que podían ser de tipo carcinoma. Pudieron detectarse células específicas para células cancerosas que transcribían fuertemente la variante de corte y empalme específica para cáncer del gen mucina 1. Estas células también expresaron ARNm de CEA y CK20. Como estas características de expresión se encuentran en el carcinoma de mama, las células procedían con una gran probabilidad de la mama, lo que se confirmó por la expresión de maspina.

Las células tumorales pudieron concentrarse en la fracción C (MUC1) sin contaminación linfocítica (negativa para perforina). Las células detectadas también mostraron indicios de una capacidad de metastatización ya que expresaban el receptor de bFGF y VEGF, así como VEGF, todos requisitos previos de la neoangiogénesis. Las células que circulaban en la sangre expresaron el receptor de progesterona.

La amplificación de c-myc y erb-B2 indicó además un mal pronóstico. Cualitativamente se trató de un progreso de alto riesgo típico con una potencia de crecimiento extrema ya que estos genes codifican señales de crecimiento en tejido cancerígeno.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó un carcinoma diseminante con un mal pronóstico que se basó en la mastopatía.

Ejemplo 2

*Identificación de la fuente de diseminación*5 a) *Situación clínica de partida*

En el paciente que se investigó existía la sospecha de un carcinoma de colon o de próstata. Se tomó una muestra de sangre.

10

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis? ¿Procedían estas células de un carcinoma de colon o de próstata?

15

c) *Investigaciones y resultados*

20

Investigación	Resultado
K-ras después del aislamiento de células tumorales	POSITIVO
25 Mutación de K-ras (exón 1)	POSITIVO
Mutación de K-ras (exón 1)	NEGATIVO
ARNm de CK20	POSITIVO
30 ARNm de CEA	NEGATIVO
ARNm de MUC1	> 1,00
35 ARNm de gastrina	POSITIVO
ARNm de PSM	NEGATIVO
ARNm de bFGF	NEGATIVO
40 ARNm de bFGF-R	POSITIVO
ARNm de VEGF	NEGATIVO
ARNm de VEGF-R1	NEGATIVO
45 ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
ARNm de EGP	255370 (se corresponde con el 100%)
ARNm de GAPDH	125836424 (se corresponde con el 100%)
50 Fracción C de ARNm de EGP	1773 (se corresponde con el 0,7% de la fracción A)
55 Fracción C de ARNm de GAPDH	625 (se corresponde con el 0,0005% de la fracción A)

d) *Evaluación*

60

Pudieron detectarse células hematógicamente diseminantes que transcribían exclusivamente la variante de corte y empalme específica para tumor del gen MUC1 como también CK20 y por tanto pudieron asignarse al tipo carcinoma. Pudieron concentrarse en la fracción C. Las células hematógicamente diseminantes procedieron con seguridad del colon ya que pudo detectarse el ARNm de gastrina, a diferencia del ARNm de PSM específico para próstata.

65

En la fracción epitelial C también se encontró el oncogén mutado puntualmente k-ras como es típico de carcinomas de colon. Las células detectadas también mostraron indicios de una capacidad de metastatización ya que expresaban el receptor de bFGF, un requisito previo de la neoangiogénesis.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó un carcinoma diseminante que con seguridad se encontraba en la región colorrectal. Como las células expresaban el gen diana terapéutico EGP se indicó una terapia con panorex.

Ejemplo 3

*Pronóstico*a) *Situación clínica de partida*

En la paciente que se investigó existía un melanoma maligno en estado posoperatorio (Clark II-III). Se tomó una muestra de sangre.

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis? ¿Pudieron hacerse otras predicciones pronósticas al tumor?

c) *Investigaciones y resultados*

Investigación	Resultado
Mutación de p53 en células tumorales	POSITIVO
Mutación de p53(exón 5)	POSITIVO
Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO
Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
Mutaciones de p53 (exón 8)	NEGATIVO
ARNm de tirosinasa	POSITIVO
ARNm de MAGE3	POSITIVO
ARNm de Muc18	POSITIVO
ARNm de bFGF	NEGATIVO
ARNm de bFGF-R	POSITIVO
ARNm de VEGF	POSITIVO
ARNm de VEGF-R1	POSITIVO
ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
ARNm de MMP2	POSITIVO
ARNm de FAS en la fracción C	POSITIVO
ARNm del receptor de FAS en la fracción C	NEGATIVO
Perforina después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO

d) *Evaluación*

Los resultados indicaron un melanoma maligno progresivo con células hematógicamente diseminantes que podían metastatizar. La expresión de los factores de angiogénesis receptor de bFGF, receptor 1 de VEGF y VEGF, así como la capacidad de las células en circulación para la degradación de la matriz (detección de ARNm de MMP2), se indicó por la capacidad de metastatización de las células en circulación en la sangre.

En la fracción C se encontró una mutación relevante para las proteínas del oncogén p53 en el exón 5. Las células sólo expresaron el ligando de FAS, pero no el receptor de FAS; posiblemente no estaban accesibles a una citotoxicidad mediada por células (apoptosis). Se excluyó una contaminación linfocítica de la fracción C ya que no pudo detectarse perforina.

Ejemplo 4

*Pertinencia de la terapia*5 a) *Situación clínica de partida*

En la paciente que se investigó se diagnosticó un carcinoma de mama (pT1 b N1 M0). Se tomó una muestra de sangre.

10

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis? ¿Existió una quimiorresistencia?

15

c) *Investigaciones y resultados*

20	Investigación	Resultado
	Mutación de p53 en células tumorales	POSITIVO
	Mutación de p53 (exón 5)	NEGATIVO
25	Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO
	Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
	Mutaciones de p53 (exón 8)	POSITIVO
30	ARNm de CK20	POSITIVO
	ARNm de CEA	POSITIVO
	ARNm de MUC1	0,90
35	Fracción C de ARNm de MUC1	1,40
	ARNm de bFGF	NEGATIVO
40	ARNm de bFGF-R	POSITIVO
	ARNm de VEGF	POSITIVO
	ARNm de VEGF-R1	POSITIVO
45	ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
	ARNm de maspina	POSITIVO
	Prueba de doxorubicina de eflujo de MDR1	55% (ref.: 40 - 65%)
50	Bomba de MDR1 gp170	61% (ref.: 40 - 65%)
	MDR1 (genoma humano)	NEGATIVO
	Fracción C de ARNm de MDR	NEGATIVO
55	Fracción C de ARNm de MRP	NEGATIVO
	Fracción C de ARNm de GST-pi	NEGATIVO
60	Fracción C de ARNm de topoisomerasa-II	POSITIVO

d) *Evaluación*

En la paciente pudieron detectarse células hematógicamente en circulación que podían ser de tipo carcinoma. Pudieron detectarse células específicas para células cancerosas que transcribían fuertemente la variante de corte y empalme específica para cáncer del gen mucina 1. Estas células también expresaron ARNm de CEA y CK20. Como estas características de expresión se encuentran en el carcinoma de mama, las células procedían con una gran probabilidad de la mama, lo que se confirmó por la expresión de maspina.

ES 2 334 866 T3

Las células detectadas también mostraron indicios de una capacidad de metastatización ya que expresaban el receptor de bFGF y VEGF, así como VEGF, todos requisitos previos de la neoangiogénesis. Además, en la fracción de células tumorales pudo detectarse una mutación de p53 en el exón 8. Esto también es un hallazgo típico para el carcinoma de mama.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó un carcinoma capaz de metastatizar. En la paciente no existió ningún indicio de una quimiorresistencia. Debido a la expresión de la topoisomerasa detectada como gen diana, se indicó una terapia con antraciclinas.

Ejemplo 5

Antes de la quimioterapia

a) *Situación clínica de partida*

En la paciente que se investigó se diagnosticó un carcinoma de mama. La paciente no recibió quimioterapia. Se tomó una muestra de sangre.

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis? ¿Existió una quimiorresistencia?

(Tabla pasa a página siguiente)

c) Investigaciones y resultados

5	Investigación	Resultado
	Mutación de p53 en células tumorales	NEGATIVO
	Mutación de p53 (exón 5)	NEGATIVO
10	Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO
	Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
	Mutaciones de p53 (exón 8)	NEGATIVO
15	erb-B2 después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
20	c-myc después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
	ARNm de CK20	POSITIVO
25	ARNm de CEA	POSITIVO
	ARNm de MUC1	0,55
	ARNm de bFGF	NEGATIVO
30	ARNm de bFGF-R	NEGATIVO
	ARNm de VEGF	NEGATIVO
	ARNm de VEGF-R1	NEGATIVO
35	ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
	Bomba de MDR1 gp170	18% ¹⁾ (ref.: 40 - 65%)
40	MDR1 (genoma humano)	NEGATIVO
	ARNm de MDR1	POSITIVO
	ARNm de GST-pi	POSITIVO
45	ARNm de topoisomerasa-II	POSITIVO
	ARNm de MRP	POSITIVO
	ARNm de EGP	30743 (se corresponde con el 100%)
50	ARNm de GAPDH	1765600 (se corresponde con el 100%)
	Fracción C de ARNm de EGP	1
	Fracción C de ARNm de GAPDH	0
55	Fracción C de ARNm de MUC1	> 1,00
	Fracción C de ARNm de bFGF	0,00
60	1) Capacidad de unión a anticuerpo no específica (ABC): 953, ABC específica: 2935	

e) *Evaluación*

En la paciente pudieron detectarse células hematógicamente en circulación de tipo carcinoma que transcribían la variante de corte y empalme específica para cáncer del gen MUC1. También pudo detectarse la expresión de CEA y CK20. Estas características de expresión indicaron un carcinoma de mama. Como el análisis de los factores de angiogénesis anteriores resultó negativo, pudo asumirse que las células cancerosas en circulación sólo mostraron un pequeño potencial de metastatización. En la paciente no existió ninguna indicación de una quimiorresistencia.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó un carcinoma de mama diseminante sin indicios de una quimiorresistencia.

Ejemplo 6

Después de quimioterapia

a) *Situación clínica de partida*

En el caso de la paciente se trató de la misma que se describió en el Ejemplo 5. Debido al hallazgo planteado según el Ejemplo 5, la paciente se trató con una quimioterapia complementaria y con tamoxifeno. Después de finalizar la quimioterapia, se volvió a tomar sangre de la paciente.

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis?

c) *Investigaciones y resultados*

Investigación	Resultado
anti-p53	Bajo
pan p53	243 pg/ml normal hasta 646 marginal hasta 786 patológico a partir de 787
c-erb-B2	2610 HNU/ml normal hasta 3385

Investigación	Resultado
	marginal 3386 - 3845 patológico >3845
Mutación de p53 en células tumorales	NEGATIVO
Mutación de p53 (exón 5)	NEGATIVO
Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO
Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
Mutaciones de p53 (exón 8)	NEGATIVO
erb-B2 después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
c-myc después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
ARNm de CK20	NEGATIVO
ARNm de CEA	NEGATIVO
ARNm de MUC1	0,60
ARNm de bFGF	NEGATIVO
ARNm de bFGF-R	POSITIVO
ARNm de VEGF	positivo débil
ARNm de VEGF-R1	POSITIVO
ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
ARNm de TIMP3	NEGATIVO
ARNm de MMP2	NEGATIVO
ARNm de progesterona-R	POSITIVO
ARNm de EGP	232255 (se corresponde con el 100%)
ARNm de GAPDH	463040096 (se corresponde con el 100%)
Fracción C de ARNm de EGP	0
Fracción C de ARNm de GAPDH	203 (se corresponde con el 0,00004% de la fracción A)
Fracción C de ARNm de MUC1	0,00

d) Evaluación

En la paciente pudieron detectarse células hematógicamente en circulación que podían ser de tipo carcinoma.

Pudieron detectarse células específicas para células cancerosas que transcribían fuertemente la variante de corte y empalme específica para cáncer del gen mucina 1. Las células detectadas mostraron los primeros indicios de una capacidad de metastatización; expresaron ARNm de bFGF-R, VEGF y VEGF-R1; sin embargo, no pudo detectarse MMP-2. Las células que circulaban en la sangre fueron positivas para el receptor de progesterona. Entre las oncoproteínas pronosticadas pudo detectarse anti-p53; esta proteína reactiva indicó un pronóstico reducido debido a las mutaciones de p53.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó un carcinoma todavía diseminante. Sin embargo, en comparación con el hallazgo previo (antes de la quimioterapia) se presentó un cuadro claramente cambiado. Así, especialmente MUC1 ya no se detectó en la fracción C y en la fracción A los marcadores CK20 y CEA fueron negativos. Esto indicó un claro éxito de la terapia.

Ejemplo 7

a) *Situación clínica de partida*

En la paciente que se investigó existía una sospecha de carcinoma de ovario. Se tomó una muestra de sangre.

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis? ¿Existió una quimiorresistencia?

c) *Investigaciones y resultados*

Investigación	Resultado
anti-p53	NEGATIVO
pan p53	440 pg/ml normal hasta 646 marginal hasta 786 patológico a partir de 787
c-erb-82	2641 HNU/ml normal bis 3385 marginal 3386 - 3845 patológico >3845
Mutación de p53 en células tumorales	NEGATIVO
Mutación de p53 (exón 5)	NEGATIVO
Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO

Investigación	Resultado
Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
Mutaciones de p53 (exón 8)	NEGATIVO
erb-B2 después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
c-myc después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
ARNm de CK20	NEGATIVO
ARNm de CEA	NEGATIVO
ARNm de MUC1	0,35
ARNm de bFGF	NEGATIVO
ARNm de bFGF-R	NEGATIVO
ARNm de VEGF	no pudo evaluarse
ARNm de VEGF-R1	NEGATIVO
ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
ARNm de progesterona-R	positivo débil
ARNm de MDR1	POSTIV
ARNm de topoisomerasa II	NEGATIVO
Prueba de doxorubicina de eflujo de MDR1 ¹⁾	0%
Bomba de MDR1 gp170 ²⁾	0%
ARNm de glutatión-S-transferasa	POSITIVO
ARNm de MRP	POSITIVO
¹⁾ Nota sobre los parámetros: a diferencia de las células de control, los linfocitos no pudieron acumular doxorubicina. Por tanto, no fue posible la determinación de eflujo. ²⁾ Nota sobre los parámetros: en comparación con las células de control positivas no pudo detectarse una expresión de la bomba de MDRA gp 170 en los linfocitos. El análisis cuantitativo dio lo siguiente: capacidad de unión a anticuerpos no específica (ABC): 1523, ABC específica: 4165	

d) Evaluación

En la paciente pudieron detectarse células hematógicamente en circulación de tipo carcinoma que transcribían fuertemente la variante de corte y empalme específica para cáncer del gen MUC1.

Como los análisis de los factores de angiogénesis anteriores resultaron negativos, no pudieron detectarse células capaces de la neoangiogénesis, la interacción funcional de células endoteliales y epiteliales. Por tanto, las células cancerosas en circulación no mostraron capacidad de metastatización; no pudo partirse de la formación de metástasis activas. Las células en circulación en la sangre expresaron el receptor de progesterona. En la paciente no existió ninguna indicación de una quimiorresistencia.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó posiblemente un carcinoma de un órgano sensible a hormonas.

Ejemplo 8

a) *Situación clínica de partida*

En la paciente que se investigó existía una sospecha de carcinoma de mama debido a un hallazgo de mama sospechoso (tumor del tamaño de una nuez en la mamografía común). En la familia se conocían tres casos de neoplasias de mama, dos de ellas en pacientes de menos de 50 años y un caso de una neoplasia de ovario. Por tanto, existía una predisposición hereditaria a tumores. Se tomó una muestra de sangre.

b) *Pregunta*

¿Había células cancerosas en circulación en la muestra de sangre extraída que podían formar metástasis?

c) *Investigaciones y resultados*

Investigación	Resultado
anti-p53	NEGATIVO
pan p53	87 pg/ml normal hasta 646 marginal hasta 786 patológico a partir de 787
c-erb-B2	2540 HNU/ml normal hasta 3385 marginal 3386 - 3845 patológico >3845
Mutación de p53 en células tumorales	NEGATIVO
Mutación de p53 (exón 5)	NEGATIVO
Mutación de p53 (exón 6)	NEGATIVO

ES 2 334 866 T3

Investigación	Resultado
Mutaciones de p53 (exón 7)	NEGATIVO
Mutaciones de p53 (exón 8)	NEGATIVO
erb-B2 después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
c-myc después del aislamiento de células tumorales	NEGATIVO
Fracción A de ARNm de CK20	POSITIVO
Fracción A de ARNm de CEA	positivo débil
Fracción A de ARNm de MUC1	0,86
Fracción A de ARNm de bFGF	POSITIVO 909 se corresponde con el 100% (fracción A)
Fracción A de ARNm de bFGF-R	NEGATIVO
Fracción A de ARNm de VEGF	POSITIVO 72437 se corresponde con el 100% (fracción A)
Fracción A de ARNm de VEGF-R1	NEGATIVO
Fracción A de ARNm de VEGF-R2	NEGATIVO
Fracción A de ARNm de TIMP3	POSITIVO
Fracción A de ARNm de MMP2	positivo débil
ARNm de progesterona-R	NEGATIVO
Fracción A de ARNm de EGP	104097 (se corresponde con el 100%)
Fracción A de ARNm de GAPDH	153350963 (se corresponde con el 100%)
Fracción C de ARNm de CK20	NEGATIVO
Fracción C de ARNm de CEA	NEGATIVO
Fracción C de ARNm de MUC1	0,00
Fracción C de ARNm de bPGF	0,00
Fracción C de ARNm de VEGF	1738 (2,4% referido a la fracción A)
Fracción C de ARNm de TIMP3	NEGATIVO
Fracción C de ARNm de MMP2	NEGATIVO
Fracción C de ARNm de EGP	0
Fracción C de ARNm de GAPDH	108644 (se corresponde con el 0,00708% de la fracción A)

d) *Evaluación*

En la paciente pudieron detectarse pequeñas cantidades de células cancerosas hematógicamente en circulación de tipo carcinoma que transcribían fuertemente la variante de corte y empalme específica para cáncer del gen MUC1. También pudo detectarse la expresión de CK20 y CEA. Estas características de expresión indicaron un carcinoma de mama. No obstante, no pudieron concentrarse las células cancerosas en circulación.

Como los análisis de los factores de angiogénesis anteriores resultaron parcialmente positivos (expresión de bFGF y VEGF), pudieron detectarse células capaces de la neoangiogénesis, la interacción funcional de células endoteliales y epiteliales. Por tanto, las células cancerosas en circulación ya mostraron indicios de una capacidad de metastatización. Esto también lo indicó la expresión del gen MMP2. Por tanto, era muy probable la formación de metástasis activas. Las células en circulación en la sangre no expresaron el receptor de progesterona.

e) *Resumen y conclusión*

En conjunto, el hallazgo indicó un carcinoma diseminante. Las células en circulación procedieron de la mama.

Glosario

AFP (alfa-fetoproteína)

La AFP es la principal proteína plasmática en el feto. En adultos, la expresión de la AFP es muy pequeña, a menos que se presente un tumor, como un hepatoma o un teratoma.

Lit.: **Gibbs** y col.; *Biochemistry* 26: 1332-1343, 1987.

β-Actina

Lit.: **Pollard**, T.D. y **Cooper**, J.A.; *Ann. Rev. Biochem.* 55, 987 y siguientes, 1986.

Albúmina (ALB)

La albúmina sirve para identificar células de hepatoma en circulación en la sangre.

Lit.: **Minghettei** y col.; *J. Biol. Chem.* 261: 6747-6757, 1986.

AR (receptor de andrógeno)

Sinónimos: receptor de dihidrotestosterona, receptor de testosterona, TFM.

Las células de carcinoma de próstata dependen de la acción estimuladora del crecimiento del AR. En carcinomas de próstata pudieron detectarse mutaciones del receptor de andrógeno que conducen en parte a un receptor constitutivamente activo.

Lit.: **Lubahn** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(11): 9534-9538, 1989.

BA46 (antígeno epitelial de mama 46)

Sinónimo: proteína de los glóbulos de grasa de leche humana "Human Milk Fat Globule Protein"

La glicoproteína BA-46 es expresada por carcinomas de mama y se utilizó satisfactoriamente como diana de radioinmunoterapias experimentales.

Lit.: **Couto** y col.; *DNA Cell Biol.* 15: 281-286, 1996.

Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)

Sinónimo: FGF-2

El bFGF se sobreexpresa en muchos tipos de tumores y por tanto puede considerarse como un factor para la capacidad de metastatización.

Lit.: **Abraham** y col.; *EMBO J.* 5: 2523-2528, 1986.

BAX

El producto de bcl-2 se heterodimeriza *in vivo* con un homólogo conservado, el BAX, acelerándose la muerte celular programada.

Lit.: **Tsujiimoto Y. y Croce C.M.**; *PNAS*, 83 (14), 5214-5218, 1986.

bcl-2

El gen bcl-2 se descubrió en linfomas no Hodgkin foliculares (linfomas de células B). BCL-2 puede bloquear la apoptosis.

Lit.: **Tsujiimoto Y. y Croce C.M.**; *PNAS*, 83 (14), 5214-5218, 1986.

BRCA1

El gen BRCA1 es un gen supresor de tumores. En el 5-10% de las pacientes con cáncer de mama existe una clara predisposición hereditaria que frecuentemente también está asociada a una predisposición para carcinomas de ovario. Las mutaciones del gen BRCA1 están relacionadas con el 45% de los carcinomas de mama con componente hereditario. Las mutaciones en el gen BRCA1 también afectan a los carcinomas de ovario.

Lit.: **Smith T.M.**, y col.; *Genome Res.* 6, 1029-1049, 1996.

BRCA2

El gen BRCA1 es un gen supresor de tumores. Las mutaciones de este gen son responsables de una alta proporción de tumores de mama hereditarios de aparición temprana.

Lit.: **Lancaster J.M.**, y col.; *Nature Genet.* 13, 238-240, 1996.

Calcitonina

La calcitonina (32 aminoácidos) está codificada, como el “péptido relacionado con el gen de calcitonina” (“Calcitonin gene-related peptide”) (CGRP; 37 aminoácidos), por un gen, el calc-1. La calcitonina puede inhibir el crecimiento de una línea celular de carcinoma gástrica y la neurohormona CGRP puede hacer de factor de crecimiento autocrino para las líneas celulares de carcinoma murinas.

Lit.: **Adema y Baas**; *BBRC* 178: 985-992, 1991.

CC10 (proteína de 10 kD de células claras)

La CC10 sólo se expresa en células del epitelio alveolar de tipo 2 y en células claras del epitelio pulmonar y participa en la formación del “fluido del revestimiento epitelial” (“epithelial lining fluid”).

Lit.: **Am. L.** *Physiol.* 268: L565 (1995).

CCK (colecistocinina)

La CCK es una hormona cerebral e intestinal. Además, la CCK es expresada por algunas líneas celulares de sarcoma-neuroepitelioma.

Lit.: **Friedman, J.M.** y col.; *PNAS* 89: 5819-5823, 1992.

CD44

Sinónimos: antígeno de Hermes, Pgp-1.

La glicoproteína CD44 es una molécula de adhesión celular. Determinadas variantes de corte y empalme de CD44 desempeñan una función en el proceso de metastatización de tumores.

Lit.: **Matsumura, Y. y Tarin, D.**; *The Lancet* 340, 1053-1058, 1992.

CEA (*antígeno carcinoembrionario*)

Sinónimo: CD66e

El CEA se expresa en carcinomas gastrointestinales y colorrectales, pero también en distintos tumores sólidos, como carcinomas de mama, en el colon fetal, pero no en linfocitos normales. Debido a este perfil de expresión, la detección de células positivas para CEA en la sangre sirve para el diagnóstico de células tumorales en circulación. Además, los inmunoensayos de CEA son importantes procedimientos de diagnóstico en la observación de pacientes con cáncer, especialmente en el caso de carcinomas de colon.

Lit.: **Zimmermann** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2960-2964, 1987.

CK20 (*citoqueratina 20*)

Las células malignas conservan generalmente el patrón de citoqueratinas y este puede utilizarse correspondientemente para la retrolocalización de células tumorales en un epitelio. Como la CK20 no es expresada por células de la sangre periférica, sino principalmente por células del tracto gastrointestinal, esta citoqueratina sirve para la detección en la sangre de células en circulación de este origen.

Lit.: **Moll** y col.; *Differentiation* 63: 75-93, 1993; **Burchill** y col.; *British Journal of Cancer* 71:278-281, 1995.

Ciclina A, B(1), D1, D2, D3 y E

Las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) son esenciales para el control del ciclo celular de células eucariotas. La medición de las ciclinas guarda relación con el ciclo celular.

Lit.: **Motokura** T., y col.; *J. Biol. Chem.* 1992 Oct 5; 267(28): 20412-5; **Lees** E., y col.; *Genes-Dev.* 1992 Oct; 6 (10): 1874-85.

Ciclina G

La ciclina G1 y la ciclina G2 representan dos ciclinas recientemente identificadas que desempeñan una función en el ciclo celular.

Lit.: **Horne** M.C., y col.; *J. Biol. Chem.* 1996 Mar 15; 271(11): 6050-61.

DCC

En tumores colorrectales se delecionan frecuentemente secuencias del cromosoma 18 (DCC = Deleted in colorectal carcinomas (delecionado en carcinomas colorrectales)). La expresión del gen DCC está muy reducida en la mayoría de los carcinomas colorrectales. La pérdida de la región 18q está unida a un mal pronóstico. El estado del gen DCC puede determinarse mediante marcadores de microsatélites y PCR a partir de material fijado en formalina.

Lit.: **Frank** C.J., y col.; *Cancer Res.* 57, (5), 824-827, 1997.

DPC4

La denominación significa "delecionado en carcinoma pancreático" ("deleted in pancreatic carcinoma"). Aproximadamente el 90% de los carcinomas pancreáticos humanos muestra una pérdida de alelos en el cromosoma 18. Se trata de un gen supresor de tumores. En carcinomas de mama y de ovario también se descubrieron modificaciones del gen DPC4.

Lit.: **Hahn** S.A., y col.; *Science* 271, 350-354, 1996.

E-Cadherina

Catenina (α - y β -)

La E-cadherina es, junto con las cateninas asociadas (α -catenina; β -catenina), importante para la organogénesis y la histogénesis de tejido epitelial y desempeña una función importante en el proceso de metastatización de carcinomas.

Lit.: **Aberle** H., y col.; *J. Cell. Biochem.* 1996 Jun 15; 61(4): 514-23.

EGF (factor de crecimiento epidérmico)

Sinónimos: HMGF (factor de crecimiento de leche humana “human milk growth factor”); PGF (factor de crecimiento prostático “prostatic growth factor”); urogastrona.

El EGF participa en el desarrollo embrionario (células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas) y controla/estimula la proliferación de células epidérmicas y epiteliales *in vitro*. El EGF también puede actuar de factor angiogénico y quimiotáctico.

Lit.: **Carpenter**: EGF; *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 261-264, 1993.

EGF-R (receptor de EGF)

Sinónimo: SA-7 (antígeno de especies 7 “species antigen 7”)

En algunos tumores humanos, el EGF-R se sobreexpresa, lo que también guarda relación con la malignidad de tumores; resulta un mal pronóstico de la coexpresión de EGF-R con o c-erb-B2 o TGF-alfa.

Lit.: **Ibelgauf**: Dictionary of cytokines, VCH, 1994.

EGP (glicoproteína epitelial)

Sinónimos: GA733-2; antígeno 17-1A; KS1/4.

La glicoproteína epitelial puede servir de marcador específico para epitelio para la detección de carcinomas.

Lit.: **Simon**, B. y col.; *PNAS* 87: 2755-2759, 1990; **Szala**, S. y col.; *PNAS* 87: 3542-3546, 1990.

Enteroglucagón

Sinónimos: EG, glucagón 37.

El enteroglucagón es un péptido que es producido por las células del yeyuno-íleon.

Lit.: **Bell**, G.I. y col.; *Nature* 304: 368-371, 1983.

erb-B

El gen erb-B codifica el receptor (EGF-R) del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Este gen está amplificado en aproximadamente el 50% de los glioblastomas humanos avanzados.

Lit.: **Haley J.**, y col.; *Oncogene Res.* 1, 375-396, 1987.

erb-B2

Sinónimos: c-erb-B2; homólogo oncogénico 2 del virus de la leucemia eritroblástica aviar “avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2”; NGL (neuroblastoma o derivado de glioblastoma “neuroblastoma or glioblastomaderived”); neu; receptor superficial de células de tipo tirosina cinasa “tyrosine kinase-type cell surface receptor” HER2; TKR1.

El erb-B2 codifica un antígeno tumoral, P185, que es serológicamente similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R). Una sobreexpresión convierte el gen para un receptor de factor de crecimiento normal, erb-B2, en un oncogén. Una amplificación de erb-B2 se observa en adenocarcinomas, en cáncer de mama y de ovario. El erb-B2 participa además en el desarrollo de leucemia promielítica aguda (APL) ya que el gen está localizado en la banda q21.1 del cromosoma 17, en la que también se encuentra el punto de rotura de la translocación entre el cromosoma 15 y 17 (t15:17).

Lit.: **Slamon** y col.; *Science* 244: 707-712, 1989.

FAP (APC)

El gen de la poliposis adenomatosa familiar, una enfermedad autosómica dominante, es fap.

Lit.: **Groden** j. y col.; *Cell* 66: 589-0, 1991.

ES 2 334 866 T3

FAS-R; FAS-L (CD95, CD95-L)

FAS pertenece al grupo de los factores desencadenantes de apoptosis.

- 5 Lit.: **Alderson** M.R.; *J. Exp. Med.* 181, (1), 71-77, 1995; **Itoh** N.; *Cell* 66, (6), 233-243, 1991.

Receptores de FGF

- 10 Sinónimos: tirosina cinasa 2 similar a fms “fms-like tyrosine kinase-2”; FLT2; gen similar a FMS “FMS-like gene”; FLG (bFGF-R1); K-SAM, bek (FGF-R2).

Una expresión diferente y el corte y empalme alternativo pueden ser críticos en la progresión maligna de tumores.

- 15 Lit.: **Yamaguchi** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 484-488, 1994.

c-fos

- 20 A los genes c-fos y c-jun les corresponde una importancia central en el marco de la regulación del crecimiento.

Lit.: **Ekstrand** A.J., y col.; *Exp. Cell. Res.* 169, 262-266, 1987.

25 *GADD45*

Gadd45 es un gen de parada del crecimiento e inducido por lesiones del ADN que está regulado por el gen supresor de tumores p53.

- 30 Lit.: **Constance**, C.M. y col.; *Mol-Cell-Biol.* 1996 Jul; 16(7): 3878-83 **Crawford**, D.R. y col.; *Arch-Biochem-Biophys.* 15 de mayo de 1996; 329(2): 137-44.

GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa)

- 35 Este gen se expresa en todas las células. La expresión de este gen guarda relación con el número de células y sirve para la determinación cuantitativa y cualitativa de ADNc.

- 40 Lit.: **Allen**, R.W. y col.; *J. Biol. Chem.* 262 (2), 649-653, 1987.

Gastrina (GAS)

- 45 La gastrina se produce particularmente por las células de la mucosa del estómago y las células D en el páncreas.

Lit.: **Boel**, E. y col.; *PNAS* 80: 2866-2869, 1983.

GD-AIF (factor inhibidor de la angiogénesis derivado de glioma “Glioma-Derived Angiogenesis inhibitory Factor”)

- 50 El GD-AIF pertenece, al igual que la trombospondina y la angiostatina, a los reguladores negativos endógenos de la angiogénesis. El grado en el que los reguladores negativos disminuyen durante la fase de cambio al fenotipo angiogénico de la tumorigénesis decide si un tumor primario crece lentamente o rápidamente y si se forman metástasis.

- 55 Lit.: **Folkman** J.; *Nat. Med.* 1 (1995) 27-31.

GIP (polipéptido inhibidor gástrico “Gastric inhibitory polipeptide”)

- 60 Sinónimo: polipéptido insulínico dependiente de glucosa “Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide”

Esta hormona se produce particularmente por células del intestino delgado superior.

- 65 Lit.: **Inagaki**, N. y col.; *Molec. Endocr.* 3: 1014-1021, 1989.

GST-pi (glutación-S-transferasa-pi)

La GST-pi codifica un enzima desintoxicante y por tanto desempeña una función en el desarrollo de tumores quimiorresistentes. Después de la quimioterapia pudo observarse un aumento de la expresión en tumores, lo que va acompañado de un pronóstico con desfavorable y quimiorresistencia.

Lit.: **Morrow** y col.; *Gene* 75: 3-11, 1989.

Granzima

La función principal de las granzimas se encuentra en la lisis de células tumorales y células infectadas por virus mediante una fragmentación apoptótica de ADN.

Lit.: **Kummer**, J.A. y col.; *Kidney Int.* 47: 70-77 (1995).

hCG (gonadotropina coriónica humana)

La subunidad β de la hCG sirve de marcador para tumores de la línea germinal y coriocarcinomas y la detección de ARNm de hCG mediante RT-PCR también es útil en el diagnóstico de carcinomas de mama metastatizados y melanomas malignos.

Lit.: **Doi** F. y col.; *Int. J. Cancer* 65 (1996) 454-459.

HIC-1 (hipermetilado en cáncer "hypermethylated in cancer")

El HIC-1 se considera un posible producto génico supresor de tumores. En células tumorales, en las que está hipermetilado, se realiza una subexpresión.

Lit.: **Wales** M. M., y col.; *Nat. Med.* 1 (1995) 570-577.

HSP70

Las proteínas de choque térmico como HSP70 pueden desempeñar una función en "mecanismos de escape" de células tumorales.

Lit.: **Kaur** J. y **Ralhan** R.; 63(6): 774-9.

hTG (tiroglobulina humana)

La hTG es una proteína de las glándulas tiroideas. Se identificaron cuatro transcritos que son la consecuencia de cortes y empalmes alternativos.

Lit.: **Bertaux** y col.; *Gene* 156: 297-301, 1995.

ICAM (moléculas de adhesión intercelular)

Sinónimos: ICAM-1 (CD54, ICAM1-1); ICAM-2 (CD102); ICAM-3.

Las ICAM-1, -2, y -3 son moléculas de la superficie celular y sirven de ligandos de las integrinas leucocitarias.

IGF (factor de crecimiento similar a la insulina "Insulin-like growth factor")

Sinónimos: MSA (actividad estimuladora de la multiplicación "multiplication-stimulating activity"); somatomedina; NSILA (actividad similar a la insulina no suprimible "non-suppressible insulin-like activity"); SF (factor de sulfatación "sulfation factor"), SFA, SGF (factor de crecimiento esquelético "Skeletal growth factor"), SMP.

Los IGF actúan de factores mitogénicos, autocrinos y angiogénicos.

Lit.: **Cohick** y **Clemmons**; *Annual Review of Physiology* 55: 131-153, 1993.

ES 2 334 866 T3

IGF-BP3 (proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina “Insulin-like growth factor binding protein 3”)

Sinónimos: IGBP; IBP; BP-53; proteína de unión dependiente de la hormona de crecimiento “growth hormone dependent binding protein”; proteína de unión 29 “binding protein 29”.

El IGF-BP3 hace de inhibidor del crecimiento.

Lit.: **Lamson**; *Growth factors* 5: 19-28, 1991.

Integrinas

Las integrinas son antígenos de la superficie celular heterodímeros que participan en interacciones célula-célula y célula-matriz.

Lit.: Vth International Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop and Conference, Kobe (Japón), noviembre de 1996.

Interferón-gamma

Sinónimos: interferón inmunitario “Immune interferon”; interferón tipo 2 “type 2 interferon”; interferón T “T interferon”; interferón inducido por antígeno “antigen-induced interferon”; interferón inducido por mitógeno “mitogen-induced interferon”; interferón lábil a pH2 “pH2-labile interferon”.

Lit.: **Gray** y col.; *Nature* 295: 503-508, 1982; **Ibelgauf**s: Dictionary of cytokines. *VCH* 1994.

LOH

La inactivación de genes supresores de tumores es una etapa crítica en la oncogénesis. Los mecanismos frecuentes son tanto mutaciones inactivadoras como la pérdida genómica de todo el gen, o partes del gen. La pérdida genómica de secciones de cromosomas puede comprenderse experimentalmente mediante la “pérdida de la heterocigosidad” (Loss of Heterozygosity = LOH). En este caso, en el tejido normal de un paciente se encuentran ambos alelos del gen supresor de tumores, mientras que en el tumor tan sólo puede detectarse un alelo. Para la identificación de los dos alelos sirven zonas cromosómicas altamente polimórficas localizadas en o en la proximidad del gen supresor de tumores (repeticiones de microsatélites) que se amplifican por una PCR. En este caso se trata de repeticiones de secuencias de nucleótidos cortas (por ejemplo, repeticiones de CA, repeticiones de CGG) siendo diferente el número de copias y presentando por tanto el producto amplificado en la PCR longitudes diferentes.

L32

Debido a la expresión ubicua de L32 es adecuado como gen diana para cuantificaciones.

Lit.: **Young**, J.A. y **Trowsdale**, J.; *Nucleic Acids Res.* 13 (24), 8883-8891, 1985.

LRP

Sinónimos: proteína-tirosina-fosfatasa; alfa-polipéptido; PTPRA; PTPA.

La Lrp codifica una proteína tirosina-cinasa ubicuamente expresada.

Lit.: **Jirik** y col.; *FEBS Lett.* 273: 239-242, 1990.

MAGE1 (antígeno 1 asociado a melanoma “Melanoma associated antigen-1”)

Sinónimo: MZ2-E

El gen MAGE1 codifica un antígeno sobre la superficie de células de melanoma. Mientras que MAGE1 puede detectarse a un alto nivel en muchos tumores en el plano del ARN, el ARN no se encuentra en tejidos normales, con la excepción de los testículos y el ovario. Este producto génico también es extraordinariamente adecuado como marcador para células tumorales en circulación, especialmente células de melanoma.

Lit.: De **Plaen** y col.; *Immunogenetics* 40: 360-369, 1994.

ES 2 334 866 T3

MAGE3 (antígeno 3 asociado a melanoma “Melanoma associated antigen-3”)

El gen que codifica MAGE3 se transcribe en aproximadamente el 69% de los melanomas. Como hasta la fecha sólo se había encontrado en tejido tumoral y, aparte de los testículos, en ningún tejido normal, este gen es adecuado como marcador para células de melanoma en circulación.

Lit.: **Gaugler** y col.; *J. Exp. Med.* 179: 921-930, 1994.

Maspina

En el caso de la maspina se trata de un gen supresor de tumores. Los defectos en este gen se encuentran especialmente en células de carcinoma de mama.

Lit.: **Luppi** y col.; *Annals of Oncol.* 7: 619-624, 1996.

mdm2

El efecto oncógeno de un aumento de la actividad de MDM2 se hace notar en una inactivación de la inhibición del crecimiento inducida por p53. Acorde con esto, en tumores humanos se encuentra una sobreexpresión de mdm2.

Lit.: **Zaubermann** y col.; *Nucleic Acids Res.* 23: 2584-2592, 1995.

β2-Microglobulina

La β2-microglobulina se expresa en todas las células que contienen núcleo de los vertebrados.

Lit.: **Williams**, A.F. y **Barclay**, A.N.; *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381; 1988.

MLH1

Sinónimos: FCC2; COCA2; CCHNP (cáncer colorrectal hereditario no poliposo de tipo 2 “Hereditary Nonpoliposis colorectal cancer Type 2”).

Las mutaciones del gen MLH1 son responsables de aproximadamente el 30% de una forma hereditaria de carcinoma de colon (cáncer colorrectal hereditario no poliposo = CCHNP). Pero aproximadamente el 60% de los casos de CCHNP son causados por mutaciones en el gen MSH2 en el cromosoma 2. Se aislaron otros dos genes humanos que son homólogos a MutL: pms-1 y pms-2. No obstante, éstos participan más raramente en la génesis de tumores que msh2 y mlh1.

Lit.: **Bellacosa** y col.; *Am. J. Med. Genet.* 62: 353-364, 1996.

MMP (metaloproteinasa)

Las MMP son endopeptidasas de unión a Zn^{2+} que descomponen componentes de la matriz extracelular. Participan en la angiogénesis y la invasión tumoral. Existen como mínimo 11 MMP.

Una sobreexpresión de metaloproteinasas requiere la invasión y la metástasis de tumores. Algunas de estas metaloproteinasas son fuertemente expresadas por células tumorales tanto en la superficie celular como al nivel de ARNm.

Lit.: **Freije** y col.; *J. Biol. Chem.* 269: 16766-16773, 1994; **Sato** y col.; *Nature* 370: 61-65, 1994.

Motilina (MLN)

La motilina es una hormona producida por células del intestino delgado.

Lit.: **Daikh**, D.I y col.; *DNA* 8: 615-621; 1989.

ES 2 334 866 T3

MRP1 (proteína 1 asociada a resistencia a múltiples fármacos “Multidrug Resistance-Associated protein-1”)

El gen MRP codifica una bomba de eflujo para agentes antineoplásicos localizada en la membrana plasmática con similitudes a la superfamilia del “casete de unión a ATP” (“ATP-binding cassette”) de sistemas de transporte a la que también pertenece el MDR1 y el “regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística” (“cystic fibrosis transmembran conductance regulator”). En una línea celular quimiorresistente del carcinoma de pulmón de células pequeñas pudo detectarse una sobreexpresión de MDR1 que se atribuyó a una amplificación genómica del gen.

Lit.: **Cole** y col.; *Science* 258: 1650-1654, 1992.

MSH2

Este gen desempeña una función en tumores que se desarrollan en pacientes con cáncer colorrectal hereditario no poliposo (CCHNP). Las mutaciones de MSH2 se encontraron en el 21% de las familias de CCHNP afectadas.

Lit.: **Fishel** R., y col.; *Science* 266, 1403-1405, 1994.

MUC1 (mucina 1)

Sinónimo: urinario (“urinary”).

El gen MUC1 codifica una glicoproteína transmembrana que se forma por células tumorales para proteger de células inmunitarias citotóxicas y para impulsar la metastatización. La MUC1 es sintetizada por tejidos y células normales, pero también por células y tejidos malignos. Por ejemplo, las células de cáncer de mama, cáncer de páncreas y adenocarcinoma muestran una sobreexpresión de la proteína de MUC1; además, en algunos tipos de cáncer se detecta una variante de corte y empalme específica para tumor, además de la variante “normal”.

Lit.: **Weiss** y col.; *Int. J. Cancer* 66: 55-59, 1996.

Muc18

La Muc18 codifica una glicoproteína cuya expresión se limita a melanomas primarios y metastatizantes avanzados, así como a líneas celulares de la línea neuroectodérmica. En aproximadamente el 80% de los melanomas se encuentra una expresión de ARNm guardando la expresión una relación con el estado de metastatización de las células. La presencia de células en la sangre que expresan este ARNm es una buena indicación de células tumorales en circulación de un melanoma avanzado o metastatizante.

Lit.: **Lehmann** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9891-9895, 1989.

myc

Sinónimo: proto-oncogén homólogo al virus de la mielocitomatosis; c-myc.

La amplificación de c-myc se encuentra en tumores primarios avanzados y en invasores.

Lit.: **Adams** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1982-1986, 1983.

N-CoR

La N-CoR representa una proteína co-represora para el receptor β de ácido retinoico.

Lit.: **Soderstrom** y col.; *Mol. Endocrinol.* 11:682 (1997).

Neurotensina (NTS)

La neurotensina es un pequeño neuropéptido localizado en las neuronas que contienen catecolamina.

Lit.: **Bean**, A.J. y col.; *Neuroscience* 50: 259-268, 1992.

NF-1

En el caso del gen NF1 se trata de un gen supresor de tumores. El producto del gen de la neurofibromatosis 1 es la neurofibromina o NF1-GAP. En 10 familias con neurofibromatosis (enfermedad de von Recklinghausen) se encontraron mutaciones de NF-1.

Lit.: **Marchuk** D.A., y col.; *Genomics* 11, 931-940, 1991.

NF-2

Sinónimo: merlina.

Los defectos del gen supresor de tumores de NF-2 se encontraron en neurofibromatosis de tipo II, una enfermedad maligna hereditaria con tumores bilaterales del 8º nervio craneal, neurofibromas, meningiomas, gliomas o schwannomas y también en meningiomas esporádicos, schwannomas y además en melanomas y carcinomas de mama.

Lit.: **Trofatter** y col.; *Cell* 72: 791-800, 1993.

nm23

El gen nm23-H1 representa un posible supresor de metástasis. La expresión se comporta inversamente proporcional a la formación de metástasis de ganglios linfáticos.

Lit.: **Royds** JA., y col.; *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 727-31, 1993.

ER (receptor de estrógeno)

Sinónimo: ER.

Además de su función como importante regulador del crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria y del tracto reproductor femenino, el receptor de estrógeno desempeña una función en el desarrollo de carcinomas de mama. Por tanto, el contenido de un tumor de receptor de estrógeno y progesterona es un marcador pronóstico importante para el éxito de la terapia endocrina.

Se describieron distintas variantes de corte y empalme del receptor de estrógeno a las que se les atribuye una función en la oncogénesis o metastatización. Así, entre otras, en las líneas celulares de cáncer de mama y tumores se encontró una variante del receptor de estrógeno a la que le falta el exón 5.

Lit.: **Greene** y col.; *Science* 231: 1150-1154, 1986.

P-Glicoproteína (MDR1)

Sinónimos: PGY-1; MDR1; GP170; gen de resistencia a doxorubicina "Doxorubicin Resistance Gene"; gen de resistencia a múltiples fármacos "Multidrug Resistance Gene".

El gen *mdr1* codifica una bomba de eflujo localizada en la membrana apical para citostáticos. En el tratamiento de tumores con agentes antineoplásicos frecuentemente se produce simultáneamente una "resistencia a múltiples fármacos" ("multi drug resistance") contra muchos fármacos estructuralmente distintos. Experimentalmente, bajo la acción de agentes antineoplásicos pudo observarse una amplificación del locus de *mdr1*. En las líneas celulares con quimiorresistencia existente se encontró un aumento de la expresión de este gen.

Lit.: **Gros** y col.; *Cell* 47: 371-380, 1986.

p16

Sinónimos: p16(INK4) o CDKN2; MTS1.

Con p16 se designa al inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas. Las deleciones de *mts1* son características en una pluralidad de tumores. En melanomas se descubrieron tanto deleciones como mutaciones de este gen. La frecuencia de las deleciones del gen CDKN2 en células tumorales indica un gen supresor de tumores.

Lit.: **Stone** S., y col.; *Cancer Res.* 55, 2988-2994, 1995.

p21

p21 se refiere al inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas humano.

5 Lit.: **Harper J.W.**, y col.; *Cell* 75 (4), 805-16, 1993.

p53

10 Las mutaciones en el gen p53 pertenecen a las modificaciones genéticas más frecuentes en tumores malignos en los seres humanos. En la mayoría de estos tumores se encuentra la pérdida de un alelo del gen p53 (carcinoma de mama (32-64%), carcinoma de ovario (44-66%); carcinoma de estómago (>60%); carcinoma de vejiga (38-58%); carcinoma de páncreas (70%); carcinoma de pulmón (20%); carcinoma de próstata (59%); carcinoma de cuello de útero (50%)). Las mutaciones se encuentran repartidas por toda la longitud de la proteína habiendo una acumulación en los exones 5 a 8 y en este caso con frecuencia todavía están afectados algunos exones (codones 175, 245, 248, 249, 273). La frecuencia de estas mutaciones de hipermutabilidad es diferente dependiendo del órgano de origen del tumor. Las mutaciones en el codón 175 se encuentran, por ejemplo, en el 6% de los carcinomas de mama, el 14% de los tumores colorrectales y el 4% de los carcinomas de ovario. Se trata casi exclusivamente de mutaciones puntuales que se producen en una amplia región del gen.

20 Lit.: **Levine A.J.**; *Nature* 351, 453, 1991.

PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas "Platelet-derived growth factor")

25 Sinónimos: factor FDGF; GDGF; GDGF-1; GDGF-2; GSM; MDF; MDGF; ODGF; T47D.

El PDGF es un factor de crecimiento local, autocrino y paracrino de acción quimiotáctica, un potente vasoconstrictor y factor de angiogénesis.

30 Lit.: **Westermarck** y **Sorg**; Biology of platelet-derived growth factor. *Karger, Basel* 1993.

Péptido YY

35 Sinónimo: PYY.

El PYY se sintetiza endocrinamente por células del intestino delgado, del colon y del páncreas.

Lit.: **Hort, Y.** y col.; *Genomics* 26: 77-83, 1995.

40

Perforina-1

45 Sinónimos: Citolisina; proteína relacionada con C9 "C9-related protein"; proteína formadora de poros "pore-forming protein"; PFP.

La perforina-1 pertenece a una clase de proteínas citolíticas que permeabilizan las membranas de las células diana.

Lit.: **Ojcius** y **Young**; *TIBS* 16: 225-229, 1991.

50

PR (receptor de progesterona)

Sinónimo: PGR.

55 Una alto contenido de receptor de progesterona es un carcinoma de mama es un marcador pronóstico de la respuesta a una terapia endocrina y una supervivencia más larga. Acorde con esto, la progesterona tiene una acción protectora en comparación con el cáncer de mama. El análisis del receptor de progesterona en carcinomas de mama es especialmente interesante ya que también puede determinarse indirectamente la presencia del receptor de estrógeno.

60 Lit.: **Misrahi** y col.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 740-748, 1987.

PSM (antígeno prostático específico de membrana)

65 Las células de próstata normales y neoplásicas expresan PSM.

Lit.: **Israeli** y col.; *Cancer Res.* 53: 227-230, 1993.

PSA (antígeno prostático específico)

Sinónimo: APS.

El nivel de PSA se mide en radioinmunoensayos para el diagnóstico y la supervisión de carcinomas de próstata.

Lit.: **Lundwall** y col.; *FEBS Lett.* 214: 317-322, 1987.

Ras

Los genes celulares de la familia de genes ras se denominan según los oncogenes retrovirales correspondientes. Sus nombres son: c-Harvey-ras (c-H-ras), c-Kirsten-ras (c-K-ras) y N-ras (descubierto en neuroblastomas).

Las mutaciones en los codones 12, 13 y 61 se encuentran tanto en tumores sólidos como en hemopoyéticos. Las mutaciones RAS pueden detectarse frecuentemente en carcinomas de páncreas, de glándulas tiroideas y colorrectales. La mayoría de las mutaciones en tumores colorrectales son transiciones G-A, lo que permite sacar conclusiones sobre los agentes alquilantes.

Lit.: **Bos J.L.**; *Cancer Res.*, 49, 4682-9, 1989.

RB (retinoblastoma)

La pérdida o la inactivación del gen RB es decisiva para la génesis de retinoblastomas. La pérdida de la función del gen en ambos alelos conduce a la oncogénesis. Pueden usarse microsatélites y RFLP en retinoblastoma familiar para el diagnóstico de ADN.

Lit.: **Friend S.H.**, y col.; *PNAS* 84, (24) 9059-63, 1987.

RET

El oncogén de RET se transpone frecuentemente en carcinomas de glándulas tiroideas papilares y se recombina con otro gen. En pacientes con neoplasia endocrina múltiple de tipo MEN 2A, como también en pacientes con carcinoma de glándulas tiroideas familiar (FMTC), se detectaron en un alto porcentaje mutaciones de la línea germinal del oncogén de RET.

Lit.: **Viglietto-G** y col.; *Oncogene* 1995 Sep 21, 11(6): 1207-10.

SCCA-1 (antígeno 1 de carcinoma de células escamosas "Squamous Cell Carcinoma Antigen-1")

La proteína SCCA-1 se aisló a partir de un carcinoma "de células escamosas" ("Squamous-Cell") de cuello de útero metastásico. La SCCA-1 se usa como marcador para carcinomas epiteliales escamosos, especialmente de cuello de útero, de la garganta y el cuello, de pulmón y de esófago, guardando la cantidad de antígeno en la sangre una relación con la progresión.

Lit.: **Schneider** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 3147-3151, 1995.

P-, L- y E-Selectinas

Las selectinas son glicoproteínas transmembrana que se expresan en distintos tipos de células como plaquetas (P-selectina); leucocitos (L-selectina) y células endoteliales (E- y P-selectina). El patrón de expresión de las selectinas y sus ligandos sobre células permite sacar conclusiones sobre el comportamiento de recirculación de las células correspondientes.

Lit.: **Springer**, T.A. y col.; *Cell* 76: 301-314, 1994.

SF (factor de dispersión)

Sinónimo: factor de crecimiento de hepatocitos "Hepatocyte growth factor" (HGF).

El SF se expresa principalmente en células mesenquimales, estroma y fibroblastos y es un potente factor de angiogénesis y motilidad que como factor autocrino de células tumorales puede impulsar su invasividad y la oncogénesis.

Lit.: **Nakamura** y col.; *Nature* 342: 440-443, 1989; **Bellusci** y col.; *Oncogene* 9: 1091-1099, 1994.

Receptor de SF c-met

Sinónimos: proto-oncogén met.

5 Al proto-oncogén c-met le corresponde una función importante en la oncogénesis.

Lit.: **Park** y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6379-6383, 1987.

10 *STATS (transducción de señales y activador de la transcripción 5 “Signal transduction and activator of transcription 5”)*

Las STAT son una familia de proteínas que tanto ejercen la función de transducción de señales como son activadores de la transcripción.

15 Lit.: **Darnell**; *PNAS* 93: 6221-6224, 1996.

Proteínas tensioactivas

20 Sinónimos: proteína tensioactiva “Surfactant Protein” (SP)-A, -B, -C; -D.

La proteína tensioactiva A sólo es expresada, por ejemplo, por células epiteliales alveolares de tipo II y células claras en tejido pulmonar y la SP-C sólo exclusivamente por células alveolares de tipo II. Existen varias proteínas tensioactivas (A1 y A2, B, C y D) cuya expresión (por ejemplo, ARNm) se describió en adenocarcinomas metastásicos, micrometastásicos, pulmonares y extrapulmonares, carcinomas de pulmón de células no pequeñas y carcinomas de mama.

30 Lit.: **Betz** y col.; *Cancer Res.* 55: 4283-4286, 1995.

Telomerasas

Las telomerasas definen los extremos de los cromosomas.

35 Lit.: **Morin** G.B., y col.; *Nature* 353, 454-456, 1991. **Blackburn** E.H.; *Nature* 350, 569-573, 1991.

40 *TGF-alfa (factor de crecimiento transformante alta “Transforming growth factor alfa”)*

Sinónimos: MDGF-2 (factor de crecimiento 2 derivado de la leche “milk-derived growth factor 2”); TGF-1; TCGF (factor de crecimiento de células transformadas “transformed cell growth factor”).

45 El TGF-alfa es expresado por un gran número de carcinomas y líneas celulares transformadas (por oncogenes virales o celulares). Puede actuar de factor de crecimiento autocrino en carcinomas de ovario o de factor de crecimiento hematopoyético y desempeñar una función en la vascularización de tejido tumoral.

Lit.: **Derynck**; *Advances in Cancer Research* 58: 27-52, 1992.

50 *TIMP (inhibidores de tejido de metaloproteinasas “Tissue inhibitors of metalloproteinases”)*

Los TIMP pertenecen a una familia de los inhibidores que inhiben la actividad de metaloproteinasas, por lo que contrarrestan la desintegración de tejido y también participan en la invasión y la metástasis de células de carcinoma en el tejido.

Lit.: **Apte** y col.; *Genomics* 19: 86-90, 1994.

60 *TNF-alfa (factor-alfa de necrosis tumoral)*

Sinónimos: caquectina; TNF derivado de monocitos/macrófagos “Monocyte/Macrophage-derived TNF”; citotoxina (CTX); pirógeno endógeno “endogenous pyrogen”; TNF-a.

65 El TNF-alfa ejerce un efecto citotóxico y apoptótico directo sobre células tumorales.

Lit.: **Wang** y col.; *Science* 228: 149-154, 1985.

TNF-R1 p55

Sinónimos: CD120a; TNF-R citotóxico.

- 5 El TNF-R1 representa el receptor 1 del factor de necrosis tumoral humano y media principalmente en la citotoxicidad y la apoptosis.

Lit.: **Loetscher** H., y col.; *Cell* 61, 351-59, 1990.

10

TNF-R2 p75

Sinónimo: C120b; TNFBR.

- 15 El TNF-R2 media principalmente en la activación de células T.

Lit.: **Beltinger** C.P.; *Genomics* 35, 94-100, 1996.

20 *Topoisomerasa II*

Sinónimos: TOPO; TOP2A; topoisomerasa alfa.

- 25 Las topoisomerasas de ADN son enzimas dependientes de ATP que controlan en estado topológico del ADN. Puede encontrarse una quimiorresistencia en aquellos tumores en los que la actividad de la topoisomerasa es reducida, como por ejemplo por una expresión reducida. Además, se aisló una mutación del gen de la topoisomerasa a partir de líneas celulares quimiorresistentes que produce que la enzima ya no pueda ser inhibida por el agente antineoplásico.

- 30 Lit.: **Hinds** y col.; *Cancer Research* 51: 4729-4731, 1991.

Translocaciones y transposiciones

35 *Transposiciones de receptores de células B y T*

En el transcurso de la diferenciación de células B se transponen los genes de inmunoglobulina (Ig) y durante la maduración de las células T el receptor de células T (TCR). Si en la sangre de un paciente se encuentra una multiplicación de una célula T, ésta puede identificarse detrás del fondo policlonal de todos los linfocitos T restantes.

40

Lit.: **Trainor** y col.; *Blood*, 78, 192-196, 1991. **Lehman** y col.; *Hematopathology*, 103, 171-176, 1995.

Translocación (14;18)

45

Esta translocación es la más frecuente en linfomas humanos.

Se encuentra en más del 80% de los linfomas foliculares, en aproximadamente el 20% de los linfomas difusos de células grandes y en aproximadamente el 50% de los linfomas sin diferenciar adultos.

50

Lit.: **Barker** y col.; *Blood*, 83, 1079-1085, 1994.

Translocación (9;22)

55

Sinónimos: cromosoma Philadelphia, BCR/ABL.

El cromosoma Philadelphia se produce por una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 que se observa en aproximadamente el 90% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en las células tumorales. En una menor incidencia, esta transposición también se encuentra en leucemias linfáticas agudas. Sólo resultan 3 posibles transcritos de fusión distintos que pueden utilizarse para la detección de una LMC o "enfermedad mínima residual".

60

Lit.: **Maurer** y col.; *The Lancet*, 337, 1055-1058, 1991.

65

Translocaciones (2;13) y (1;13)

En el 68% de los rabdomiosarcomas alveolares, la translocación (2;13) se encuentra como una anomalía citogenética específica en la que participan los genes de los factores de transcripción PAX3 (cromosoma 2) y FKHR (cromosoma 13). El 14% de los rabdomiosarcomas alveolares presenta la translocación (1;13), participando el gen PAX7 en el cromosoma 1 en lugar del gen PAX3 en el cromosoma 2.

Lit.: **Sreekantaiah** y col.; *American J. Pathol.*, 144: 1121-1134, 1194.

Translocación (x;18)

Esta translocación se encuentra en el 91% de todos los sarcomas sinoviales. Participan el gen SSX del cromosoma X y el gen SYT del cromosoma 18, que conduce a un transcrito de fusión que supuestamente ocupa una posición clave en el desarrollo de tumores.

Lit.: **Clark** y col.; *Nature Genetics*, 7, 502-508, 1994.

Translocación (12;16)

En esta translocación, que se produce en el 77% de todos los liposarcomas mixoides, participan los genes del factor de transcripción CHOP (cromosoma 12) y el gen FUS (cromosoma 16), cuya función es desconocida hasta la fecha.

Lit.: **Rabbits** y col.; *Nature Genetics*, 4, 175-180, 1993.

Translocación (11;22)

Esta translocación se encuentra en el 86% de todos los sarcomas de Ewing y tiene como consecuencia la formación de un transcrito de fusión que está constituido por el gen EWS (cromosoma 22) y el gen FLI (cromosoma 11).

Lit.: **West** y col.; *J. Clin. Oncol.*, 15, 583-588, 1997.

α - y β -Tubulina

Las tubulinas representan los constituyentes monoméricos del citoesqueleto.

Lit.: *J. Biol. Chem.* 272:2534 (1997).

Tirosinasa

La tirosinasa es una enzima clave de la síntesis de melanina que se expresa exclusivamente en melanocitos y células de melanoma. Por tanto, la detección de las células que expresan tirosinasa en la sangre indica la presencia de células de melanoma en circulación en la sangre.

Lit.: **Giebel** y col.; *Genomics* 9. 435-445, 1991.

UPA (activador de plasminógeno tipo urocinasa)

y

PAI-1 (inhibidor-1 del activador de plasminógeno)

El UPA es una enzima proteolítica cuya expresión guarda relación con una elevada invasividad, angiogénesis asociada a tumor y metastatización. Su actividad se regula por un inhibidor (PAI-1). Las investigaciones, entre otros, en carcinoma de mama primario y carcinoma de estómago han mostrado que altos niveles de UPA van acompañados de un mal pronóstico. Acorde con esto, en células tumorales invasoras no se encuentra expresión de PAI-1. El equilibrio de UPA y PAI-1 también forma un parámetro pronóstico para la capacidad de metastatización y angiogénesis de un tumor.

Lit.: **Ito** y col.; *Virchows Arch.* 427:487-497, 1996.

VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)

Sinónimos: VPF; factor de permeabilidad vascular “vascular permeability factor”; vasculotropina “vasculotropin”; CD(derivado de glioma)-VEGF “CD(glioma-derived)-VEGF”.

El VEGF puede aparecer en cuatro formas como consecuencia de cortes y empalmes alternativos de ARNm, concretamente VEGF121 y VEGF165, así como VEGF189 y VEGF206. Parece que el VEGF desempeña una función importante en el control de la formación y la permeabilidad de los vasos sanguíneos y además parece que es un regulador principal de la angiogénesis de tumores.

Lit.: **Leung** y col.; *Science* 246: 1306-1309, 1989. **Tischer** y col.; *J. Biol. Chem.* 266: 11947-11954, 1991.

VEGF-R1 (receptor 1 de VEGF)

Sinónimos: tirosina cinasa 1 similar a FMS “FMS-like Tyrosine kinase-1”; receptor del factor de crecimiento endotelial vascular flt1/factor de permeabilidad vascular “flt1 vascular endothelial growth” factor/vascular permeability factor receptor; oncogén flt “oncogene flt”.

Se ha descrito reiteradamente una elevada expresión de VEGF-R1 en carcinomas.

Lit.: **Shibuya** y col.; *Oncogene* 5: 519-524, 1990.

VEGF-R2 (receptor 2 de VEGF)

Sinónimos: KDR; receptor del factor de crecimiento de tirosina cinasa “Tyrosine kinase growth factor receptor”; receptor FLK-1 para el factor de crecimiento endotelial vascular “FLK-1 receptor for vascular endothelial growth factor”; FLK1; receptor del dominio de inserto de cinasa “kinase insert domain receptor”.

La regulación por incremento de ARNm de VEGF en células tumorales y el ARNm de sus receptores en la vasculatura tumoral guarda relación con una elevada malignidad del tumor. El VEGF-R2 se transcribe además en células tumorales de melanoma y de ovario.

Lit.: **Terman** y col.; *Oncogene* 6: 1677-1683, 1991; **Boockock** y col.; *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 506-516, 1995.

VHL (síndrome de von Hippel-Lindau)

El producto génico de VHL es una proteína supresora de tumores que en mutaciones hereditarias conduce a carcinomas de riñón, hemangiomas del cerebelo y la retina, feocromocitomas y ependimomas. También pudo mostrarse una participación en la génesis de tumores espontáneos.

Lit.: **Latif** y col.; *Science* 260: 1317-1320, 1993.

Oncogenes virales

De gran importancia para la oncogénesis viral son los virus de la hepatitis B y C, opcionalmente también SV40, con respecto a carcinomas de células hepáticas, el virus HTLV-1 en relación con linfomas de células T, el virus de Epstein Barr (EBV) en relación con linfomas de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos y la enfermedad de Hodgkin y el virus del papiloma humano de los tipos 16 y 18 en relación con carcinomas en la región uretrogenital, especialmente de cuello de útero.

Además, se tratan virus del herpes de los tipos 4 y 6 y el virus de HI en relación con la génesis de tumores.

Lit.: **Mueller M.**; *Environ. Health Perspect.* 103 (1995), supl. 8, 259-261.

Carcinomas de células hepáticas

Lit.: **De-Vita S.** y col.; *Blood* 86 (1995) 1887-1892. **Koike K.**; *Intervirology* 38 (1995) 134-142.

Casola S. y col.; *Acta Genet. Med. Gemellol Roma* 45 (1996) 221 -225.

E Hara y col.; *Dev. Genet.* 18 (1996) 161-172.

ES 2 334 866 T3

Carcinomas uretro-genitales (carcinomas de cuello de útero, carcinomas cervicales, carcinomas vulvares, cáncer de próstata, cáncer anal, cáncer de vejiga)

Lit.: **Beyer-Finkler** E. y col.; *Intervirology* 38 (1995) 173-180.

Moyet-Lalle C. y col.; *Int. J. Cancer* 64 (1995) 124-129.

Linfomas (linfomas no Hodgkin, linfomas de Burkitt, linfomas de células T, linfomas de células B)

Lit.: **Lee** J.H. y col.; *J. Korean Med. Sci.* 10 (1995) 399-405; **Tomita** Y. y col.; *Leuk. Lymphoma* 19 (1995) 129-134.

Wang C.Y. y col.; *Mayo Clin. proc.* 70 (1995) 665-672; **Maroushek** S.R. y col.; *Microb. Pathog.* 19 (1995) 317-333.

Carcinomas de pulmón

Lit.: **Hogg** J.C., **Hegele** R.G.; *Semin Resp. Infect.* 10 (1995) 244-253.

WT1

En el caso de los tumores de Wilms se trata de tumores de riñón de niños. Se trata con gran probabilidad de un gen supresor de tumores.

Lit.: **Bonetta** L., y col.; *Cytogenet. Cell Genet.* 51, 1989. **Gessler** M., y col.; *Genomics* 12, 807-813, 1992.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la caracterización de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas mediante análisis de ácidos nucleicos en el que

- i) las células obtenidas a partir del fluido corporal de un individuo se investigan para por lo menos un ARNm de un primer gen específico para cáncer; y
- ii) las células cancerosas separadas a partir del fluido corporal de un individuo se investigan para por lo menos un ADN o ARNm de un segundo gen específico para cáncer o asociado a cáncer y la misma investigación se realiza con células no cancerosas del mismo individuo para la comparación,

siendo distintos el primer y el segundo gen.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el fluido corporal es sangre o médula ósea.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque las células obtenidas a partir del fluido corporal del individuo pueden obtenerse obteniendo células, un concentrado que contiene células o un líquido que contiene células del fluido corporal.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque las células, el concentrado que contiene células o el líquido que contiene células es una fracción de sangre que comprende células mononucleares.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque las células cancerosas separadas a partir del fluido corporal de un individuo pueden obtenerse separando células cancerosas del fluido corporal o de fracciones que contienen células del mismo mediante inmunoadsorción, microfiltración o centrifugación en gradiente de densidad.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la investigación de las células obtenidas a partir del fluido corporal del individuo para por lo menos un ARNm de un primer gen específico para cáncer incluye un análisis de expresión de ARNm, no expresándose esencialmente el gen de células no cancerosas del fluido corporal investigado.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el ARNm es un ARNm expresado por el gen CEA, CK20, MUC1, tirosinasa o MAGE3.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la investigación de las células cancerosas separadas a partir del fluido corporal del individuo para por lo menos un ADN o ARNm de un segundo gen específico para cáncer o asociado a cáncer incluye una investigación para mutaciones, amplificaciones, LOH, translocaciones o polimorfismos de ADN genómico.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el ADN genómico es un ADN genómico del gen p53, erb-B2, c-myc, K-ras, RB, APC o DCC.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la investigación de las células cancerosas separadas a partir del fluido corporal del individuo para por lo menos un ADN o ARNm de un segundo gen específico para cáncer o asociado a cáncer incluye una investigación para una expresión del gen modulada en comparación con células no cancerosas del fluido corporal del mismo individuo.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque se expresa el gen de células no cancerosas del fluido corporal del mismo individuo.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque el gen asociado a cáncer es un gen específico para tejidos, gen asociado a metastatización, gen de receptores de hormonas esteroideas, gen de quimiorresistencia o gen que guarda relación con la inmunomodulación, proliferación celular o apoptosis.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el gen asociado a metastatización codifica un factor de angiogénesis, factor de motilidad, factor de crecimiento, factor de degradación de la matriz o factor de adhesión.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizado** porque el ARNm es ARNm expresado por el gen bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 MMP2 o TIMP3.

15. Uso del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14 para el diagnóstico *in vitro* de cáncer.

16. Uso del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14 para la detección de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas.

ES 2 334 866 T3

17. Uso del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14 para la localización de órganos de la fuente de diseminación de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas o para la creación de un perfil de riesgo de células cancerosas diseminadas y micrometastatizadas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65