



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 354 452**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01) **C12N 15/11** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **C12N 15/12** (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06741413 .6**

(96) Fecha de presentación : **18.04.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1877559**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

(54) Título: **Reorganizaciones y mutaciones mitocondriales como herramientas de diagnóstico para la detección de exposición solar, cáncer de próstata y otros cánceres.**

(30) Prioridad: **18.04.2005 US 672016 P
29.09.2005 US 721522 P
07.04.2006 US 789872 P**

(73) Titular/es: **MITOMICS Inc.
Suite 1000 290 Munro Street
Thunder Bay, ON P7A 7T1, CA**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2011

(72) Inventor/es: **Thayer, Robert;
Parr, Ryan;
Dakubo, Gabriel;
Maki, Jennifer;
Aguirre, Andrea;
Birch-Machin, Mark;
Reguly, Brian;
Robinson, Kerry y
Harbottle, Andrew**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2011

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Reorganizaciones y mutaciones mitocondriales como herramientas de diagnóstico para la detección de exposición solar, cáncer de próstata y otros cánceres.

5

Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere al campo de la genómica mitocondrial. En particular, se refiere a mutaciones y reorganizaciones en el genoma mitocondrial y su utilidad como indicador de la exposición al sol, el envejecimiento y la génesis o existencia de enfermedades, por ejemplo la detección de la presencia de preneoplasia, neoplasia y progresión hacia tumor maligno potencial antes de que sean evidentes síntomas clínicos comunes.

Antecedentes de la invención

15

La megatendencia actual en las ciencias biológicas es el proyecto del genoma humano y el aprovechamiento comercial de los datos. Sin embargo, existe una limitación excepcional al uso y aplicación de esta información ya que los datos no son específicos a nivel de individuo. Increíblemente, los datos son de sólo unos pocos individuos, apenas representativos de la variación presente en poblaciones humanas, haciendo que los datos sean útiles solamente en aplicaciones generales. La asombrosa complejidad del genoma humano hace que la aplicación en una base individual sea impráctica. Para secuenciar completamente un genoma nuclear humano el Departamento de Energía y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos han invertido 2,5 mil millones de dólares desde 1988 (<http://www.om1.gov/hgmis/project/budget.html>).

25

Genoma Mitocondrial

30

El genoma mitocondrial es una secuencia compacta aunque crítica de ácido nucleico. El genoma mitocondrial codifica subunidades enzimáticas necesarias para la respiración celular. El ADN mitocondrial o “ADNmt” es un genoma minúsculo de ácido nucleico de 16.569 pares de bases (pb) (Anderson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1999) al contrario que el inmenso genoma nuclear de 3,3 mil millones de pb. Su dotación genética es astronómicamente más pequeña que la de su compañero celular nuclear (0,0005%). Sin embargo, las células individuales llevan en cualquier parte de 10^3 a 10^4 mitocondrias dependiendo de la función celular específica (Singh y Modica-Napolitano 2002). La comunicación o señalización química se produce rutinariamente entre los genomas nuclear y mitocondrial (Sherratt *et al.*, 1997). Además, los componentes nucleares específicos son responsables del mantenimiento e integridad de la secuencia mitocondrial (Croteau *et al.*, 1999). Cuando estas áreas nucleares se vuelven no funcionales por reorganizaciones nucleares indicativas de posible enfermedad, entonces comienzan a aparecer mutaciones en secuencias de ADNmt. Además, pueden identificarse mitocondrias específicas para su destrucción intracelular por delecciones provocadas por mutaciones somáticas en el genoma mitocondrial. Este mecanismo teórico también puede servir como indicio de enfermedad inminente. Son necesarios aproximadamente 3.000 genes para generar una mitocondria, estando sólo treinta y siete de estos codificados por el genoma mitocondrial, indicando una fuerte dependencia mitocondrial de loci nucleares (Naviaux, 1997).

45

Todos los genomas de ADN mitocondrial (ADNmt) en un individuo dado son idénticos dada la expansión clonal de las mitocondrias dentro del óvulo una vez que se ha producido la fecundación. El papel esencial del ADNmt es la generación del combustible celular, el trifosfato de adenosina (ATP), que dispara el metabolismo celular. Significativamente, el genoma mitocondrial depende de setenta proteínas de codificación nuclear para efectuar las reacciones de oxidación y reducción necesarias para su función vital, además de los trece polipéptidos suministrados por el genoma mitocondrial (Leonard y Shapira, 1997). Diferentes tejidos y órganos dependen de la fosforilación oxidativa en un grado variable. Las enfermedades relacionadas con una fosforilación oxidativa defectuosa (OXPHOS) parecen estar estrechamente relacionadas con mutaciones de ADNmt (Byrne, 1992). Por consiguiente, a medida que disminuye la OXPHOS debido a un aumento de la gravedad de mutaciones de ADNmt, se superan los umbrales energéticos específicos de órgano, lo que da origen a una diversidad de fenotipos clínicos. Además, las mutaciones en el genoma mitocondrial están asociadas con una diversidad de enfermedades degenerativas crónicas (Gattermann *et al.* 1995). Es bien sabido que el envejecimiento y tipos específicos de patologías pueden alterar o mutar el ADNmt, comprometiendo la capacidad de producción de energía de la célula. Esto da como resultado con frecuencia la sobreexpresión de mitocondrias defectuosas y/o que la célula complementa la ausencia de ATP haciéndose más glucolítica (Carew y Huang, 2002); por lo tanto, los cambios o mutaciones en el genoma mitocondrial pueden usarse como marcadores para la génesis de enfermedad y/o la progresión de enfermedad, cuando se controlan a intervalos sucesivos.

55

Recientemente, Fliss *et al.* (2000) descubrieron, en tumores primarios de cáncer de pulmón y de vejiga, una alta frecuencia de mutaciones de ADNmt que eran predominantemente homoplásicas por naturaleza, indicando que el ADNmt mutante era dominante en las células malignas. Las mutaciones y delecciones puntuales parecerían ser el efecto secundario no programado pero inevitable del daño de radicales libres de oxígeno en la membrana y el genoma de las mitocondrias (Miquel *et al.* 1992). Esta teoría es plausible porque, no sólo el genoma mitocondrial está carente de histonas protectoras, sino que también es vulnerable al daño oxidativo que se encuentra cerca de la membrana mitocondrial interna generadora de oxígeno. Además, como el ADNmt tiene un genoma compacto y carece

de intrones, es probable por lo tanto que los acontecimientos perjudiciales afecten a una secuencia codificante dando como resultado una disfunción bioquímica. Esta disfunción aumentará adicionalmente el estrés oxidativo celular, lo que conducirá a daño nuclear así como del ADNmt, aumentando de este modo el potencial de que una célula entre en el proceso canceroso (Penta *et al.*, 2001). A este respecto, la investigación indica que con el aumento de la edad existe un aumento en el daño del ADNmt (Cortopassi y Wang 1995) y una disminución posterior de la función respiratoria (Miquel *et al.* 1992), conduciendo a una muerte celular final.

Petros *et al.*, PNAS, volumen 102, páginas 719-724, han descrito que la disfunción mitocondrial causada por mutaciones/deleciones se correlaciona con la aparición del carcinoma de próstata. En la columna derecha de la página 10 723, se considera que las mutaciones de ADNmt desempeñan un papel importante en la etiología al cáncer de próstata. El cáncer se califica incluso de “enfermedad mitocondrial”. En Cormier-Daire, Journal of Pediatrics, volumen 124, páginas 63-70, los autores han descubierto que dicha delección (delección de 3379 pb que comprende los genes principales del complejo respiratorio de complejo I, ND4L, ND4, ND5, así como 3 genes de ribonucleasa de transferencia (ARNT para His, Ser y Leu)), consultese la columna derecha de la página 66, estará correlacionada/asociada 15 con diarrea crónica y atrofia de las vellosidades en niños.

ADNmt como Herramienta de Diagnóstico

Las dinámicas de secuencias de ADNmt son herramientas de diagnóstico importantes. Las mutaciones en el ADNmt son con frecuencia indicadores preliminares de enfermedades en desarrollo, a menudo asociadas con mutaciones nucleares, y actúan como biomarcadores específicamente relacionados con enfermedades, tales como, pero sin limitación: daño tisular y cáncer por tabaquismo y exposición indirecta al humo del tabaco (Lee *et al.*, 1998; Wei, 1998); longevidad, basada en la acumulación de mutaciones en el genoma mitocondrial que comienzan aproximadamente a los 20 años de edad y aumentan a partir de entonces (von Wurmb, 1998); enfermedad metastásica causada por mutación o exposición a carcinógenos, mutágenos, radiación ultravioleta (Birch-Machin, 2000); artrosis; enfermedad cardiovascular, Alzheimer, Parkinson (Shoffner *et al.*, 1993; Sherratt *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998); pérdida auditiva asociada con la edad (Seidman *et al.*, 1997); degeneración del nervio óptico y arritmia cardíaca (Brown *et al.*, 1997; Wallace *et al.*, 1988); exoftalmoplejía externa progresiva crónica (Taniike *et al.*, 1992); aterosclerosis (Bogliolo *et al.*, 1999); carcinomas tiroideos papilares y tumores tiroideos (Yeh *et al.*, 2000); así como otros (por ejemplo, Naviaux, 1997; Chinnery y Turnbull, 1999).

Las mutaciones en sitios específicos del genoma mitocondrial pueden estar asociadas con determinadas enfermedades. Por ejemplo, las mutaciones en 4216, 4217 y 4917 se asocian con la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) (Mitochondrial Research Society; Huoponen (2001); MitoMap). Se encontró que una mutación en 15452 en 35 5/5 pacientes estaba asociada con una deficiencia de ubiquinol citocromo c reductasa (complejo III) (Valnot *et al.* 1999). Sin embargo, no se encontró que las mutaciones en estos sitios estuvieran asociadas con el cáncer de próstata.

Específicamente, estas alteraciones incluyen mutaciones puntuales (transiciones, transversiones), delecciones (de 40 una base a miles de bases), inversiones, duplicaciones (de una base a miles de bases), recombinaciones e inserciones (de una base a miles de bases). Además, alteraciones, delecciones o combinaciones de pares de bases específicas están asociadas con una aparición temprana de cáncer de próstata, piel y pulmón, así como con el envejecimiento (por ejemplo, Polyak *et al.*, 1998), el envejecimiento prematuro, la exposición a carcinógenos (Lee *et al.*, 1998), etc.

Puesto que el ADNmt se pasa a la descendencia exclusivamente a través del óvulo, es imprescindible entender las secuencias mitocondriales a través de este medio de herencia. La secuencia de ADNmt varía ampliamente entre linajes maternales (Ward *et al.*, 1991), por lo tanto, las mutaciones asociadas con enfermedad deben entenderse claramente en comparación con esta variación. Por ejemplo, una transición específica de T a C observada en la secuencia de varios individuos, asociada con un cáncer específico, podría ser en realidad una variación natural en un linaje maternal muy extendido en un área geográfica particular dada o asociada con etnicidad. Por ejemplo, los Nativos Norteamericanos expresan una alta frecuencia poco habitual de diabetes de aparición en adultos. Además, todos los Nativos Norteamericanos se caracterizan genéticamente por cinco linajes maternales básicos denominados A, B, C, D y X (Schurr *et al.*, 1990; Stone y Stoneking, 1993; Smith *et al.*, 1999). El linaje A se distingue por una simple mutación puntual que da 50 como resultado un sitio Hae III en el pb 663 en el genoma mitocondrial, aunque no existe una relación causal entre esta mutación y la diabetes de aparición en adultos. Además, incluso dentro de grupos de linaje existe variación de secuencia.

Más allá de los marcadores específicos asociados con un linaje particular existe más variación intrapoblacional 60 que variación de secuencia interpoblacional (Easton *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1991, 1993). Esta divergencia debe entenderse para una identificación óptima de mutaciones asociadas con enfermedad, por lo tanto debe usarse una estrategia de estudio de línea maternal (Parsons *et al.*, 1997), que imite los puntos fuertes de un diseño longitudinal (es decir, el seguimiento de un sujeto durante un periodo de tiempo sustancial), para identificar mutaciones directamente asociadas con enfermedad, al contrario que mutaciones sin asociación con enfermedad. Además, sustancias particulares tales como exposición indirecta al humo del tabaco, bajos niveles de amianto, plomo, todos los mutágenos conocidos y a bajos niveles en muchos entornos, pueden ser la causa de mutaciones puntuales específicas, pero no necesariamente un marcador específico de enfermedad. Por lo tanto, una base de datos de secuencias de 65

ADNmt considerable es un prerrequisito claro para pronosticar con exactitud una enfermedad potencial como un proceso natural o por exposición a agentes causales. Además, toda la molécula debe secuenciarse para determinar su contenido de información completo. La serie completa de mutaciones puntuales (transiciones, transversiones), delecciones (de una base a miles de bases), inversiones, duplicaciones (de una base a miles de bases), recombinaciones e inserciones (de una base a miles de bases), debe caracterizarse como un todo a lo largo de todo el genoma mitocondrial. Esto asegura que se capture toda la información posible disponible en el genoma mitocondrial. Aunque el genoma de las mitocondrias citoplasmáticas (16.569 pb) se ha secuenciado a nivel individual, como su homólogo nuclear, el genoma mitocondrial no se ha secuenciado a nivel de población para su uso como herramienta de diagnóstico.

10 Recientemente, las mitocondrias se han implicado en el proceso carcinogénico debido a su papel en la apoptosis y a otros aspectos de la biología tumoral (Green y Reed, 1998; Penta *et al.*, 2001), en particular, se han observado mutaciones somáticas del ADNmt (ADNmt) en varios tumores humanos (Habano *et al.* 1998; Polyak *et al.* 1998; Tamura *et al.* 1999; Fliss, *et al.* 2000). Estos últimos descubrimientos se hicieron más interesantes por las reivindicaciones 15 de que las mutaciones particulares del ADNmt parecían ser homoplásicas (Habano *et al.* 1998; Polyak *et al.* 1998; Fliss, *et al.* 2000). Además, los investigadores han descubierto que la radiación ultravioleta (UV) es importante en el desarrollo y la patogénesis del cáncer de piel de tipo no melanoma (NMSC) (Weinstock 1998; Rees, 1998) y que el UV induce daños en el ADNmt en la piel humana (Birch-Machin, 2000a).

20 Además, con el tiempo, la secuencia mitocondrial pierde su integridad. Por ejemplo, la delección de 4977 pb aumenta en frecuencia con la edad (Fahn *et al.*, 1996). Comenzando a la edad de 20, esta delección comienza a aparecer en un pequeño número de mitocondrias. A la edad de 80, se han delecionado un número importante de moléculas. Esta delección caracteriza el proceso de envejecimiento normal y, como tal, sirve como biomarcador para este proceso. La cuantificación de este proceso de envejecimiento puede permitir que intervenciones médicas o de otro tipo ralenticen 25 el proceso.

30 Esta aplicación de la genómica mitocondrial a la medicina se ha pasado por alto porque el ADNmt se ha usado principalmente como herramienta en la genética de poblaciones y, más recientemente, en la medicina forense; sin embargo, se está haciendo cada vez más evidente que el contenido de información del ADNmt tiene una aplicación importante en el campo del diagnóstico médico. Además, la secuenciación de la dotación completa del ADNmt era una tarea laboriosa antes de la llegada reciente de sistemas de secuenciación de ADN robotizados de alto rendimiento y alta capacidad. Además, los genetistas de poblaciones fueron capaces de reunir datos significativos de dos áreas 35 altamente variables en la región de control; sin embargo, estas pequeñas regiones representan una pequeña porción del genoma total, inferior a 10%, lo que significa que 90% del poder de discriminación de los datos se queda sin usar. Significativamente, muchas alteraciones asociadas con enfermedad están fuera de la región de control. Debería considerarse que el carácter del genoma completo incluya toda la información de secuencia para un diagnóstico exacto y altamente discriminatorio.

40 Cáncer de Piel de Tipo No Melanoma

El cáncer de piel de tipo no melanoma (NMSC) humano es el cáncer más común en muchas poblaciones caucásicas (Weinstock, 1998; Rees, 1998). La mayoría de estos tumores son carcinomas de células basales (BCC) y carcinomas de células escamosas (SCC). Los BCC son localmente invasivos y pueden causar una morbilidad significativa pero 45 rara vez metástasis. Los SCC muestran un potencial metastático significativo y la aparición de múltiples NMSC en pacientes con inmunosupresión causa problemas de tratamiento significativos (Rees, 1998). Aunque no hay lesiones premalignas clínicamente identificadas para los BCC, se cree que algunos SCC surgen de lesiones precursoras, en concreto, queratosis actínicas (AK) o áreas de enfermedad de Bowen (carcinoma *in situ*) (Rees, 1998).

50 Los SCC muestran una pérdida de heterocigosidad que afecta a varios cromosomas, que sugiere la implicación de varios genes supresores de tumores en su desarrollo. Curiosamente, en las AK, se observa un grado igual o mayor de pérdida genética en estas lesiones precursoras en comparación con los SCC (Rehman *et al.* 1994; Rehman *et al.* 1996). Esto es importante para la invención propuesta porque sugiere que es probable que estén implicados otros mecanismos, además de la inactivación de genes supresores de tumores, en el desarrollo de SCC.

55 Originariamente se formuló la hipótesis de un papel para las mitocondrias en la oncogénesis cuando se descubrió que las células tumorales tienen un sistema respiratorio alterado y alta actividad glucolítica (Shay y Werbin, 1987). Descubrimientos recientes que aclaran el papel de las mitocondrias en la apoptosis (Green y Reed, 1998) junto con la alta incidencia de mutaciones homoplásicas del ADNmt en el cáncer de colon (Habano *et al.* 1998; Polyak *et al.* 1998, revisado en Penta *et al.*, 2001), tumores primarios de vejiga, tumores de cabeza y cuello (Fliss *et al.* 2000) y tumores gástricos (Tamura *et al.* 1999) confirman adicionalmente esta hipótesis. Además, se ha propuesto que estas mutaciones mitocondriales pueden afectar a los niveles de especies de oxígeno reactivo (ROS) que se ha demostrado que son altamente mitógenas (Polyak *et al.* 1998; Li *et al.* 1997).

65 Estudios previos por los inventores y por otros han demostrado que las mutaciones en el ADNmt y la disfunción mitocondrial asociada son un factor contribuyente importante a enfermedades degenerativas humanas (Birch-Machin *et al.* 1993; Chinnery *et al.* 1999; Birch-Machin *et al.* 2000b). Esto es porque el genoma mitocondrial es particularmente susceptible a mutaciones debido a las altas cantidades de ROS producidas en estos orgánulos acopla-

ES 2 354 452 T3

das con la ausencia de histonas protectoras y una baja tasa de reparación del ADNmt (Pascucci *et al.* 1997; Sawyer y van Houten; LeDoux *et al.* 1999) en comparación con el núcleo. De hecho, la tasa de mutación para el ADNmt es aproximadamente diez veces superior a la del ADN nuclear (Wallace, 1994). La mayoría de las mutaciones de ADNmt identificadas en los estudios de tumores humanos recientes han indicado una posible exposición a mutágenos derivados de ROS. Esto es importante para la investigación de las mutaciones del ADNmt en el NMSC porque existen pruebas recientes de la implicación directa de las ROS inducidas por UV en la generación de delecciones del ADNmt en células cutáneas humanas (Bemeburg *et al.* 1999, Lowes *et al.*, 2002). Además, el determinante principal del NMSC en individuos sin pigmentación protectora o predisposición genética es el UV (Weinstock, 1998).

Las supuestas lesiones precursoras de SCC también se encuentran predominantemente en sitios expuestos constantemente al sol. Esto es importante porque el trabajo del laboratorio de Birch-Machin ha demostrado diferencias distintivas entre la incidencia de daño de ADN mitocondrial en la piel tomada de diferentes sitios corporales expuestos al sol. La amplia mayoría de los daños se encuentran en sitios expuestos constantemente al sol (Krishnan *et al.*, 2002).

Uno de los inventores fue el primero en demostrar cuantitativamente que la exposición a UV induce daños en el ADNmt (Birch-Machin *et al.* 1998). Se usó el ADNmt como marcador molecular para estudiar la relación entre el envejecimiento cronológico y el fotoenvejecimiento en la piel humana. Se usó un método de PCR cuantitativa (qPCR) de 3 cebadores para estudiar los cambios en la proporción de ADNmt con la delección de 4977 pb respecto al de tipo silvestre en relación con la exposición al sol y la edad cronológica de la piel humana. Había un aumento significativo en la incidencia de altos niveles (es decir, >1%) del ADNmt con la delección de 4977 pb en sitios expuestos al sol (27%, [27/100]) en comparación con sitios protegidos del sol (1,1% [1/90]) (prueba exacta de Fishers, P<0,0001). Por lo tanto, las delecciones o mutaciones del ADNmt pueden ser útiles como marcador de exposición a radiación ultravioleta acumulada.

Además, un estudio usando una estrategia de transferencia de South-Western que implica anticuerpos monoclonales contra dímeros de timina proporcionó pruebas directas de la presencia de daños inducidos por UV en ADNmt purificado (Ray *et al.* 1998).

Un trabajo reciente del grupo de investigación de los inventores ha usado una técnica de PCR de extensión prolongada (LX-PCR) para amplificar el genoma mitocondrial completo para determinar el espectro de delección completo del ADNmt secundario a exposición a UV (Ray *et al.* 2000). Se realizó un análisis de PCR prolongada de 71 muestras de piel dividida, en las que la epidermis se separa de la dermis subyacente, en relación con la exposición solar. Había un aumento significativo en el número de delecciones con una exposición a UV creciente en la epidermis (prueba de Kruskal-Wallis, p=0,0015). Los descubrimientos en la epidermis no se confunden con ningún aumento dependiente de la edad en las delecciones de ADNmt también detectadas por la técnica de PCR prolongada. El gran espectro de delecciones identificadas destaca la naturaleza ubicua y la alta carga mutacional del ADNmt asociada con la exposición a UV. En comparación con la detección de delecciones individuales usando PCR competitiva, el estudio muestra que la PCR prolongada es una técnica sensible y, por lo tanto, puede proporcionar un índice más completo, aunque no cuantitativo, del daño de ADNmt total en la piel. Los estudios por uno de los inventores descritos anteriormente demuestran claramente que el ADNmt es una diana importante del UV y esto, junto con el papel de las mitocondrias en enfermedades de la piel, se ha revisado recientemente (Birch-Machin, 2000).

Se ha investigado la pigmentación de la piel y del pelo humano, que es la covariante principal de la sensibilidad al UV y del cáncer de piel humano. Estas investigaciones se han centrado en la asociación de variantes del gen del receptor de melanocortina 1 y la sensibilidad al sol de individuos y poblaciones (Smith *et al.* 1998; Healy *et al.* 1999; Flanagan *et al.* 2000; Healy *et al.* 2000; Harding *et al.* 2000; Flanagan *et al.*, 2002) en relación con la susceptibilidad al cáncer de piel. Sin embargo, estos estudios no han abordado la variación a nivel de población en las secuencias de ADNmt en asociación con tipos de piel y/o colores de pelo particulares.

Una de las cuestiones que continúa en gran parte sin respuesta por los estudios recientes de mutaciones de ADNmt en tumores humanos es la incidencia de delecciones del genoma mitocondrial en relación con estos tumores. Ésta es una cuestión importante a responder ya que un estudio preliminar de un solo paciente de piel humana ha demostrado diferencias en la incidencia de la delección de ADNmt común entre varios tumores (AK y SCC) y la piel normal (Pang *et al.* 1994). Además, los propios datos preliminares de los inventores muestran un número aumentado de delecciones de ADNmt en tumores en comparación con piel normal. Por último, Birch-Machin y otros han demostrado que la incidencia de delecciones de ADNmt, así como de duplicaciones, aumenta con una exposición creciente a UV (Bemeburg *et al.* 1999; Birch-Machin *et al.* 1998; Ray *et al.* 1998; Ray *et al.* 1999; Ray *et al.* 2000), Lindsey *et al.*, 2001; Birch-Machin *et al.*, 2001; Lowes *et al.*, 2002, Krishnan *et al.*, 2002).

Aparte de las cuestiones relacionadas con la progresión tumoral, otras cuestiones vitales continúan en gran parte sin respuesta por los estudios recientes de ADNmt en tumores humanos (Habano *et al.* 1998; Fiiss *et al.* 2000). En primer lugar, debido a las limitaciones técnicas, no está claro si las mutaciones de ADNmt son verdaderamente homoplásicas, ya que niveles variables de heteroplasmia también pueden indicar transiciones a enfermedad importantes (Habano *et al.* 1998; Polyak *et al.* 1998; Fliss, *et al.* 2000); en segundo lugar, aparte de un estudio (Tamura *et al.* 1999), no se investigó la incidencia de las delecciones de ADNmt y su papel como biomarcadores potenciales para el NMSC. Los investigadores han examinado la delección común e ignorado el resto de las 100 delecciones más o menos. Además,

los investigadores se han centrado en la identificación de mutaciones más que en su cuantificación. Es importante evaluar con exactitud de una forma cuantitativa la incidencia de delecciones debido al efecto de umbral del daño del ADNmt sobre la producción de ATP y, por consiguiente, la función celular. Además, las delecciones son difíciles de caracterizar.

5

Se usa típicamente una PCR prolongada que produce una escalera de delecciones que después tienen que caracterizarse.

El diagnóstico actual del NMSC es la evaluación patológica del tejido escindido. Por consiguiente, existe la necesidad de un marcador temprano de daños del ADN inducidos por UV que predispongan a un individuo a NMSC. También existe la necesidad de una herramienta de diagnóstico basada en la genética que permita una detección temprana y sea diagnósticamente exacta.

15 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es un tumor sólido frecuentemente diagnosticado que muy probablemente se origina en el epitelio de la próstata (Huang *et al.* 1999). En 1997, se exploraron casi 10 millones de hombres norteamericanos para el antígeno prostático específico (PSA), cuya presencia sugiere cáncer de próstata (Woodwell, 1999). De hecho, esto indica un número incluso mayor de hombres explorados mediante un examen rectal digital inicial (DRE). En el mismo año, 31 millones de hombres se sometían a un DRE (Woodwell, 1999). Además, el número anual de nuevos casos diagnosticados de cáncer de próstata en los Estados Unidos se estima en 179.000 (Landis *et al.*, 1999). Es el segundo cáncer diagnosticado más comúnmente y la segunda causa principal de mortalidad por cáncer en hombres canadienses. En 1997 el cáncer de próstata representaba 19.800 de los nuevos cánceres diagnosticados en hombres canadienses (28%) (National Cancer Institute of Canada). Se estima que de 30% a 40% de todos los hombres por encima de la edad de cuarenta y nueve (49) años tienen algunas células de próstata cancerosas, aunque sólo de 20% a 25% de estos hombres tienen una forma clínicamente significativa de cáncer de próstata (SpringNet - CE Connection, Internet, www.springnet.com/ce/j803a.htm). El cáncer de próstata muestra una amplia diversidad de comportamientos histológicos que implican factores tanto erógenos como exógenos, es decir, situaciones socioeconómicas, dieta, geográficas, desequilibrios hormonales, historia familiar y constitución genética (Konishi *et al.* 1997; Hayward *et al.* 1998).

Desde un punto de vista del riesgo los cánceres de próstata familiares y hereditarios no se consideran términos sinónimos. Los cánceres familiares se refieren a las incidencias dentro de una familia, pero no se heredan. Esta forma representa hasta 25% de los cánceres de próstata (Walsh y Partin, 1997). Los hereditarios se refieren a un subtipo de cáncer de próstata con una herencia mendeliana de un gen o genes predisponentes, y representa aproximadamente 9% de los casos descritos. Una historia familiar positiva de cáncer de próstata para esta enfermedad sugiere que este gen o genes predisponentes desempeñan un papel importante en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata. Recientemente, se han identificado genes de susceptibilidad en los cromosomas 1 y X como predisponentes de los hombres al cáncer de próstata, proporcionando una mayor percepción de la etiología del cáncer hereditario (Berthon *et al.* 1998; Xu *et al.* 1998).

El pronóstico del cáncer de próstata depende principalmente de la fase y el grado del tumor en el diagnóstico. Sólo el cáncer de próstata localizado puede curarse mediante un tratamiento radical. La detección convencional depende todavía del examen rectal digital, del ensayo de PSA y del examen histopatológico de tejidos prostáticos biopsiados. La biopsia de una masa se usa para confirmar la malignidad, no es una técnica de detección temprana. Desgraciadamente, algunos tumores tempranos son imposibles de identificar durante los exámenes rectales. Los ensayos de PSA tienen una especificidad de 60 a 70% y una sensibilidad de 70 a 80% (comunicación personal, Dr. Sunil Gulavita, Northwestern Ontario Cancer Centre). Una técnica más novedosa que refina el diagnóstico de tumores de grado histológico común es el análisis de la ploidía del ADN, que emplea citometría de flujo (Shankey *et al.* 1995); sin embargo, esta técnica mide cambios cromosómicos que sólo son evidentes en fases posteriores del desarrollo del cáncer y no es lo bastante sensible para la detección de alteraciones minoritarias en la estructura del ADN o inversiones cromosómicas, o translocaciones recíprocas en cánceres tempranos. La invención se centra en la detección temprana puesto que el pronóstico depende en gran medida de la fase de la enfermedad en el diagnóstico.

55

Nuestro entendimiento de las anomalías genéticas en los cánceres de próstata es escaso. La investigación del cáncer de próstata se ha centrado en el desarrollo de conocimientos en las áreas siguientes: 1) protooncogenes (Buttyan *et al.* 1987); 2) genes supresores de tumores (p53, p73, KAI1 y MMAC1/PTEN; Dong *et al.* 1995; Cairns *et al.* 1997) y 3) actividad de telómeros/telomerasa en la metástasis. La regulación positiva de la telomerasa y la amplificación del ADN telomérico en células de próstata pueden proporcionar marcadores eficaces para el diagnóstico. Además, los telómeros pueden servir como sitio para la terapia (Ozen *et al.* 1998). Varios grupos han proporcionado pruebas de un "gen de cáncer de próstata" en el brazo corto del cromosoma 1 (Berthon *et al.* 1998). Son necesarios más trabajos para identificar el locus específico dentro de esta región. Se ha sugerido que este marcador sólo es uno de varios genes posibles que predisponen a los hombres al cáncer de próstata familiar. Otros estudios han mostrado posibles loci marcadores en el cromosoma X (Xu *et al.* 1998). Si algunos cánceres de próstata son poligénicos, entonces el ADNmt se convierte en una herramienta de diagnóstico importante, puesto que puede ser difícil identificar y entender la interacción entre todos los genes nucleares asociados en tales casos.

ES 2 354 452 T3

Ciertamente, una cuestión clave en la investigación del cáncer de próstata es identificar marcadores moleculares que puedan determinar eficazmente y distinguir la progresión tumoral. Los marcadores moleculares pueden ser capaces de discriminar entre aquellos casos de neoplasia de próstata que avanzarán rápidamente a enfermedad metastásica y aquellos con escasas posibilidades de dar como resultado el desarrollo de un tumor. La comparación de marcadores moleculares o mutaciones puede determinar si la ruta del tumor es latente o agresiva. Hasta la presente investigación se ha centrado principalmente en los secretos escondidos dentro del genoma nuclear; sin embargo, el genoma del ADNmt de mucho menor tamaño parece actuar como barómetro para los acontecimientos en el núcleo, y como tal proporciona un medio para la detección temprana del cáncer de próstata humano (Zeviani *et al.* 1990). De forma importante, a este respecto, las mitocondrias se han implicado en el proceso carcinogénico debido a su papel en la apoptosis y otros aspectos de la biología tumoral (Green y Reed 1998). En particular, se han observado mutaciones somáticas del ADNmt en varios tumores humanos (Polyak *et al.* 1998, Tamura *et al.* 1999, Fliss *et al.* 2000). Sin embargo, los estudios previos han sido exclusivamente transversales, ya que no han considerado la naturaleza clonal del ADNmt en las líneas maternales. Estos estudios transversales limitados simplemente muestran la mutación en un punto temporal. Esto puede o no proporcionar una relación exacta entre una mutación y la patología correspondiente. Los estudios transversales que emplean una línea maternal tienen la ventaja de realizar un seguimiento de una mutación en el ADNmt con el tiempo y, por lo tanto, imitar los puntos fuertes de un diseño longitudinal. Las mutaciones que son variantes de población comunes, a diferencia de las mutaciones asociadas con enfermedad pueden ambas identificarse.

20 Envejecimiento

El envejecimiento consiste en una acumulación de cambios con el tiempo tanto a nivel molecular como celular; sin embargo, todavía no se han aclarado los mecanismos moleculares específicos que subyacen al proceso de envejecimiento. En un intento por explicar el proceso de envejecimiento, genomas mitocondriales en sujetos de edad avanzada se compararon con los genomas de sujetos más jóvenes de la misma línea maternal. Una delección asociada con el envejecimiento se conoce como la delección común, o delección de 4977 pb. La investigación del envejecimiento se ha limitado a esta delección común y a polimorfismos en la región de control. Para una comprensión clara de estas mutaciones, debe analizarse el genoma completo. Se observan otras delecciones en la Tabla 1, adaptada a partir de Wei, 1992.

30

TABLA 1

	Tamaño de las delecciones (pb)	Referencias
35	4977	Cortopassi y Arnheim, 1990; Ikebe <i>et al.</i> , 1990; Linnane <i>et al.</i> , 1990; Corral-Debrinski <i>et al.</i> , 1991; Yen <i>et al.</i> , 1991; Torii <i>et al.</i> , 1992; Zhang <i>et al.</i> , 1992
40	7436	Corral-Debrinski <i>et al.</i> , 1991; Hattori <i>et al.</i> , 1991 Hsieh y Wei, 1992
45	3610	Katayama <i>et al.</i> , 1991
50	6063	Hsieh y Wei, 1992 Yen <i>et al.</i> , 1992
55	5827	Zhang <i>et al.</i> , 1992
60	6335	Zhang <i>et al.</i> , 1992
65	7635	Zhang <i>et al.</i> , 1992
	7737	Zhang <i>et al.</i> , 1992
	7856	Zhang <i>et al.</i> , 1992
	8041	Zhang <i>et al.</i> , 1992
	8044	Zhang <i>et al.</i> , 1992
	5756	Zhang <i>et al.</i> , 1992

ES 2 354 452 T3

Los radicales libres de oxígeno, un subproducto normal de la producción de ATP, son una causa probable de esta delección, que aumenta en frecuencia con la edad. La bibliografía existente demuestra una fuerte asociación entre las mutaciones del ADNmt (ADNmt), la edad cronológica y el proceso de envejecimiento global en tejidos postmitóticos, tales como músculo y cerebro; sin embargo, son necesarios estudios comparativos de líneas maternales para discriminar entre acontecimientos de mutación asociados con el envejecimiento y aquellas mutaciones sin una asociación con el envejecimiento.

En los últimos años se ha demostrado que una diversidad de enfermedades degenerativas crónicas son el resultado de mutaciones en el ADNmt (Gatterman *et al.* 1995). Las enfermedades relacionadas con una OXPHOS defectuosa parecen estar estrechamente relacionadas con mutaciones del ADNmt (Byrne, 1992). Además, se ha demostrado que estas miopatías se asocian con frecuencia con la delección común de 4977 pb del genoma mitocondrial (Liu *et al.* 1997). Esta gran delección se ha encontrado también, a niveles heteroplásmicos, en diversos tejidos de personas con envejecimiento normal y concuerda con la teoría mitocondrial del envejecimiento (Harman, 1981). Esto se manifiesta por un aumento en la frecuencia de delección (Cortopassi y Wang, 1995) y una disminución posterior en la función respiratoria (Miquel *et al.* 1992) dando como resultado una muerte celular final a edad avanzada. La detección temprana de una predisposición a una enfermedad o trastorno representa la mejor oportunidad para una intervención médica, ya que un diagnóstico genético temprano puede mejorar el pronóstico para un paciente.

Estudios previos empleando un diseño transversal han establecido una asociación o relación de causa y efecto entre mutaciones de ADNmt, delecciones y/o combinaciones de las mismas y el envejecimiento; sin embargo, para obtener datos exactos debe determinarse con concisión la tasa de mutaciones y/o delecciones específicas de edad. Las mutaciones que se atribuyen al proceso de envejecimiento a diferencia de a una enfermedad particular a nivel de población son vitales. Esta información es imprescindible para un entendimiento de cómo se acumula el daño del ADNmt con el tiempo. Además, las consecuencias de estas mutaciones particulares, sus frecuencias, y asociaciones en los aspectos temporales del envejecimiento deben conocerse para pronosticar y, finalmente, ralentizar el envejecimiento a nivel molecular. Los investigadores no han determinado todavía esta tasa, que requiere la evaluación de datos de población a través de líneas maternales. Por consiguiente, existe la necesidad de un biomarcador que realice un seguimiento del proceso de envejecimiento.

Por consiguiente, existe la necesidad de un sistema directo y simple de control del genoma mitocondrial para mutaciones que indiquen un cáncer en fase temprana, envejecimiento u otras enfermedades humanas con un componente de ADN. También existe la necesidad de un sistema de diagnóstico simple para la exposición al sol, el cáncer de piel de tipo no melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón y el envejecimiento relacionados con defectos en el genoma mitocondrial. Existe la necesidad de un sistema de diagnóstico que diferencie entre mutaciones en el ADNmt que causan enfermedad y las que simplemente representan una variación dentro de y entre poblaciones.

Compendio de la invención

Los aspectos de la presente invención se enumeran en las reivindicaciones.

La invención se refiere a un método para detectar una predisposición a cáncer, la detección temprana del cáncer, la génesis del cáncer, la presencia de cáncer, la progresión del cáncer, la ausencia de cáncer en una muestra biológica que tienen ADNmt, que comprende (a) proporcionar una muestra biológica que comprende ADNmt y (b) detectar una delección en el ADNmt, en el que el cáncer es cáncer de próstata.

En concreto, un aspecto de la invención es proporcionar un método de detección de una delección que abarca aproximadamente los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt, en el que dicha delección está asociada con cáncer de próstata, en un sujeto que tiene ADNmt, que comprende (a) proporcionar una muestra biológica del sujeto y (b) detectar la presencia de la delección en el ADNmt. La delección puede estar en el intervalo de 3000 a 4000 pb. La delección puede ser de aproximadamente 3379 pb. La delección puede deletrear todas o parte de los pares de bases entre el 10744 y el 14124, que comprenden sustancialmente genes que codifican la subunidad 4L de la NADH deshidrogenada, la subunidad 4 de la NADH deshidrogenada, la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, el ARNt de histidina, el ARNt de serina 2 y el ARNt de leucina 2.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un cebador de ácido nucleico 3.4 directo que comprende TAG ACT ACG TAC ATA CTA ACC CTA CTC CTA (SEC ID N°: 139) y un cebador de ácido nucleico 3.4 inverso que comprende GAG GTA GGA TTG GTG CTG T (SEC ID N°: 140).

Otro aspecto de la invención es proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de elementos de ácido nucleico, y un sustrato sólido, en la que uno de los elementos de ácido nucleico está asociado con la delección de ADNmt en aproximadamente 10744 a 14124, en la que el elemento de ácido nucleico tiene una posición única en dicha matriz y se asocia de forma estable con el sustrato sólido.

Los métodos y matrices de la invención pueden usarse para controlar a una persona para determinar la progresión hacia cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata, en una muestra biológica de un sujeto, que comprende: proporcionar una muestra biológica del sujeto; extraer ADN de la muestra biológica; detectar la ausencia o presencia

ES 2 354 452 T3

de delecciones del ADNmt; determinar si las delecciones están asociadas con variaciones interpoblacionales o intrapoblacionales normales o si las delecciones están asociadas con la ausencia o presencia de una predisposición a cáncer de próstata, progresión hacia cáncer de próstata, cáncer de próstata o progresión del cáncer de próstata y; repetir las etapas.

5 Otro aspecto de la invención es proporcionar el uso de una delección entre aproximadamente el 10744 y el 14124 del ADNmt, que comprende toda o parte de la subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa, la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, el ARNt de histidina, el ARNt de serina 2 y el ARNt de leucina 2, para detectar una predisposición a cáncer de próstata, la detección temprana del cáncer de próstata, la génesis del cáncer de próstata, la presencia de cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en un sujeto que tiene ADNmt.

10 Los métodos y matrices de la invención pueden usarse además para confirmar o refutar un ensayo de biopsia de cáncer de próstata a partir de una muestra de biopsia, que comprende: obtener tejido normal a partir de una muestra 15 de biopsia; y detectar la ausencia o presencia de una delección de ADNmt de aproximadamente 3379 pb en el tejido normal, así como para el mapeo tridimensional del tumor de próstata, que comprende: obtener muestras de biopsia con aguja por sextantes; y detectar la ausencia o presencia de una delección de ADNmt de aproximadamente 3379 pb en cada una de las muestras por sextantes.

20 Otro aspecto de la invención es proporcionar una delección mitocondrial que abarque aproximadamente los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt para su uso en el diagnóstico del cáncer de próstata.

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1 es un histograma que muestra el número de mutaciones en una posición de nucleótido en el ADN mitocondrial de pacientes con cáncer de próstata.

30 La Figura 2 muestra la primera mitad de los grupos no sinónimos producidos usando el Explorador de Grupos Jerárquicos (HCE).

La Figura 3 muestra la segunda mitad de los grupos no sinónimos producidos usando el Explorador de Grupos Jerárquicos (HCE).

35 La Figura 4 es una copia de la Figura 3, en la que el grupo importante está sombreado.

La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra el diseño y la secuencia de un cebador útil para la detección de la delección de 3,4 kb.

40 La Figura 6 es una gráfica que muestra una comparación del ciclo umbral entre participantes con tejido maligno y con tejido benigno sintomáticos en el estudio de 3,4 kb.

La Figura 7 es una gráfica que muestra el ciclo umbral en relación con el Ejemplo 12.

45 La Figura 8a) es un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio representativo que muestra una mayor frecuencia de la delección de 3895 pb en piel expuesta habitualmente al sol en comparación con piel expuesta ocasionalmente al sol.

50 La Figura 8b) es un histograma de la frecuencia de la delección de 3895 pb en 104 muestras de piel dividida tomadas de diferentes sitios corporales expuestos al sol.

La Figura 9 es un gel que muestra el aumento inducible por UV de la delección de 3895 pb después de 17 dosis repetitivas de UVR.

55 La Figura 10 es una representación esquemática de la localización de cebadores de PCR y sondas TaqMan en el ADNmt usado en el Ejemplo 14 para detectar la delección de 3895 pb.

La Figura 11 son dos gráficas que muestran la relación lineal entre la concentración de molde y el número de ciclo umbral (CT) para la delección de 3895 pb (A) y el patrón interno de tipo silvestre (B).

60 La Figura 12 es una fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra la incidencia de la delección de 3895 pb en dermis (D) y epidermis (E) perilesional histológicamente normal y tumoral (T) tanto de BCC como de SCC.

65 La Figura 13 es una fotografía de geles de agarosa con bromuro de etidio representativos que muestran ejemplos típicos de su nivel correspondiente de delección de 3895 pb, según se detectó por PCR a tiempo real de tres pares de muestras expuestas al sol y tres pares de muestras expuestas al sol intermitentemente.

ES 2 354 452 T3

La Figura 14 es un diagrama de dispersión que muestra los niveles de la delección de 3895 pb expresados como porcentaje en la dermis y epidermis expuesta al sol y expuesta al sol intermitentemente, según se determinó por PCR a tiempo real.

- 5 La Figura 15 es un diagrama que muestra la relación entre los resultados de biopsia y el análisis de ADNmt en el diagnóstico de un tumor de próstata.

Breve descripción de las tablas

- 10 La Tabla 1 es un resumen de mutaciones asociadas con el envejecimiento.

La Tabla 1a es un análisis de componentes principales de mutaciones en el ADNmt de siete regiones codificantes de proteína en tejido de control, benigno distante, benigno adyacente y maligno.

- 15 La Tabla 1b es un análisis de redes neuronales de mutaciones en el ADNmt de siete regiones codificantes de proteína en tejido de control, benigno distante, benigno adyacente y maligno.

- 20 La Tabla 1c es un resumen de las mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en las regiones ND1, ND2, COXI y CYTB de las mitocondrias de 31 pacientes que tienen cáncer de próstata, de tejido de próstata benigno distante, benigno adyacente y maligno.

La Tabla 1d es un análisis de χ^2 de mutaciones en el ADN mitocondrial en tejido benigno distante de glándulas malignas frente a tejido de próstata de sujetos sintomáticos pero muestran tejido maligno.

- 25 La Tabla 2 es un resumen del número medio de delecciones en tumores epidérmicos y tejidos normales adyacentes.

La Tabla 3 es un resumen del método convencional de DHPLC.

- 30 La Tabla 4 es un resumen de las mutaciones mitocondriales (incluyendo el bucle D) de biopsias con aguja de próstata y mutaciones del genoma completo de glándulas prostáticas benignas distantes y adyacentes y malignas de pacientes con cáncer de próstata.

La Tabla 5 es una lista de los cebadores usados para la amplificación completa del genoma mitocondrial para tejidos normales y fijados con formalina a partir de la sangre.

- 35 La Tabla 6 es una lista de cebadores de amplificación para su uso en el Ejemplo 12.

La Tabla 7 son los componentes de qPCR del Ejemplo 12.

- 40 La Tabla 8 muestra los parámetros de ciclado para el Ejemplo 12.

La Tabla 9 es una lista de las sondas usadas en el Ejemplo 14.

Descripción detallada de la invención

- 45 El método de la presente invención puede usarse para diagnosticar enfermedades relacionadas con el ADNmt. El método de la presente invención proporciona el análisis del genoma mitocondrial de un individuo a partir de una muestra biológica, por ejemplo, por amplificación del genoma mitocondrial, secuenciación de una porción del genoma mitocondrial, preferiblemente el genoma mitocondrial completo del individuo usando cualquier medio conocido.

- 50 También puede usarse cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (DHPLC) para explorar rápidamente muchas muestras. La DHPLC puede centrarse en los puntos calientes de mutaciones. La DHPLC es más sensible que la secuenciación automática en términos de detectar mutaciones y puede incluso detectar una heteroplasmia de 2%, en comparación con 20-25% para una secuenciación normal. También pueden desarrollarse métodos para detectar bajos niveles de heteroplasmia (<2%).

- 55 Como se usa en la presente memoria, la expresión “queratosis actínica” se refiere a una lesión epidérmica precursora propuesta de un carcinoma de células escamosas.

- Como se usa en la presente memoria, el “envejecimiento” se refiere a una acumulación de cambios con el tiempo, tanto a nivel molecular como celular.

Como se usa en la presente memoria, el término “alelos” se refiere a una de varias formas alternativas de una secuencia de ADN dada que ocupa un lugar específico en un cromosoma.

- 60 Como se usa en la presente memoria, la expresión “red neuronal artificial (ANN)” se refiere a un dispositivo virtual en el que varios elementos interconectados procesan información simultáneamente, adaptándose y aprendiendo de patrones pasados.

ES 2 354 452 T3

Como se usa en la presente memoria, las expresiones “unir” o “aplicar puntualmente” se refieren al proceso de depositar un ácido nucleico sobre un sustrato sólido para formar una matriz de ácido nucleico, de modo que el ácido nucleico se une irreversiblemente al sustrato sólido mediante enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas.

5

Como se usa en la presente memoria, los términos “atípico” o “anormal” se refieren a un aspecto celular que no es normal, pero que tampoco parece ser maligno.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión “carcinoma de células basales” se refiere a un tipo de cáncer de células cutáneas.

Como se usa en la presente memoria, “benigno” significa sin riesgo para la salud; no recurrente o progresivo; no maligno.

15 Como se usa en la presente memoria, una “enfermedad prostática benigna” puede incluir, pero sin limitación, hiperplasia, inflamación, atrofia, prostatitis, metaplasia y neoplasia intraepitelial prostática.

Como se usa en la presente memoria, la “enfermedad de Bowen” se refiere a carcinoma epidérmico *in situ*.

20 Como se usa en la presente memoria, el “ciclo umbral” (C_T) es el punto en el que la amplificación de diana se eleva por encima del fondo, según se indica por una señal tal como una señal de fluorescencia.

25 Como se usa en la presente memoria, los términos “diagnóstico” o “diagnosticar” significan usar la presencia o ausencia de una mutación o combinación de mutaciones como factor en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. La detección de la mutación o mutaciones puede ser una etapa en el diagnóstico de una patología.

Como se usa en la presente memoria, la “enfermedad” incluye un trastorno u otro estado físico anormal.

30 Como se usa en la presente memoria, los “genomas mitocondriales asociados a enfermedad” se refieren a genomas que contienen mutaciones indicativas o asociadas de otro modo con una enfermedad particular.

35 Como se usa en la presente memoria, una “base de datos” se refiere a un sistema de almacenamiento electrónico (basado en un ordenador usando un programa informático industrial convencional) que tendrá la capacidad de almacenar y proporcionar información recuperable y que permitirá a los investigadores determinar rápidamente la estructura de las secuencias de nucleótidos. La base de datos también almacenará información descriptiva acerca de los individuos que proporcionan las muestras biológicas. Esta información descriptiva incluirá el estado de salud y otros índices pertinentes que puedan correlacionarse con la muestra biológica.

40 Como se usa en la presente memoria, el término “deleciones” se refiere a la eliminación de una región de ADN de una secuencia contigua de ácidos nucleicos, en la que una vez que se ha producido una delección, el hueco se repara volviendo a unir los extremos. Las delecciones pueden variar en tamaño de una base a miles de bases o de mayor tamaño.

45 Como se usa en la presente memoria, el término “duplicaciones” se refiere a cuando una secuencia de ADN específica se copia y se inserta por detrás o por delante de la copia original una o más veces, o en otra parte en el genoma.

50 Como se usa en la presente memoria, el término “heteroplasmia” está definido por la proporción de mutaciones en las secuencias mitocondriales dentro de un órgano o célula. Las mutaciones heteroplásmicas son aquellas mutaciones que se producen en algunas, pero no en todas las copias del genoma mitocondrial.

Como se usa en la presente memoria, la “homoplasmia” significa que todas las secuencias mitocondriales son idénticas.

55 Como se usa en la presente memoria, una “hipermutación” se refiere a una tasa de mutaciones acelerada que no puede explicarse por procesos celulares normales y principios evolutivos convencionales.

60 Como se usa en la presente memoria, el término “inversiones”, se refiere a cuando una longitud de ADN se escinde y se reinserta en orientación inversa.

Como se usa en la presente memoria, la “herencia maternal” se refiere a las mitocondrias que se heredan a través del citoplasma del óvulo.

65 Como se usa en la presente memoria, la “línea maternal” se refiere a la secuencia clonal de ADN mitocondrial según ha pasado verticalmente a través de generaciones sucesivas desde la madre.

Como se usa en la presente memoria, el término “mitocondria” se refiere a un orgánulo citoplasmático eucariota que genera ATP para los procesos celulares.

ES 2 354 452 T3

Como se usa en la presente memoria, el término “mutación” incluye cualquier modificación o cambio en una secuencia de ADN o ARN desde la secuencia de tipo silvestre, incluyendo, sin limitación, mutaciones puntuales, transiciones, inserciones, transversiones, translocaciones, delecciones, inversiones, duplicaciones, recombinaciones o combinaciones de las mismas. La modificación o cambio de la secuencia puede abarcar desde un cambio de una sola base hasta la adición o eliminación de un fragmento completo de ADN o ARN.

Como se usa en la presente memoria, la “carga de mutación” se refiere a un aumento en las mutaciones en el ADNmt que finalmente puede conducir al compromiso de la función del gen implicado o del genoma completo, o puede acumularse en regiones no codificantes.

Como se usa en la presente memoria, una “neoplasia” se refiere a un proceso patológico que puede dar como resultado la transformación a un estado maligno.

Como se usa en la presente memoria, un “tejido no implicado” se refiere a un tejido de una parte del cuerpo que no está asociado con la enfermedad en cuestión.

Como se usa en la presente memoria, una mutación “no sinónima” de un polinucleótido es una mutación que da como resultado un aminoácido codificado diferente.

Como se usa en la presente memoria, el “tejido normal” se refiere a tejido sin manifestaciones visibles de enfermedad según se determina por histología.

Como se define en la presente memoria, una “matriz de ácido nucleico” se refiere a una pluralidad de ácidos nucleicos únicos unidos a una superficie de un soporte sólido a una densidad que supera los 20 ácidos nucleicos diferentes/cm², en la que cada uno de los ácidos nucleicos está unido a la superficie del soporte sólido en una región preseleccionada no idéntica. En una realización, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte sólido es ADN. En una realización preferida, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte sólido es ADNc. En otra realización preferida, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte sólido es ADNc sintetizado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preferiblemente, una matriz de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprende ácidos nucleicos de al menos 150 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, una matriz de ácido nucleico comprende ácidos nucleicos de menos de 6.000 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, una matriz de ácido nucleico comprende ácidos nucleicos de menos de 500 nucleótidos de longitud. En una realización, la matriz comprende al menos 500 ácidos nucleicos diferentes unidos a una superficie del soporte sólido. En otra realización, la matriz comprende al menos 10 ácidos nucleicos diferentes unidos a una superficie del soporte sólido. En otra realización más, la matriz comprende al menos 10.000 ácidos nucleicos diferentes unidos a una superficie del soporte sólido. La expresión “ácido nucleico”, como se usa en la presente memoria, se usa indistintamente con el término “polinucleótido”.

Como se usan en la presente memoria, una “diana de ácido nucleico” o “un ácido nucleico diana” se definen como un ácido nucleico capaz de unirse a un elemento de ácido nucleico de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente por emparejamiento de bases complementarias, habitualmente por formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en la presente memoria, una diana de ácido nucleico puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en la sonda de ácido nucleico pueden unirse mediante un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por lo tanto, las dianas de ácido nucleico pueden ser ácidos peptidonucleicos, en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos más que por enlaces fosfodiéster. Preferiblemente, las dianas de ácido nucleico proceden de extractos de fluidos o tejidos humanos. Más preferiblemente, las dianas de ácido nucleico son ADN, ARN mono- o bicatenario, o híbridos de ADN-ARN sintetizados a partir de extractos de fluido o tejidos humanos.

Como se usa en la presente memoria, el término “núcleo” se refiere al orgánulo más destacado en la célula eucariota, contiene todo el ADN cromosómico.

Como se usa en la presente memoria, el NPV (Valor Predictivo Negativo) se refiere al porcentaje de pacientes con ensayos negativos que no tienen la enfermedad o afección para la que se les está ensayando. Evalúa la fiabilidad de un resultado de ensayo negativo. El cálculo es $NPV = (\text{negativos verdaderos}) / (\text{negativos verdaderos} + \text{falsos negativos})$.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “piel expuesta ocasionalmente al sol” se refiere a piel que se expone a veces u ocasionalmente en un individuo. Por ejemplo, dependiendo del individuo, puede incluir hombros, espalda y pecho.

Como se usa en la presente memoria, el PPV (Valor Predictivo Positivo) se refiere al porcentaje de pacientes con resultado de ensayo positivo que tienen la enfermedad o afección para la que se les está ensayando. Evalúa la fiabilidad de un resultado de ensayo positivo. El cálculo es $PPV = (\text{positivos verdaderos}) / (\text{positivos verdaderos} + \text{falsos positivos})$.

ES 2 354 452 T3

Como se usa en la presente memoria, el “ensayo de PSA” se refiere al ensayo de antígeno prostático específico; un antígeno que se encuentra en la sangre que puede ser indicativo de cáncer de próstata.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “mutación puntual” se refiere al cambio de un solo nucleótido en el ADN.

Como se usa en la presente memoria, un “polimorfismo” se refiere a una variación de secuencia en una población de alelos o genomas de ADNmt.

Como se usa en la presente memoria, las “lesiones precursoras” se refieren a una mutación de ADN, o combinaciones de las mismas, que indican una posible asociación con enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones “predisposto a una enfermedad” o una “predisposición a una enfermedad” significan que los individuos presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno o presentan un mayor riesgo de aparición temprana de la enfermedad o trastorno que el individuo medio, debido a la presencia o ausencia de mutaciones que están asociadas con la enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente memoria, una “preneoplasia” se refiere a indicios a nivel celular o del ADN de que una célula puede estar en el umbral de convertirse en neoplásica.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones “región preseleccionada”, “región predefinida” o “posición única” se refieren a un área localizada en un sustrato que es, era, o pretende usarse para el depósito de un ácido nucleico, y a la que se hace referencia de otro modo en la presente memoria en la alternativa como una “región seleccionada” o simplemente una “región”. La región preseleccionada puede tener cualquier forma conveniente, por ejemplo, circular, rectangular, elíptica, en forma de cuña, etc. En algunas realizaciones, una región preseleccionada es más pequeña que aproximadamente 1 cm², más preferiblemente inferior a 1 mm², aún más preferiblemente inferior a 0,5 mm² y, en algunas realizaciones, de aproximadamente 0,125 a 0,5 mm².

Como se usa en la presente memoria, la “presencia” de una mutación en el ADNmt incluye mutaciones heteroplásicas y, por lo tanto, se contempla que puede existir además la presencia de algunos ADNmt normales en una muestra en la que está presente ADN mutado.

Como se usa en la presente memoria, la “piel expuesta raramente al sol” se refiere a piel que se expone rara vez o casi nunca en un individuo. Por ejemplo, dependiendo del individuo, puede incluir las nalgas y los talones. Ésta también puede denominarse piel “protegida del sol”.

Como se usa en la presente memoria, el “ciclo umbral C_T de PCR a tiempo real” es el punto (ciclo) en el que la fluorescencia cruza la línea umbral.

Como se usa en la presente memoria, una “mutación somática” se refiere a un cambio en la secuencia de ADN después de la fecundación.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones “sustrato sólido” o “soporte sólido” se refieren a un material que tiene una superficie rígida o semirrígida. Los términos “sustrato” y “soporte” se usan indistintamente en la presente memoria con las expresiones “sustrato sólido” y “soporte sólido”. El soporte sólido puede ser biológico, no biológico, orgánico, inorgánico, o una combinación de cualquiera de estos, existiendo como partículas, hebras, precipitados, geles, láminas, tubos, esferas, recipientes, capilares, almohadillas, cortes, películas, placas, portaobjetos, etc. Con frecuencia, el sustrato es una superficie de vidrio o silicio, (poli)tetrafluoroetileno, (poli)vinilidendifluoruro, poliestireno, policarbonato, una membrana cargada, tal como nylon 66 o nitrocelulosa, o combinaciones de las mismas. En una realización preferida, el soporte sólido es de vidrio. Preferiblemente, al menos una superficie del sustrato será sustancialmente plana. Preferiblemente, la superficie del soporte sólido contendrá grupos reactivos, incluyendo, pero sin limitación, carboxilo, amino, hidroxilo, tiol o similares. En una realización, la superficie es ópticamente transparente.

Como se usa en la presente memoria, la “piel expuesta al sol” se refiere a piel que se expone “habitualmente” u “ocasionalmente” al sol.

Como se usa en la presente memoria, la “piel protegida del sol” se refiere a piel que se expone raramente al sol.

Como se usa en la presente memoria, un “carcinoma de células escamosas” se refiere a un tipo de cáncer de células cutáneas.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “asociado de forma estable” se refiere a un ácido nucleico que está unido de forma irreversible a un sustrato sólido para formar una matriz por medio de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, de modo que el ácido nucleico conserva su posición preseleccionada única respecto a todos los demás ácidos nucleicos que están asociados de forma estable con una matriz, o a todas las demás regiones preseleccionadas en el sustrato sólido en las condiciones en las que se analiza una matriz (es decir, hibridación y exploración).

ES 2 354 452 T3

Un número “estadísticamente significativo” de secuencias de ADN mitocondriales se determina por o mediante el uso de algoritmos estadísticos de χ^2 convencionales que usan o determinan las puntuaciones observadas frente a las esperadas.

5 Como se usa en la presente memoria, una “mutación sutil” se refiere a un bajo nivel de mutación en el umbral de detección.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “benignos sintomáticos” se refiere a pacientes que presentan uno o más síntomas asociados con un tumor maligno de próstata, incluyendo, pero sin limitación, PSA elevado, puntuación 10 de examen rectal digital (DRE) anormal, dificultad para orinar, sangre y/o pus en la orina, dolor de la parte inferior de la espalda, pélvico y en la parte superior del muslo, o eyaculación dolorosa, pero que han sido diagnosticados como benignos por examen de tejido de biopsia por un patólogo cualificado.

Como se usa en la presente memoria, una mutación “sinónima” es una mutación en un polinucleótido que no tiene 15 un efecto sobre el aminoácido codificado.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “transiciones” se refiere a la sustitución de bases nitrogenadas semejantes, de pirimidina a pirimidina, de purina a purina. Una mutación en la que se sustituye una pirimidina por otra o en la que se sustituye una purina por otra.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión “transversiones” se refiere a la sustitución de bases nitrogenadas distintas, de purina a pirimidina, de pirimidina a purina. Una mutación en la que se sustituye o reemplaza una purina por una pirimidina o viceversa.

25 Como se usa en la presente memoria, la “piel expuesta habitualmente al sol” se refiere a piel que se expone habitualmente o con frecuencia en un individuo. Por ejemplo, dependiendo del individuo, puede incluir el cuero cabelludo, la cara, el cuello y las orejas.

30 *ADNmt y diagnóstico de enfermedades específicas*

En una realización de la presente invención, se proporcionan métodos para diagnosticar el cáncer de próstata a través de comparaciones de secuencias de ADNmt. Diagnosticar enfermedades tales como el cáncer de próstata con ADNmt, en lugar de con el ADN nuclear, tiene varias ventajas. En primer lugar, el ADNmt, un genoma menos complejo, se entiende fácilmente a nivel de individuo y de población, por lo tanto, una gran base de datos de ADNmt con genomas normales y asociados a enfermedad hace que el diagnóstico individual sea extremadamente preciso. Por consiguiente, se entienden variaciones en relación con la enfermedad. En segundo lugar, el ADNmt tiene una tasa de mutación 10 veces mayor que el ADN nuclear (Wallace 1992). Las reorganizaciones nucleares, que sugieren una enfermedad preliminar, se comunican rápidamente a las mitocondrias, donde aparecen como mutaciones somáticas. 35 En tercer lugar, el ADNmt tiene un patrón de herencia maternal y es esencialmente clonal en el sentido de que todas las mitocondrias comienzan con la misma secuencia de ADNmt, por lo tanto, las variaciones de este estado clonal se detectan fácilmente. Además, el ADNmt no muestra pruebas convincentes de recombinación, por lo tanto cualquier alteración en la secuencia es un acontecimiento somático. Cualquier mitocondria que alberga una mutación o mutaciones es en un sentido “recesiva” como consecuencia de que existen muchos genomas mitocondriales (2-IO copias) 40 por mitocondria y muchas mitocondrias por célula (500-2.000). Además, los genomas mitocondriales pueden tolerar niveles muy elevados (de hasta 90%) de mitocondrias con genomas dañados. Esto sucede por complementación mediante el ADNmt de tipo silvestre restante (Chomyn *et al.* 1992). Sin embargo, los genomas mutados tienen una ventaja replicativa sobre los genomas de tipo silvestre porque habitualmente son más pequeños (Hayashi *et al.* 1991), por lo tanto, existe expansión clonal del ADNmt mutado (Brierley *et al.* 1998), sugiriendo que, a diferencia de los 45 genes nucleares, existe muy poca o ninguna selección en contra de células que alberguen mutaciones de ADNmt. Debido a esta elevada tasa de mutación, las mutaciones y/o delecciones que aparecen en el ADNmt se mantienen durante toda la vida útil de la célula y pueden servir como registro de las exposiciones a diversos mutágenos. La integridad del ADNmt se mantiene por mecanismos de reparación nuclear y se ha sugerido que un defecto en estos loci da como resultado un trastorno dominante autonómico asociado con delecciones mitocondriales múltiples (Zeviani *et al.* 50 1990).

Por consiguiente, el ADNmt puede funcionar como un centinela de alerta temprana de acontecimientos nucleares tempranos relacionados con una diversidad de cánceres u otras enfermedades. Por último, el genoma mitocondrial puede secuenciarse y controlarse para determinar mutaciones de forma individual.

60 Los métodos y productos de la presente invención detectan mutaciones tanto heteroplásicas como homoplásicas. De hecho, las mutaciones heteroplásicas pueden ser clave para la detección de la génesis temprana de una enfermedad, trastorno o del envejecimiento. Además, aunque sitios de mutación específicos pueden indicar una patología, trastorno o proceso de envejecimiento particular, la carga de mutación total también es importante en la determinación 65 de la génesis, presencia y progresión de una enfermedad, un trastorno o del envejecimiento.

La presente invención permite la capacidad de examinar fluidos corporales o tejidos normales o benignos para determinar la génesis y/o presencia del cáncer de próstata. Por ejemplo, la presente invención permite la capacidad de

ES 2 354 452 T3

examinar fluidos corporales o tejidos benignos para determinar la presencia de una preneoplasia, neoplasia, progresión hacia tumor maligno y tumor maligno.

- Las mutaciones mitocondriales detectadas por los métodos de la invención se comparan con las variaciones inter- e intrapoblacionales en el ADN mitocondrial y pueden incluir la comparación con el ADN mitocondrial de tejido no implicado del sujeto o con ADN mitocondrial de un parente materno. No es necesario analizar el genoma mitocondrial completo. Por ejemplo, no es necesario secuenciar el genoma mitocondrial completo, sólo una porción seleccionada del mismo. Por consiguiente, una muestra de ADN mitocondrial puede proporcionar un diagnóstico.

10

Diagnóstico de cáncer de próstata

En otra realización de la invención, se proporciona un sistema para el diagnóstico del cáncer de próstata. La acumulación relacionada con la edad de defectos de ADNmt podría predisponer a un individuo a la aparición de ciertos trastornos clínicos tales como cáncer de próstata, que es prevalente en hombres de mediana edad y de edad avanzada. En una realización preferida, tienen lugar exploraciones de cáncer de próstata de rutina por secuenciación del genoma mitocondrial a partir de fluido del masaje de próstata. La presencia de células epiteliales transformadas en células cancerosas puede determinarse por amplificación del ADNmt a partir de fluido de masaje de próstata, eclipsando las técnicas de diagnóstico actuales, tales como el examen rectal digital y el PSA. Recientemente, Fliss *et al.* (2000) identificaron ADNmt mutado en muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga. Hallazgos similares en el fluido del masaje de próstata proporcionan un método de detección temprana no invasivo para el cáncer de próstata. Pueden diagnosticarse diferentes tipos de cáncer de próstata, así como diferenciar entre células de crecimiento rápido agresivas en pacientes a diferencia de cáncer de próstata como un todo. Por ejemplo, la delección de 3,4 kb identificada en los contenidos del solicitante puede usarse como un indicio de cáncer de próstata.

25

Detección temprana y control de la progresión del cáncer de próstata

El sistema y método de la presente invención puede usarse para detectar cáncer, y en particular cáncer de próstata, en una fase temprana, y antes de cualquier anomalía histológica. Por ejemplo, el sistema y método de la presente invención puede usarse para detectar una preneoplasia en tejido de próstata. El sistema puede usarse para detectar la génesis y la progresión del cáncer de próstata. Pueden ensayarse mutaciones, incluyendo tanto mutaciones sutiles como hipermutaciones (Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003) en el ADN mitocondrial de tejido de próstata humano, o del fluido asociado con la próstata (por ejemplo, fluido del masaje de próstata u orina) para determinar la presencia de neoplasias, y reensayarse a intervalos para realizar un seguimiento de la transformación en cáncer, diagnosticar su malignidad o confirmar un estado benigno continuado.

Estas mutaciones pueden determinarse por comparación con mitocondrias extraídas de tejidos no implicados tales como, pero sin limitación: sangre, orina, pelo e hisopos bucales. Esta comparación directa elimina los polimorfismos, el fondo maternal o las variaciones de haplotipo normales no asociadas con enfermedad. Las mutaciones también pueden compararse con secuencias mitocondriales asociadas con variaciones inter- e intrapoblacionales. Una o más mutaciones de fluido o tejido del órgano o sistema corporal en cuestión indica la posible génesis de enfermedad. Después se controla a la persona a intervalos sucesivos para determinar un aumento en las mutaciones en otros sitios y/o un aumento en el número de genomas mitocondriales mutados, indicando la progresión de la enfermedad. El tejido benigno de la próstata no siempre puede considerarse no implicado. De hecho, como puede observarse en el Ejemplo 9 a continuación, lo que parece ser tejido benigno puede contener mutaciones mitocondriales asociadas con preneoplasias, neoplasias, progresión hacia tumor maligno o tumor maligno. Además, la carga de mutación, más que las mutaciones específicas, puede ser decisiva en la determinación de la enfermedad o progresión de la enfermedad. El sistema y método de la presente invención detecta mutaciones heteroplásmicas así como homoplásmicas.

La glándula prostática se controla para determinar mutaciones en el genoma mitocondrial a través de fluido de masaje de próstata (PMF) tomado durante un examen rectal digital (DRE) inicial de la próstata. Las células dentro del PMF se concentran, se extienden en un portaobjetos y se tiñen con inmunoperoxidasa para PSA para la identificación de células epiteliales prostáticas. Estas células prostáticas se recuperan selectivamente por microdissección mediante captura con láser. El ADN mitocondrial de estas células se analiza y se compara con el ADN mitocondrial de tejido no implicado y/o con consecuencias de variaciones inter- e intrapoblacionales. Por ejemplo, el análisis del ADN puede comprender la secuenciación del ADNmt. El ADN total se extrae de estas células y se usan cebadores específicos mitocondriales diseñados para su uso con material de biopsia tratado con formalina (Tabla 5) para amplificar el genoma completo del ADNmt con amplicones solapantes. Estos productos de PCR se secuencian después por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo matrices de resecuenciación de ADN. Los resultados de secuenciación se exploran para heteroplasmias y mutaciones y se comparan con una base de datos de mutaciones de ADNmt conocidas asociadas con tejidos de próstata benignos y malignos. Basándose en estas comparaciones, se devuelve una designación en lo que se refiere a la afección de la próstata respecto a, pero sin limitación: benigno (sin mutaciones); preneoplasia o neoplasia (bajo nivel de mutaciones); o tumor maligno (alto nivel de mutaciones). En la situación de benigno, preneoplasia y neoplasia, la próstata puede controlarse para determinar su progresión a través de exploraciones de PMF regulares como se describe.

ES 2 354 452 T3

Como alternativa, material de biopsia que se ha diagnosticado como benigno, atípico, anormal puede someterse a un ensayo similar por microdissección mediante captura con láser de la biopsia, o el tejido puede retirarse por raspado de los portaobjetos, o pueden usarse secciones titulares montadas, seguido de extracción de ADN, amplificación, análisis de secuencia y comparación con bases de datos.

Como alternativa a la secuenciación y a la comparación con una base de datos, podría usarse tecnología de micromatrizes para identificar un patrón de mutaciones específico, o una carga de mutaciones basándose en cualquier cantidad o combinación de las mutaciones enumeradas en la Tabla 4, a través de la construcción de oligonucleótidos, o de un conjunto específico de oligonucleótidos.

La progresión de la enfermedad puede controlarse por comparación de mutaciones de ADNmt a intervalos sucesivos con una base de datos de mutaciones en genomas mitocondriales asociadas con preneoplasia, neoplasia y cáncer de próstata, incluyendo el cálculo de una carga de mutación total. El tejido de biopsia de próstata puede ensayarse para determinar preneoplasias, neoplasias y/o la progresión maligna en células descritas clínicamente como benignas, normales, atípicas o anormales por métodos histológicos/patológicos comunes u otros métodos clínicos.

De forma similar, el ADN puede analizarse para determinar delecciones específicas que se sepaa que están asociadas con enfermedad, por ejemplo, cáncer de próstata. Esto puede realizarse usando tecnologías basadas en PCR para explorar para dichas delecciones.

Recogida de muestras

Pueden recogerse muestras biológicas por cualquier medio conocido, con el fin de construir una base de datos de secuencias de ADNmt o realizar un ensayo de diagnóstico en un individuo. Las muestras destinadas a la generación de una base de datos incluyen, pero sin limitación: bancos de tumores, estudios de linaje maternal que implican a individuos afectados y no afectados del mismo linaje maternal, así como estudios de linaje maternal de grupos o poblaciones con altas frecuencias de enfermedades específicas, tales como, pero sin limitación: cáncer de piel y próstata, evaluación del estado de salud y del envejecimiento. Por ejemplo, pueden usarse FTA® Gene Cards® para recoger y archivar muestras biológicas. Las muestras adecuadas incluyen cualquier tejido o fluido corporal derivado de mesotelio, epitelio o endotelio. Dichos tejidos y fluidos incluyen, pero sin limitación, sangre, esputo, células bucales, saliva, fluido de masaje de próstata, sudor, hueso, pelo, tejido linfático, frotis cervicales, aspirado de mama, materia fecal, eyaculado, flujo menstrual, orina y tejido de biopsia. Preferiblemente, se obtiene una muestra de aproximadamente 100 µl de sangre, de 100 µg a 25 mg de tejido sólido. En el caso de que se sospeche cáncer de piel, se toman células o tejido cutáneo (de normal, NMSC y lesiones precursoras) de biopsia de piel o una técnica de succión de lesiones vesicantes de rutina. Cuando se sospecha una enfermedad, los médicos de atención primaria, oncólogos u otros médicos pueden extraer tanto tejido normal como tejido enfermo sospechoso del paciente. Con el fin de analizar la exposición al sol, puede tomarse tejido de la dermis o de la epidermis, o una combinación de ambas.

Para muestras de tumores tales como de próstata o piel, secciones transversales replicadas (5 micrómetros) de tejidos microdisecados embebidos en parafina se desparafinian antes de teñir un corte con hematoxilina y eosina (HE), tiñéndose el replicado con verde de metilo (MG) como patrón en la técnica. Las tinciones con HE se clasifican por un patólogo en grados normal, precursor y aplicable de progresión tumoral. Los cortes de MG replicados se usan para captura con láser de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Arcturus) de las células clasificadas.

Extracción de ADNmt

La extracción del ADN puede tener lugar usando cualquier método conocido en la técnica, seguido de amplificación de todo o una región del genoma mitocondrial, y puede incluir la secuenciación del genoma mitocondrial, como se describe en Current Protocols in Molecular Biology.

La etapa de detección de la presencia de mutaciones en el ADNmt puede seleccionarse de cualquier técnica como conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, el análisis del ADNmt puede comprender la secuenciación del ADNmt, la amplificación del ADNmt por PCR, hibridaciones de transferencia de Southern, Northern, Western, South-Western, HPLC desnaturizante, hibridación con micromatrizes, biomicroplacas o microplacas de genes, análisis de marcadores moleculares, biodetectores, generación de perfiles de temperatura de fusión o una combinación de cualquiera de los anteriores. Además, pueden usarse técnicas estadísticas tales como la Extracción de Reglas de Inducción y la Generación de Redes Neuronales.

ES 2 354 452 T3

Secuenciación de ADNmt

PCR

5 Las secuencias polinucleotídicas de la invención pueden amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los métodos de PCR son bien conocidos por los expertos en la materia. La PCR requiere la presencia de un ácido nucleico a amplificar, dos cebadores oligonucleotídicos monocatenarios que flanquean la secuencia a amplificar, una ADN polimerasa, desoxirribonucleósidos trifosfato, un tampón y sales. El método de PCR es bien conocido en la técnica. La PCR se realiza como se describe en Mullis y Falloona, 1987, Methods Enzymol., 155: 335.

10 10 En general, la PCR se realiza usando ADN de molde (al menos 1 fg; más habitualmente, 1-1000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores oligonucleotídicos. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 μ l de ADN, 25 pmol de cebador oligonucleotídico, 2,5 μ l de tampón de PCR 1 10X (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 μ l de dNTP 1,25 μ M, 0,15 μ l (o 2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 μ l. Se cubre con aceite mineral y la PCR se realiza usando un termociclador programable.

20 La longitud y la temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustan de acuerdo con las necesidades de rigurosidad en realidad. La temperatura de hibridación y el tiempo se determinan tanto por la eficacia con la que se espera que un cebador híbride con un molde como por el grado de emparejamientos erróneos que se va a tolerar. La capacidad para optimizar la rigurosidad de las condiciones de hibridación de cebadores está bien dentro del conocimiento de un experto en la materia. Se usa una temperatura de hibridación de entre 40°C y 72°C. En general, la desnaturalización inicial de las moléculas de molde se produce normalmente a entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido de 20-40 ciclos que consisten en desnaturalización (94-99°C) durante 15 segundos a 1 minutos/kb, hibridación (temperatura determinada como se ha analizado anteriormente; 1-2 minutos) y extensión (72°C durante 1 25 minutos). La etapa de extensión final se lleva a cabo generalmente durante 4 minutos a 72°C y puede seguirse de una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

Secuenciación de ADN

30 30 Puede usarse cualquier medio conocido para secuenciar el genoma mitocondrial. Preferiblemente, el ADNmt se amplifica por PCR antes de la secuenciación. Los productos de PCR pueden secuenciarse directamente o clonarse en un vector que después se pone en un hospedador bacteriano. Se encuentran ejemplos de métodos de secuenciación de ADN en Brumley, R. L. Jr. y Smith, L. M., 1991, Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis, Nucleic Acids Res. 19: 41214126 y Luckey, J. A., *et al.*, 1993, High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis, Methods Enzymol. 218: 154-172. El uso combinado de PCR y secuenciación de ADNmt se describe en Hopgood, R., *et al.*, 1992, Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products, Biotechniques 13: 82-92 y Tanaka, M. *et al.*, 1996, Automated sequencing of mtDNA, Methods Enzymol. 264: 407421.

40 40 *Análisis de Delecciones y Detección*

Una estrategia preferible es la técnica de PCR de extensión prolongada (LX-PCR) usando el sistema de PCR Expand Long Template (Boehringer Mannheim). Usando la técnica de LX-PCR que se ha establecido y validado en el laboratorio de Birch-Machin (Ray *et al.* 2000), existe la oportunidad de explorar rápidamente el espectro completo de delecciones de ADNmt a diferencia de la incidencia de una sola delección.

50 50 Puede usarse un método de PCR semicuantitativa (Corral-Debrinski *et al* 1991) para estimar la proporción de la delección de ADNmt⁴⁹⁷⁷ en el ADNmt total.

Además, puede usarse transferencia de Southern y tecnología de sondas marcadas con isótopos o cualquier otra técnica que sea convencional en la técnica para la detección de delecciones también.

55 55 Puede usarse PCR cuantitativa para cuantificar la cantidad de cualquier diana de delección específica usando un cebador que tienda un puente sobre la unión de secuencia recién formada. La cantidad de moléculas de ADNmt deletreadas puede compararse con la cantidad de ADNmt de tipo silvestre para determinar la proporción de moléculas de ADNmt deletreadas.

Secuenciación de productos de PCR

60 60 Puede usarse cualquier medio conocido para secuenciar los productos de PCR. Preferiblemente, la secuencia de ADN completa se caracteriza por secuenciación con didesoxi usando la tecnología ABI Big Dye Terminator™ y una serie de 72 cebadores solapantes, cada uno para cadenas pesadas y ligeras. La secuenciación se produce en una, varias o una combinación de plataformas de ABI, tales como la 310, 3100 ó 3700. Las reacciones de secuenciación se realizan de acuerdo con la recomendación del fabricante.

ES 2 354 452 T3

Análisis de mutaciones del genoma mitocondrial usando cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (DHPLC)

- Antes de la secuenciación del genoma mitocondrial y de la identificación de puntos calientes de mutaciones, puede 5 usarse DHPLC para explorar rápidamente para mutaciones en muchas muestras. Esta técnica proporciona una mayor sensibilidad en la identificación de bajos niveles de heteroplasmia. No puede detectar cambios homoplásicos pero complementará la secuenciación tradicional. Aparte de las mutaciones homoplásicas recientemente identificadas en tumores, la amplia mayoría de las mutaciones de ADNmt descritas son heteroplásicas (Chinnery *et al.* 1999). Estos cambios de ADNmt heteroplásicos dan como resultado la formación de heterodúplex después de la amplificación por 10 PCR del ADNmt. La exploración rápida para mutaciones de ADNmt heteroplásicas se determinó usando la técnica relativamente nueva de cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (DHPLC) (Oefner y Underhill, 1998). Esta técnica se ha usado recientemente para explorar rápidamente e identificar genomas de ADNmt completos 15 para mutaciones puntuales heteroplásicas hasta niveles de <5% (Van den Bosch *et al.* 2000).
- La DHPLC puede realizarse en el Sistema de Análisis de Fragmentos de ADN WAVE™ (Transgenomic, Omaha, USA) que proporciona un procedimiento de exploración totalmente automático. La misma tecnología puede usarse 20 para explorar para mutaciones heteroplásicas de ADNmt. Preferiblemente, el genoma de ADNmt completo se amplifica por PCR en 13 fragmentos solapantes usando dos condiciones de PCR diferentes, como se describe por van den Bosch *et al.* (2000). Los productos de PCR de 1-2 kb se digieren en fragmentos de 90-600 pb y se resuelven a su temperatura de fusión óptima. Las mutaciones se representan como dos picos y las mutaciones con bajo porcentaje, tales como <2% de heteroplasmia, como un “saliente” en el pico.

La secuenciación de ADN también puede tener lugar usando una micromatriz, como se sabe en la técnica (Chee *et al.* 1996).

25

Análisis de Datos

Una vez secuenciadas, las secuencias de ADNmt normales y asociadas a enfermedad se archivan para su com- 30 paración en una base de datos. Dispositivos de resecuenciación, tecnología de micromatrizes, sistemas microfluidos integrados de amplificación y análisis, alta velocidad, alto rendimiento, detección de mutaciones y otros métodos, pueden usarse todos con los métodos de la presente invención.

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación del genoma mitocondrial individual se comparan con datos a 35 nivel de población. Los datos se obtienen por obtención de muestras y secuenciación de ADNmt como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, la base de datos contiene información de estudios de líneas maternales. Los datos a nivel de población se mantienen en una base de datos. Puede usarse cualquier base de datos adecuada.

Preferiblemente, se usa una base de datos de investigación de evaluación multidimensional de datos clínicos y 40 biológicos, que proporciona la infraestructura bioinformática necesaria para la recogida, procesamiento y disseminación de la información amasada por los laboratorios implicados en esta empresa. La base de datos es un sistema electrónico centralizado que relaciona redes dando como resultado un recurso dinámico y potente.

A la base de datos puede accederse por cualquier medio conocido y, preferiblemente, a través de una ruta de Internet 45 segura. Preferiblemente, la base de datos se desarrolla usando un algoritmo de comercio electrónico, se construye en un servidor y se despliega usando un servidor de aplicaciones que soporta un alto volumen de usuarios al mismo tiempo a través de características de rendimiento y escalabilidad optimizadas. Un servidor “web” separado puede proporcionar el fundamento de la arquitectura del sitio web ya que puede servir como punto central a través del cual debe fluir todo el contenido, las aplicaciones y las transacciones antes de llegar a los usuarios.

50

Se usan algoritmos de minería de datos conocidos en la técnica para descubrir patrones, grupos y modelos de datos (SAS 2000). Además, se desarrollarán algoritmos y métodos inteligentes para: la aparición de mutaciones y las tasas de mutación, los patrones de mutaciones para la detección de enfermedades, la recuperación de la información y otros programas informáticos de análisis de secuencia complejos.

55

Elementos de Ácido Nucleico y Sondas

La invención proporciona elementos de ácido nucleico y sondas que se unen específicamente a una secuencia de 60 ácido nucleico diana. La secuencia de ácido nucleico diana es un ácido nucleico o una región de un ácido nucleico que se va a detectar, como indicio de una enfermedad tal como cáncer de próstata, cáncer de piel de tipo no melanoma y similar. Las secuencias de ácido nucleico diana a analizar usando una micromatriz de la invención proceden preferiblemente de muestras de fluidos o tejidos humanos. La invención proporciona secuencias de ácido nucleico diana que comprenden ARN o el ácido nucleico correspondiente al ARN (es decir, ADNc) o ADN. Los elementos de ácido nucleico se asocian de forma estable con un soporte sólido para comprender una matriz de acuerdo con la invención. Los elementos de ácido nucleico pueden ser mono- o bicatenarios y pueden ser un fragmento de PCR amplificado a 65 partir de ADNc.

ES 2 354 452 T3

La invención también proporciona secuencias polinucleotídicas que comprenden una sonda. Como se usa en la presente memoria, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que forma una estructura de dúplex con una secuencia en el ácido nucleico diana, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en la región diana. La sonda puede marcarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Una sonda de acuerdo con la invención puede ser mono- o bicatenaria.

Dispositivos de diagnóstico

10 La invención incluye dispositivos de diagnóstico tales como biomicroplacas, microplacas de genes o micromatrizes usadas para diagnosticar enfermedades específicas o identificar mutaciones específicas. Todos los genomas mitocondriales secuenciados se evalúan para crear una estructura de consenso de la disposición de pares de bases y se les asigna un índice prohibitivo para la proporción de delecciones y mutaciones de pares de bases asociadas con una enfermedad o trastorno particular. La disposición de diagnóstico se usa después para crear biomicroplacas, microplacas de genes o micromatrizes.

15 Una vez que se identifican las secuencias asociadas con enfermedades, patologías o trastornos particulares, puede usarse la hibridación de ADNmt con una matriz de oligonucleótidos para identificar mutaciones particulares. Puede usarse cualquier método de hibridación conocido. Preferiblemente, se usa una matriz que tiene sondas oligonucleotídicas que coinciden con la región mutada o de tipo silvestre y una sonda de control. Son adecuadas matrices disponibles en el mercado tales como micromatrizes o microplacas de genes. Estas matrices contienen miles de pares de sondas de control y emparejadas en un portaobjetos o microplaca y son capaces de secuenciar el genoma completo muy rápidamente. Están disponibles artículos de revisión que describen el uso de micromatrizes en el análisis de secuencias de ADN y del genoma en www.gene-chips.com.

25

Micromatriz

30 Las matrices de polinucleótidos proporcionan una técnica de alto rendimiento que puede ensayar un gran número de polinucleótidos en una muestra que comprende una o más secuencias de ácido nucleico diana. Las matrices de la invención son útiles para el análisis de la expresión de genes, el diagnóstico de enfermedad y el pronóstico de enfermedad (por ejemplo, el control de la respuesta de un paciente a terapia, exploración de fármacos y similares).

35 Se usa cualquier combinación de las secuencias polinucleotídicas de ADNmt indicativas de enfermedad, envejecimiento u otras mutaciones relacionadas con la salud para la construcción de una micromatriz.

40 Las muestras de ácido nucleico diana a analizar usando una micromatriz proceden de cualquier tejido o fluido humano que contiene cantidades adecuadas de ADNmt, como se ha descrito previamente, preferiblemente fluido de masaje de próstata, tumores sólidos, tejidos benigno, sangre y orina. Las muestras de ácido nucleico diana se ponen en contacto con elementos polinucleotídicos en condiciones de hibridación suficientes para producir un patrón de hibridación de complejos de ácido nucleico/diana complementarios.

Construcción de una micromatriz

45 La micromatriz comprende una pluralidad de polinucleótidos únicos unidos a una superficie de un soporte sólido, en la que cada uno de los polinucleótidos está unido a la superficie del soporte sólido en una región preseleccionada no idéntica. Cada muestra asociada en la matriz comprende una composición de polinucleótidos, de identidad conocida, habitualmente de secuencia conocida, como se describe en más detalle a continuación. Puede emplearse en la invención cualquier sustrato imaginable.

55 La matriz se construye usando cualquier medio conocido. Los elementos de ácido nucleico pueden producirse usando técnicas establecidas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la transcripción inversa (RT). Estos procedimientos son similares a los actualmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, PCR Strategies, Michael A. Innis (Editor), *et al.* (1995) y PCR: Introduction to Biotechniques Series, C. R. Newton, A. Graham (1997)). Se purifican polinucleótidos amplificados por procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, purificación en columna). Un polinucleótido se considera puro cuando se ha aislado para que esté sustancialmente libre de cebadores y productos incompletos producidos durante la síntesis del polinucleótido deseado. Preferiblemente, un polinucleótido purificado también estará sustancialmente libre de contaminantes que puedan obstaculizar o enmascarar de otro modo la actividad de unión de la molécula.

60 En las matrices de la invención, las composiciones de polinucleótidos se asocian de forma estable con la superficie de un soporte sólido, en las que el soporte puede ser un soporte sólido rígido o flexible.

65 Cualquier soporte sólido al que pueda unirse un elemento de ácido nucleico puede usarse en la invención. Los ejemplos de materiales de soporte sólidos adecuados incluyen, pero sin limitación, silicatos tales como gel de vidrio y sílice, papeles de celulosa y nitrocelulosa, nylon, poliestireno, polimetacrilato, látex, goma y resinas de fluorocarbono tales como TEFLON™.

ES 2 354 452 T3

El material de soporte sólido puede usarse en una amplia diversidad de formas incluyendo, pero sin limitación, portaobjetos y perlas. Los portaobjetos proporcionan varias ventajas funcionales y, por lo tanto, son una forma preferida de soporte sólido. Debido a su superficie plana, se minimizan los reactivos de hibridación y sondas usando portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos también permiten la aplicación dirigida de reactivos, son fáciles de mantener 5 a una temperatura constante, son fáciles de lavar y facilitan la visualización directa del ARN y/o ADN inmovilizado en el soporte sólido. La eliminación del ARN y/o ADN inmovilizado en el soporte sólido también se facilita usando portaobjetos.

10 El material particular seleccionado como soporte sólido no es esencial para la invención, siempre que proporcione la función descrita. Normalmente, los que preparan o usan la invención seleccionarán el mejor material disponible en el mercado basándose en la economía del coste y la disponibilidad, las necesidades de aplicación esperadas del producto final y las demandas del proceso de fabricación global.

15 Se usan numerosos métodos para la unión de los elementos de ácido nucleico de la invención al sustrato (un proceso denominado aplicación puntual). Por ejemplo, los polinucleótidos se unen usando las técnicas de, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.807.522. Como alternativa, la aplicación puntual se lleva a cabo usando tecnología de impresión por contacto.

20 La cantidad de polinucleótido presente en cada composición será suficiente para proporcionar una hibridación y detección adecuadas de las secuencias polinucleotídicas diana durante el ensayo en el que se emplea la matriz. En general, la cantidad de cada elemento de ácido nucleico asociado de forma estable con el soporte sólido de la matriz es de al menos aproximadamente 0,1 ng, preferiblemente de al menos aproximadamente 0,5 ng y, más preferiblemente, de al menos aproximadamente 1 ng, donde la cantidad puede ser tan alta como de 1000 ng o superior, pero habitualmente no superará aproximadamente 20 ng. Cuando el elemento de ácido nucleico se “aplica puntualmente” sobre el 25 soporte sólido en un punto que comprende una dimensión circular global, el diámetro del “punto” variará generalmente de aproximadamente 10 a 5.000 μm , habitualmente de aproximadamente 20 a 2.000 μm y, más habitualmente, de aproximadamente 50 a 1.000 μm .

30 Los polinucleótidos de control pueden aplicarse puntualmente en la matriz y usarse como polinucleótidos de control de la expresión de diana y nucleótidos de control de emparejamientos erróneos para controlar la unión inespecífica o la hibridación cruzada con un polinucleótido en la muestra distinto de la diana a la que se dirige la sonda. Las sondas de emparejamiento erróneo indican por lo tanto si una hibridación es específica o no. Por ejemplo, si la diana está presente, las sondas perfectamente emparejadas deberían ser sistemáticamente más brillantes que las sondas emparejadas erróneamente. Además, si están presentes todos los emparejamientos erróneos centrales, las sondas de emparejamiento erróneo se usan para detectar una mutación.

Preparación de diana

40 Las dianas para las micromatrices proceden de muestras de tejidos o fluidos humanos. Puede ser deseable amplificar la muestra de ácido nucleico diana antes de la hibridación. Un experto en la materia apreciará que independientemente del método de amplificación que se use, si se desea un resultado cuantitativo, debe tenerse cuidado de usar un método que mantenga o controle las frecuencias relativas de los polinucleótidos amplificados. Los expertos en la materia conocen bien métodos de amplificación “cuantitativa”. Por ejemplo, la PCR cuantitativa implica coamplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un patrón interno que puede usarse para calibrar la reacción de PCR. La matriz de alta densidad puede incluir después sondas específicas para el patrón interno para la cuantificación del polinucleótido amplificado. Se proporcionan protocolos detallados para la PCR cuantitativa en PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, Academic Press, Inc. N. Y., (1990). Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis, *et al.*, PCR Protocols. A guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego, (1990)), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase Wu y Wallace, Genomics, 4: 560 45 (1989), Landegren, *et al.*, Science, 241: 1077 (1988) y Barringer, *et al.*, Gene, 89: 117 (1990)), la amplificación por transcripción (Kwoh, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 (1989)) y la replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87: 1874 (1990)).

55 La invención proporciona una diana marcada o sonda marcada. Cualquier marcador analíticamente detectable que se una a o se incorpore en una molécula puede usarse en la invención. Un marcador analíticamente detectable se refiere a cualquier molécula, resto o átomo que se detecte y cuantifique analíticamente. Los marcadores detectables adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen biotina para la tinción con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads TM), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros usados comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.) coloreadas. Las patentes que muestran el uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241.

ES 2 354 452 T3

Los expertos en la materia conocen bien medios de detección de dichos marcadores. Por lo tanto, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la 5 acción de la enzima en el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan por visualización simplemente del marcador coloreado.

Los marcadores pueden incorporarse por cualquiera de varios medios bien conocidos para los expertos en la materia. Sin embargo, en una realización preferida, el marcador se incorpora simultáneamente durante la etapa de amplificación en la preparación de los mismos polinucleótidos. Por lo tanto, por ejemplo, la reacción en cadena de la 10 polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. En una realización preferida, la amplificación por transcripción, como se ha descrito anteriormente, usando un nucleótido marcado (por ejemplo, CTP y/o UTP marcado con fluoresceína) incorpora un marcador en los polinucleótidos transcritos. Como alternativa, puede añadirse un marcador directamente a la muestra de polinucleótidos original 15 (por ejemplo, ARNm, ARNm poliA, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de que se complete la amplificación. Los expertos en la materia conocen bien medios de unión de marcadores a polinucleótidos e incluyen, por ejemplo, desplazamiento de mella o marcaje terminal (por ejemplo, con un ARN marcado), por tratamiento con quinasa del polinucleótido y posterior unión (ligación) de un enlazador polinucleotídico que une el mismo polinucleótido a un marcador (por ejemplo, un fluoróforo).

20 En una realización preferida, la diana incluirá una o más moléculas de control que hibriden con sondas de control en la micromatriz para normalizar las señales generadas a partir de la micromatriz. Las dianas de normalización marcadas son secuencias polinucleotídicas que son perfectamente complementarias a oligonucleótidos de control que se aplican puntualmente sobre la micromatriz como se ha descrito anteriormente. Las señales obtenidas a partir de los 25 controles de normalización después de la hibridación proporcionan un control para variaciones en las condiciones de hibridación, intensidad del marcador, eficacia de "lectura" y otros factores que pueden causar que varíe la señal de una hibridación perfecta entre matrices.

30 *Condiciones de hibridación*

La hibridación de polinucleótidos implica proporcionar una sonda desnaturalizada o elemento de ácido nucleico diana y polinucleótido diana en condiciones en las que la sonda o elemento de ácido nucleico diana y su diana complementaria puedan formar dúplex híbridos estables a través de emparejamiento de bases complementarias. Los 35 polinucleótidos que no forman dúplex híbridos se eliminan después por lavado dejando los polinucleótidos hibridados que se van a detectar, típicamente a través de la detección de un marcador detectable unido. En general se reconoce que los polinucleótidos se desnaturalizan por aumento de la temperatura o disminución de la concentración de sal del tampón que contiene los polinucleótidos. En condiciones de baja rigurosidad (por ejemplo, baja temperatura y/o alta concentración de sal), se formarán dúplex híbridos (por ejemplo, ADN:ADN, ARN:ARN, ARN:ADN, ADNc:ARN y 40 ADNc:ADN) incluso cuando las secuencias hibridadas no sean perfectamente complementarias. Por lo tanto, la especificidad de la hibridación se reduce a menor rigurosidad. Por el contrario, a mayor rigurosidad (por ejemplo, mayor temperatura o menor concentración de sal) una hibridación con éxito requiere menos emparejamientos erróneos. Los 45 expertos en la materia conocen bien métodos de optimización de las condiciones de hibridación (véase, por ejemplo, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Polynucleotide Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N. Y., (1993)).

Después de la hibridación, el polinucleótido marcado o no marcado no hibridado se elimina de la superficie de soporte, convenientemente por lavado, generando de este modo un patrón de polinucleótido diana hibridado en la superficie del sustrato. Los expertos en la materia conocen una diversidad de soluciones de lavado, y pueden usarse. Los 50 patrones de hibridación resultantes de oligonucleótidos y/o polinucleótidos hibridados marcados pueden visualizarse o detectarse de una diversidad de formas, seleccionándose la forma particular de detección basándose en el marcador particular del polinucleótido de ensayo, donde los medios de detección representativos incluyen recuento de centelleo, autorradiografía, medición de la fluorescencia, medición calorimétrica, medición de la emisión de luz y similares.

55 *Captura de Imágenes y Análisis de Datos*

Después de la hibridación y de cualquier etapa o etapas de lavado y/o tratamientos posteriores, como se ha descrito anteriormente, se detecta el patrón de hibridación resultante. En la detección o visualización del patrón de hibridación, 60 la intensidad o valor de señal del marcador no sólo se detectará sino que se cuantificará, por lo que se entiende que la señal de cada punto de la hibridación se medirá y se comparará con un valor unitario correspondiente a la señal emitida por un número conocido de polinucleótidos diana marcados terminalmente, para obtener un recuento o valor absoluto del número de copias de cada diana marcada terminalmente que está hibridada con un punto particular en la matriz en el patrón de hibridación.

65 Se conocen bien en la técnica métodos para analizar los datos recogidos de la hibridación con matrices. Por ejemplo, cuando la detección de la hibridación implica un marcador fluorescente, el análisis de datos puede incluir las etapas de determinar la intensidad fluorescente en función de la posición del sustrato a partir de los datos recogi-

ES 2 354 452 T3

dos, eliminar los valores atípicos, es decir, los datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada, y calcular la afinidad de unión relativa de los polinucleótidos de ensayo a partir de los datos restantes. Los datos resultantes se presentan como una imagen, variando la intensidad en cada región de acuerdo con la afinidad de unión entre oligonucleótidos y/o polinucleótidos asociados y los polinucleótidos de ensayo.

5 Después de la detección o visualización, el patrón de hibridación se usa para determinar la información cuantitativa acerca del perfil genético de la muestra de polinucleótido diana marcado que se puso en contacto con la matriz para generar el patrón de hibridación, así como de la fuente fisiológica de la que se obtuvo la muestra de polinucleótido diana marcado. Por perfil genético se entiende la información respecto a los tipos de polinucleótidos presentes en la
10 muestra, por ejemplo, en términos de los tipos de genes con los que son complementarios, así como el número de copias de cada polinucleótido particular en la muestra.

Ensayos de Diagnóstico o Pronóstico

15 La invención proporciona ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades. La invención también proporciona ensayos de pronóstico para controlar la respuesta de un paciente a la terapia. De acuerdo con el método de la invención, la presencia de enfermedad o la respuesta del paciente a la terapia se detectan obteniendo una muestra de tejido o fluido de un paciente. Se prepara una muestra que comprende un ácido nucleico a partir de la muestra de tejido o fluido. El ácido nucleico extraído de la muestra se hibrida con una matriz que comprende un sustrato sólido y una pluralidad de elementos de ácido nucleico, en la que cada elemento es indicativo de la presencia de enfermedad o de una predisposición a una enfermedad o trastorno. De acuerdo con este ensayo de diagnóstico, la hibridación de la muestra que comprende un ácido nucleico con uno o más elementos de ácido nucleico en la matriz es indicativa de enfermedad, una predisposición a una enfermedad o trastorno o, en el caso de un ensayo de pronóstico, indicativa de 20 la respuesta de un paciente a la terapia.
25

Kits

30 Se proporcionan kits que contienen reactivos e instrucciones para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el kit puede comprender reactivos e instrucciones para detectar delecciones, mutaciones, heteroplasmias u homoplasmias mitocondriales en muestras específicas de tejido y fluidos asociados a tejidos. Los kits también pueden comprender uno o más cebadores que hibridan con el genoma mitocondrial para generar un producto de extensión de cebadores. Los kits también pueden incluir un soporte sólido tal como una microplaca desechable, medios 35 para sujetar el soporte sólido, medios para la extracción del ADNmt y medios para acceder a una base de datos de secuencias de ADNmt.

Por ejemplo, un kit para detectar una delección de ADNmt asociada con cáncer de próstata puede incluir los cebadores 3.4 directo e inverso, reactivos e instrucciones.

40 De forma similar, un kit para detectar una delección de ADNmt asociada con la exposición al sol o NMSC puede incluir el cebador L404, el cebador H4676, la sonda 3895, reactivos e instrucciones.

Otras utilidades para la presente invención, tales como las descritas anteriormente y en los ejemplos siguientes, 45 serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

La presente invención se describe más particularmente en los ejemplos siguientes, que pretenden ser solamente ilustrativos puesto que serán evidentes numerosas modificaciones y variaciones para los expertos en la materia.

50 Ejemplo 1

Tumores de Próstata

55 Después de la adquisición de fluido de próstata o de la cirugía para extirpar tumores de próstata, se preparan portaobjetos de biopsia para identificar células transformantes o cancerosas. Se usa microscopía de microdissección mediante captura con láser (LCM) para aislar células que sean normales, benignas o malignas a partir de la sección tisular. La obtención de células enfermas de interés, tales como células precancerosas o grupos invasores de células cancerosas es posible entre las células heterogéneas circundantes.

60 La extracción de ADN total de cada una de estas células se purificó de acuerdo con una modificación del protocolo resumido por Arcturus Engineering Inc. El ADN se extrajo de las células con un volumen de 50 µl de proteinasa K (PK) 1 mg/ml, en Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0 y Tween 20 a 0,1% a 42°C durante una noche. Despues de la incubación durante una noche a 42°C, los tubos se retiraron del horno de incubación. Las muestras se 65 microcentrifugaron durante 5 min a 6400 rpm (2000 x g). El CapSure™ se eliminó del tubo y se desechó. El tubo se incubó a 95°C durante 10 minutos (la PK se inactiva) y después se enfrió a temperatura ambiente. Se usaron 5-50 µl de la muestra para la amplificación por PCR.

ES 2 354 452 T3

Después de la purificación, se amplifican muestras individuales mediante LX-PCR usando los cebadores apropiados para la región hipervariable 1 (HV1), región hipervariable 2 (HV2) y la región 12S completa. Estos productos de PCR se secuencian después usando métodos de alto rendimiento como se conocen bien en la técnica.

Como alternativa, pueden amplificarse genomas mitocondriales de longitud completa usando los cebadores de la Tabla 5. Puede amplificarse la captura específica y la amplificación del ADN obtenido de células tumorales malignas de cualquier Grado de Gleason, células de una glándula benigna adyacente y células de una glándula benigna “distante”. Otros tejidos de próstata que podrían amplificarse y que se amplifican incluyen: neoplasia intraepitelial prostática (PIN) hiperplasia prostática benigna (BPH), hiperplasia de diversos tipos, estroma y células con cambios no determinados. Este trabajo se realizó en tejidos de próstata de 31 individuos en los que se programó una prostatectomía debido a un diagnóstico de cáncer de próstata. Se capturaron tres tipos de tejidos: maligno, benigno adyacente y benigno distante, de cada individuo. Se usó sangre de cada paciente como control positivo de tejido no enfermo. La amplificación y secuenciación de estas muestras dio como resultado las nuevas mutaciones observadas en la Tabla 4. Las mutaciones de la Tabla 4 también se proporcionan en la SEC ID Nº: 102, que enumera las sustituciones, las SEC ID Nº: 103 a 15 109, que enumeran las delecciones, y las SEC ID Nº: 110 a 138, que enumeran las inserciones. Se determinaron las posiciones de polimorfismos y mutaciones por comparación con la Secuencia de Referencia de Cambridge Revisada (2001), sin embargo, se ha mantenido la numeración histórica de modo que la delección en la posición 3106 se indica como hueco y el polimorfismo poco frecuente 750A se ha conservado. Un subconjunto de estos datos (7 regiones codificantes de proteína) se sometió después a análisis de componentes principales, como es convencional en la técnica, 20 con los resultados siguientes como se muestran en la Tabla 1a:

TABLA 1a

Sangre	benigno distante	benigno adyacente	maligno	desconocido
100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
16,13%	35,48%	9,68%	29,03%	16,13%
12,9%	12,90%	45,16%	3,22%	25,81 %
3,22%	0,00%	0,00%	96,78%	0,00%

Los resultados demuestran un claro patrón de transformación maligna. El tejido normal (sangre) y el tejido maligno presentan altas frecuencias de agrupación (1,00 y 0,967). Curiosamente, el benigno adyacente y distante, apareciendo ambos normales en un sentido histológico y patológico, muestra niveles de transformación estando más de 50% de las muestras fuera de los cortes de benigno distante y benigno adyacente. Además, los mismos datos se analizaron mediante una red neuronal, como es convencional en la técnica, con los resultados siguientes como se muestran en la Tabla 1b:

TABLA 1b

Sangre	Benigno distante	Benigno adyacente	Maligno
100,00%	0,00%	0,00%	0,00%
6,45%	0,00%	0,00%	93,55%
19,35%	0,00%	0,00%	77,14%
3,22%	0,00%	0,00%	96,78%

Esta tabla muestra que, en presencia de tumor, todo el tejido de próstata se considera maligno a nivel molecular, aun cuando el aspecto anatómico del tejido pueda ser “normal”.

ES 2 354 452 T3

TABLA 1c

Regiones de mutaciones - ND1, ND2, COX1 y CYTB

	benigno distante	benigno adyacente	maligno
5			
10	1.	105DB - 6037	105AB - 4655 4655, 4917, 7407
15			
20	2.	208DB	208AB - 4917, 5174, 5985, 6776
25			
30	3.	349DB	349AB
35			349ML - 6548
40	4.	377DB - 4735, 5984, 6912	377AB
45			377ML - 4917, 6686, 7028, 7407, 15452, 15607
50	5.	378DB	378AB - 6776, 15043
55			378ML - 4703
60	6.	380DB - 3469, 3507, 15218,	380AB - 4917, 4951, 5440, 6059

ES 2 354 452 T3

	benigno distante	benigno adyacente	maligno	
5	7.	382DB - 6307, 7028, 7407, 15452, 15527, 15607	382AB - 4716, 5312, 5371, 15162, 15323, 15324	382ML- 6147, 6691, 7178, 15523
10	8.	384DB - 4733, 7028	384AB - 6219, 15452, 15607	384ML - 4733, 7028
15	9.	386dub -15677	386AB - 15244, 15301, 15452, 15607, 15670	386ML
20	10.	416DB -4561, 15326, 15525	416AB	416ML- 4864
25	11.	417DB	417AB	417ML - 4917
30	12.	418DB	418AB- 7159	418ML- 7028, 7407
35	13.	426DB	426AB	426ML- 4892, 5102, 5213
40				
45				
50				
55				
60				

ES 2 354 452 T3

		benigno distante	benigno adyacente	maligno
5	14.	449DB - 4646 4917, 5999, 6047, 7407	449AB	449ML
10	15.	450DB - 15323	450AB - 4917, 5300, 15323	450ML - 3398, 5147, 6009, 15323
15	16.	451DB	451AB - 4217	451ML
20	17.	452DB - 4018 6557, 15286	452AB - 3308, 3480, 3594, 3666, 3693, 5036, 5046, 5393, 5984, 6548, 6827, 6989, 7055, 7146, 7256, 7389, 15115	452ML - 3480, 4591, 5268, 7159, 7407
25				
30				
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65	18.	455DB - 7160	455AB	455ML

ES 2 354 452 T3

		benigno distante	benigno adyacente	maligno
5	19.	456DB -3589, 4216, 5312, 5424, 6041, 7013, 7407,	456AB - 4216, 4787, 4917, 7407, 15343, 15452, 15607	456ML - 4787, 6579, 7059, 15302
10		15384, 15452		
15	20.	457DB	457AB	457ML
20	21.	458DB -5198, 7407	458AB	458ML
25	22.	460DB - 5147	460AB	460ML
30	23.	461DB - 7028, 7184	461AB - 3394, 7184, 14899	461ML- 7184
35	24.	463DB - 14903	463AB - 14903	463ML - 14903
40	25.	464DB	464AB	464ML - 6314, 6643, 6667, 7028, 7066, 7407, 15265
45				
50				
55				
60				

ES 2 354 452 T3

	benigno distante	benigno adyacente	maligno
5	26.	466DB - 3507, 7028	466AB - 3908, 3969, 3992, 4017, 4185, 4239, 7028
10	27.	467DB	467AB - 4917, 5147
15	28.	498DB - 14903, 14918, 15355	498AB - 14918
20	29.	501DB - 4580, 4826, 6224, 7007	501AB - 4580, 6776
25	30.	504DB - 3507	504AB
30	31.	505DB-15307, 15526	505ML - 4216, 4917, 5456, 6776, 6953, 7028, 7407, 15452
35			
40			
45			
50			

55 Análisis de grupos

Las mutaciones identificadas en los 31 individuos diagnosticados con cáncer de próstata se analizaron usando el Explorador de Grupos Jerárquicos (HCE) (www.cs.umd.edu/hcil/multi-cluster; Seo *et al.* 2002; Seo *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2003; Seo y Shneiderman; Seo *et al.* 2004a; Seo *et al.* 2004b; Seo *et al.* 2005a; Seo *et al.* 2004c; Seo *et al.* 2005b). Además, se analizaron también los genomas mitocondriales de tejido de biopsia con aguja de próstata de 12 hombres clínicamente sintomáticos para cáncer de próstata pero en los que los resultados de patología indicaron que el tejido de próstata no era maligno. Las Figuras 2 y 3 muestran el análisis de grupos de las mutaciones mitocondriales no sinónimas identificadas. La Figura 2 es la primera mitad del análisis de grupo y la Figura 3 es la segunda mitad del análisis de grupo. El eje y enumera los números de paciente para los 31 individuos con cáncer de próstata (105, 208, 349, 377, 378, 380, 382, 384, 386, 416, 417, 418, 426, 449, 450, 451, 452, 455, 456, 457, 458, 460, 461, 463, 464, 466, 467, 498, 501, 504, 505) y los 12 individuos que mostraban síntomas clínicos pero que no tenían tumor maligno según se determinó por patología (2, 35, 51, 209, 270, 278, 375, 480, 503, 536, 560, 858). El eje y también

ES 2 354 452 T3

indica la fuente del tejido (es decir, benigno distante (db), benigno adyacente (ab), maligno (ml) y (b) sanguíneo). El tejido glandular benigno de tejido sintomático pero no maligno de los 12 individuos se indica mediante “gl”. El eje x enumera los sitios de las mutaciones.

5 La Figura 4 es una copia de la Figura 3 que muestra una serie de mutaciones no sinónimas asociadas con cáncer de próstata clínico en el área sombreada. Las mutaciones aparecen en genes específicos: Las mutaciones en las posiciones 4216 y 4217 aparecen ambas en el gen de ND1 (subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa). La mutación en la posición 4917 aparece en el gen de ND2 (subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa). La mutación en la posición 7407 aparece en el gen de COX1 (subunidad 1 de la citocromo c oxidasa). Por último, la mutación en la posición 15452 aparece en el gen de CytB (citocromo b). Las mutaciones 4216 y 4217 recurren a una mutación no sinónima en el mismo aminoácido, y como la 4917, son mutaciones secundarias asociadas con la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) (Mitochondrial Research Society; Huoponen, 2001; MitoMap). Aparte del cáncer de próstata, continúa sin estar confirmada una asociación para la 7407. Se encontró una mutación en 15452 en 5/5 pacientes con deficiencia de la ubiquinol citocromo c reductasa (complejo III) (Valnot *et al.* 1999).

15 En la cohorte de 31 hombres que se sometieron a una prostatectomía para cáncer de próstata se señalaron estas mutaciones, una o más, en 20 de los sujetos (64,5%). Como se ha mencionado anteriormente, en cada uno de estos individuos, se obtuvieron secuencias de genoma mitocondrial total a partir de secciones transversales de próstata para tres tipos de tejidos asociados: maligno, tejido benigno adyacente a tejido maligno y tejido benigno “distante”, extirpados de cualquier patología tisular circulante. Los tejidos se microdisecaron mediante captura con láser (LCM) por un patólogo clínico cualificado. Se compararon las secuencias con el ADN mitocondrial (ADNm) extraído y secuenciado a partir de la sangre del paciente. Los resultados de la secuenciación indican que aparecen mutaciones mitocondriales, con frecuencia heteroplásmicas, en los tres tipos de tejidos. Al contrario que el análisis de Alonso *et al.* (2005), se encontraron mutaciones en el ADN mitocondrial de tejido maligno, benigno adyacente y benigno distante en comparación con las secuencias de ADNm de la sangre del paciente. Los genomas mitocondriales heteroplásmicos, mutantes y normales, existentes dentro del mismo individuo se consideran pruebas de mutaciones recientes (Huoponen, 2001). La mayoría de las mutaciones no las tienen en común los tres tipos de tejido del mismo individuo. De hecho, las cargas de mutación comparativas para cada tipo tisular son aproximadamente las mismas, indicando que las mutaciones de ADNm están activas dentro de la próstata en presencia de tumor, independientemente del tipo de tejido de próstata. Además, el tejido que parece ser histológicamente benigno se encuentra con frecuencia con mutaciones en el genoma mitocondrial. Estas mutaciones no están asociadas con secuencias mitocondriales embebidas en el núcleo, o NUMTS (secuencias nucleares/mitocondriales) (Lopez, 1994). Se realizó un estudio de clonación y secuenciación de larga duración de NUMTS humanas utilizando una línea celular Rho⁰, así como una comparación con NUMTS conocidas archivadas en la base de datos del NCBI, y no se detectaron mutaciones en pseudogenes mitocondriales conocidos archivados en bases de datos públicas para asegurar datos libres de puntos de datos de pseudogenes.

40 En los 12 hombres clínicamente sintomáticos para cáncer de próstata, en los que los resultados de la patología indicaron que el tejido de próstata no era maligno, se recuperó tejido glandular benigno mediante LCM y los genomas mitocondriales se amplificaron y secuenciaron a partir de tejidos de biopsia con aguja de próstata. Los resultados indican una ausencia completa de mutaciones de ADNm en cuatro pacientes, mutaciones sólo en la región de control no codificante en cuatro pacientes o mutaciones tanto en la región de control como en las regiones codificantes de genes en cuatro pacientes. Sin embargo, las localizaciones de las mutaciones eran significativamente diferentes de las de la cohorte maligna ($P>0,01$). Además, sólo se observó una mutación de la región codificante en estos individuos y, de estas mutaciones, una estaba en las regiones mencionadas anteriormente (es decir, ND1, ND2, COX1 y CytB) (paciente 375 CytB en posición 15081).

50 Cuando las mutaciones tanto sinónimas como no sinónimas, incluyendo las cuatro regiones codificantes de proteína, se usaron como marcadores de enfermedad maligna, se identificaron 30/31 (97%) del grupo de cáncer de próstata. La Tabla 1c enumera las mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en ND1, ND2, COX1 y CytB en muestras de tejido de los 31 individuos con cáncer de próstata. Las mutaciones en ND1, ND2, COX1 y CytB estaban claramente asociadas con cáncer de próstata. Aunque la presente invención ha identificado las mutaciones enumeradas en la Tabla 1c y las Figuras 2 a 4, la invención incluye cualquier mutación en ND1, ND2, COX1 y CytB. En los mismos análisis, 1 de los 12 pacientes sintomáticos benignos se incluyó en el grupo maligno; sin embargo, este paciente tenía una mutación en CytB, que puede indicar una progresión a cáncer temprana. El resto de este grupo se agrupó con la sangre o control normal.

60 Se realizó un análisis estadístico de tejido benigno distante de sujetos con tumor maligno en comparación con las glándulas benignas de los 12 pacientes sintomáticos pero sin tumor maligno. Puesto que había 31 pacientes con tumor maligno y 12 pacientes sintomáticos pero sin tumor maligno, se procesaron muestras aleatorias de 6 grupos de 12 de los pacientes con tumor maligno frente a los 12 sujetos sintomáticos pero sin tumor maligno. Se procesó un análisis de χ^2 para cada uno de los 6 grupos. Los resultados se enumeran en la Tabla 1d. En cada caso, las diferencias eran significativas a nivel de 0,01, lo que significa que la diferencia entre secuencias mitocondriales de tejido benigno distante en sujetos con tumor maligno y secuencias mitocondriales de sujetos sintomáticos pero sin tumor maligno no se debían al azar 99% del tiempo. El análisis se basaba en el número de mutaciones encontradas en las cuatro regiones codificantes analizadas anteriormente.

ES 2 354 452 T3

TABLA 1d

Prueba de χ^2

5	1) Primer conjunto de DB -	426, 456, 450, 449, 380, 501, 386, 456, 466, 378, 457, 504
	2) Segundo conjunto de DB -	377, 105, 451, 417, 501, 456, 426, 498, 382, 461, 384, 464
	3) Tercer conjunto de DB -	467, 208, 466, 505, 452, 458, 105, 498, 380, 463, 208, 377
10	4) Cuarto conjunto de DB -	416, 504, 457, 466, 382, 452, 460, 450, 498, 386, 418, 501
	5) Quinto conjunto de DB -	456, 452, 461, 505, 464, 460, 378, 455, 417, 505, 449, 349
	6) Sexto conjunto de DB -	463, 426, 498, 349, 455, 466, 452, 380, 386, 461, 450, 460
15	Tejidos	ND 1 ND2 COI CYTB χ^2
	Sintomáticos	0 0 0 1
20	Primer conjunto	10 8 12 7 35,14
	Segundo conjunto	3 6 14 9 30,11
	Tercer conjunto	4 2 7 8 19,12
25	Cuarto conjunto	3 4 7 11 23,09
	Quinto conjunto	4 5 10 8 25,12
	Sexto conjunto	4 1 5 9 17,11

Pacientes Sintomáticos - 12; Benigno distante - 6 conjuntos aleatorios de 12 cada uno.

Ejemplo 2

35 Duplicaciones en la región no codificante de ADNmt de piel expuesta al sol

Se extrajo ADN de muestras de tejido como se ha descrito en el Ejemplo 1, con el uso del kit DNeasy™ suministrado por Qiagen. Se usó una metodología de cebadores “espalda con espalda” para investigar la incidencia de duplicaciones en tandem en la región no codificante (NCR) en relación con la exposición al sol. Se investigaron 32 muestras de piel humana dividida de la misma edad, de sitios corporales expuestos al sol ($n=24$) y protegidos del sol ($n=10$).

Se usaron los cebadores de duplicación siguientes de Brockington *et al* 1993 y Lee *et al* 1994:

45	C L336	AAC ACA TCT CTG CCA AAC CC	20 unidades SEC ID N°: 1
	D H335	TAA GTG CTG TGG CCA GAA GC	20 unidades SEC ID N°: 2
50	E L467	CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC	20 unidades SEC ID N°: 3
	F H466	AGT GGG AGG GGA AAA TAA TG	20 unidades SEC ID N°: 4

55 Las parejas de cebadores C/D y E/F están “espalda con espalda” en el sitio de dos conjuntos separados de repeticiones directas en la región no codificante. Como resultado, sólo generan un producto si está presente una duplicación en estos puntos. Los productos generados son de 260 pb y/o la variante menos común de 200 pb. Las condiciones de PCR modificadas son: 100 ng de ADN celular total, dNTP 200 μ M, 2,5 U de Taq polimerasa HotStar y tampón de PCR (Qiagen, Reino Unido), 25 pmoles de cebadores: un ciclo de 94°C durante 4 minutos, 36 ciclos de 94°C x 1 minuto, 55°C x 1 minutos, 72°C x 1 minuto y un ciclo de 72°C x 7 minutos.

60 Se observó una incidencia de duplicaciones aumentada con una exposición al sol creciente, identificándose duplicaciones en 10/24 pero 0/10 muestras de piel expuesta al sol y protegida del sol, respectivamente (prueba exacta de Fisher, $p=0,015$) (Birch-Machin y Krishnan 2001). Los tamaños de las duplicaciones más frecuentes eran de 200 y 260 pares de bases. Curiosamente, estas mismas muestras también contenían altos niveles ($>1\%$) de la delección de ADNmt común de 4977 pb, según se determinó mediante un ensayo de PCR cuantitativa de 3 cebadores establecido descrito en el Ejemplo 6.

ES 2 354 452 T3

Ejemplo 3

Huella genética de mutaciones de ADNmt en NMSC humano y sus lesiones precursoras

- 5 Se extrajo ADN de muestras de tejido cutáneo humano como se ha descrito en el Ejemplo 1, con el uso del DNeasyTM, mediante el uso de cebadores específicos de Qiagen, se amplificó el ADNmt mediante PCR y después de la preparación de muestras de ADN (Qiagen), se identificaron las mutaciones mediante secuenciación automática (PE Applied Biosystems) usando secuenciación cíclica con terminadores BigDyeTM. Esta metodología se describe en Healy *et al.* 2000; Harding *et al.* 2000. El genoma mitocondrial humano completo de 16.569 pb se secuencia usando 10 pares de cebadores de PCR establecidos que se sabe que no amplifican pseudogenes u otros loci nucleares. Cualquier supuesto cambio de ADN se confirma por comparación con la referencia de ADNmt humano de "Cambridge" revisada (Andrews *et al.* 1999). Las secuencias obtenidas a partir del ADNmt tumoral se comparan primero para polimorfismos conocidos (Andrews *et al.* 1999; MITOMAP) y después se comparan con la secuencia de ADNmt de la piel perilesional normal para identificar mutaciones somáticas genuinas.
- 15 15 Se realiza una DHPLC en el Sistema de Análisis de Fragmentos de ADN WAVETM (Transgenomic, Omaha, Estados Unidos) que proporciona un procedimiento de exploración totalmente automático. Se usa la misma tecnología para explorar para mutaciones heteroplásicas en el ADNmt de tumor de piel.
- 20 20 Usando la metodología de cebadores espalda con espalda descrita en el Ejemplo 2, se explora rápidamente el patrón de mutaciones largas de ADN (es decir, duplicaciones en tandem) en los segmentos hipervariables de la región no codificante (NCR).

Ejemplo 4

Espectro de delección del genoma mitocondrial completo en NMSC humano y sus lesiones precursoras

- 30 El daño en el ADNmt en carcinomas de células escamosas (SCC), carcinomas de células basales (BCC) y supuestas lesiones precursoras tales como enfermedad de Bowen y queratosis actínicas (As) se comparó con piel perilesional adyacente tomada de diferentes sitios corporales expuestos al sol. Se usó una técnica de PCR de extensión prolongada (LX-PCR) (Ray *et al.* 1998) para amplificar el genoma mitocondrial completo para determinar el espectro de delección completa del ADNmt. Se ha observado que se producen una miríada de delecciones específicas en el genoma mitocondrial. No todas las delecciones se correlacionarán con cáncer de piel de tipo no melanoma; sin embargo, 35 para un método de diagnóstico exacto, deben conocerse aquellas delecciones que estén asociadas con la enfermedad.

40 Se extrajo ADN mediante el uso de un kit comercial (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El genoma mitocondrial completo se amplifica en dos reacciones separadas usando el Expand TM Long Template PCR SystemTM (Boehringer Manheim, Suiza). Los cebadores de PCR usados son los descritos por Kleinle *et al.* (1997), que abarcan las regiones siguientes de la secuencia de Cambridge (Andrews *et al.* 1999): DIA (nucleótidos (nt) 336-363), DIB (nt 282-255), OLA (nt 5756-5781) y OLB (nt 5745-5781). Estos productos de gran tamaño eliminan la amplificación de pseudogenes nucleares. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

- 45 DIAF: (336-363) 5' AACACATCTGCCAAACCCCAAAAACA 3' SEC ID Nº: 5
OLBR: (5745-5721) 5' CCGCGGGCGGGAGAAGTAGATTGAA 3' SEC ID Nº: 6
50 OLAF: (5756-5781) 5' GGGAGAACCCCCGGCAGGTTGAAGC 3' SEC ID Nº: 7
DIBR: (282-255) 5' ATGATGTCTGTGGAAAGTGGCTGTGC 3' SEC ID Nº: 8.

55 Se realizaron amplificaciones en reacciones de 50 microlitros que contenían 16 pmol de cada cebador, dNTP 500 μmol, tampón de PCR 10x con MgCl₂ 22,5 mM y detergentes (kit), 0,75 μl de enzima (3,5 x 10³ unidades/ml) y 50-200ng de ADN total. Una reacción genera segmentos de 11.095 pb del genoma, mientras que otra da como resultado longitudes de 5.409 pb (por ejemplo, Kleinle *et al.* 1997). Las condiciones de amplificación por PCR consisten en una fase desnaturalizante a 93°C durante 1 min 30 s, seguida de 10 ciclos de 93°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 12 min, seguidos de 20 ciclos adicionales del mismo perfil con 5 s adicionales añadidos al tiempo de elongación cada ciclo. Existe un ciclo final de 93°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y un tiempo de elongación de 68°C durante 26 minutos. Para asegurar su reproducibilidad, se separa una cantidad de ADN conocida en un gel de agarosa a 1% y sólo las muestras que tienen al menos la misma cantidad de ADN se incluyen en el análisis.

65 65 Se encuentra un mayor número medio de delecciones con una exposición creciente a UV en las muestras de tumor, como se muestra en la Tabla 2.

ES 2 354 452 T3

TABLA 2

Comparación del número medio de delecciones observadas en la LX-PCR de ADNmt entre piel tumoral y normal tomada de diferentes sitios corporales expuestos a UV

Exposición a UV	Número medio de delecciones en epidermis normal adyacente	Número medio de delecciones en tumor epidérmico
Constante (n=5)	1,0	3,6
Intermitente(n=2)	0	1,5
Protegida del sol (n=2)	0	0

Ejemplo 5

Envejecimiento y ADNmt

Usando comparaciones de líneas maternales temporales (es decir, de bisnietos a bisabuelos), la secuencia completa del ADNmt extraído de un tejido dado se secuencia rápidamente y con precisión para indicar definitivamente la disposición de los pares de bases de nucleótidos para esa molécula específica y posibles cambios con el tiempo. Estas caracterizaciones se comparan con el estado de salud, los indicadores de envejecimiento y entre líneas maternales específicas dentro de poblaciones de mayor tamaño. Esta información combinada permite una discriminación estadística decisiva entre causas separadas que dan como resultado la misma mutación/delección y establece que las secuencias de ADNmt, usadas como biomarcador, tienen el índice necesario de especificidad y sensibilidad para establecer su validez. Además, las proporciones de delecciones y mutaciones de pares de bases se comparan para determinar su uniformidad en diversos tejidos a través de las 4 generaciones maternales. Los desarrollos metodológicos recientes han permitido la detección de delecciones de pares de bases implicadas en el envejecimiento en muestras de sangre (Bassam *et al.* 1991) y han planteado la posibilidad de que puedan usarse muestras de sangre para estudiar el ADNmt en lugar de músculo esquelético (von Wurmb *et al.* 1998). Después de establecer la eficacia de emplear leucocitos en lugar de tejido muscular, como representativos de delecciones y/o mutaciones de ADNmt, la siguiente etapa mide sólo el ADNmt en leucocitos. Después se determinan las delecciones/mutaciones del ADNmt como se ha descrito anteriormente.

Se obtiene músculo esquelético o leucocitos de un paciente. Se extrae el ADN como se ha expuesto en el Ejemplo 1. Se usarán los cebadores siguientes:

45 12ST1: (1257-1279) 5' TATACCGCCATCTTCAGCAAAC3' SEC ID Nº: 9

12ST2: (1433-1411) 5' TACTGCTAAATCCACCTTCGAC 3' SEC ID Nº: 10

D1F: 5' CCTTACACTATTCCCTCATCACC 3' SEC ID Nº: 11

50 D1R: 5' TGTGGTCTTGAGTAGAAACC 3' SEC ID Nº: 12.

Se realizaron amplificaciones en reacciones de 50 microlitros que contenían 2,0 μ mol de cada cebador, dNTP 250 μ mol, tampón de PCR 10x (Tampón de Reacción Thermopol), albúmina de suero bovino, 0,5 unidades de polimerasa Deep Vent y 50-200 ng de ADN total. Las condiciones de amplificación por PCR consisten en una fase desnaturalizante a 95°C durante 5 min (inicio en caliente), seguida de 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 60 s y 72°C durante 30 s con una extensión final a 72°C durante 10 min. Se realizó una electroforesis en gel en un gel de agarosa a 2% a 125 voltios durante 60 min, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz UV. Para asegurar la reproducibilidad, se separó una cantidad de ADN conocida en un gel de agarosa a 2% y sólo las muestras que tenían la misma cantidad de ADN se incluyeron en el análisis.

Ejemplo 6

Detección cuantitativa de la delección de ADNmt común de 4977 pb mediante PCR de 3 cebadores

Cuando es apropiado, la incidencia de la delección común se determina de una forma cuantitativa mediante un método de PCR de 3 cebadores que detecta niveles superiores a 1-5% o un método de PCR por dilución que detecta niveles de menos de 1% hasta 10⁻⁴%. (Véase el Ejemplo 7). Se obtuvieron muestras y se extrajo el ADN como se ha

ES 2 354 452 T3

descrito en el Ejemplo 1. Para detectar y cuantificar simultáneamente las proporciones de ADNmt tanto delecionado como de tipo silvestre (wt) en las muestras de ADN, se usa un procedimiento de PCR de 3 cebadores (como se describe en Birch-Machin *et al* 1998). Los cebadores A y C corresponden a las posiciones de la cadena pesada 13720-13705 y 9028-9008, respectivamente (Anderson *et al.*, 1981); el cebador B corresponde a las posiciones de la cadena ligera 8273-8289. El cebador C mapea en una región del ADNmt dentro de la delección común, mientras que los cebadores A y B flanquean la región delecionada. Por lo tanto, los cebadores B y C sólo amplifican ADNmt wt y los cebadores A y B sólo amplifican ADNmt delecionados (la distancia entre los dos cebadores en ausencia de la delección, de aproximadamente 5,5 kb, es demasiado grande para amplificarse en estas condiciones de PCR, como se describe a continuación).

El uso de tres cebadores permitió la detección simultánea de dos bandas, la más grande (755 pb) correspondiente al ADNmt wt, y la más pequeña (470 pb) correspondiente al ADNmt delecionado que alberga la “delección común”. La mezcla de reacción de PCR (25 μ l de volumen total) contenían 100 ng de ADN celular total, dNTP 200 μ M, Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1%, ADN polimerasa *Taq* 2,5 U (BioTaq, BiolineUK Limited, Londres), 25 pmoles de los cebadores A y B, 6,25 pmoles del cebador C y 3 μ Ci de [α -³²P]-dATP. Las condiciones de PCR eran de 25 ciclos de 94°C en 1 minuto, 55°C en 1 minuto, 72°C en 2 minutos, incluyendo una extensión final de 15 minutos a 72°C. Estos productos de PCR se sometieron después a electroforesis mediante un gel de poliacrilamida no desnaturalizante a 6% y los fragmentos de PCR radiactivos se cuantificaron mediante análisis de imágenes de Phosphorimager usando el programa informático ImageQuant™ (Molecular Dynamics, Chesham, Reino Unido).

Ejemplo 7

Método de PCR de dilución seriada para detectar cuantitativamente bajos niveles (<1%) de la delección de ADNmt común

Se usa un método de PCR semicuantitativa (Corral-Debrinski *et al* 1991) para estimar la proporción de la delección común en el ADNmt total extraído de las muestras tisulares/celulares. Se obtienen muestras biológicas y se extrae el ADN como se ha descrito en el Ejemplo 1. La muestra de ADN se linealiza inicialmente usando la enzima de restricción *Bam* HI (1 μ l de enzima y 1 μ l de tampón suministrado comercialmente) a 37°C durante 90 minutos. Se realizan diluciones en serie en etapas de dos veces (para el ADNmt total había una dilución inicial de 10 veces) y se realiza una PCR para cada dilución (1 μ l) usando los cebadores siguientes:

Cebadores para el ADNmt total

L3108 (nt3108-3127)
H3717 (nt3717-3701).

Cebadores para la Delección Común

L8282 (nt8282-8305)
H13851 (nt13851-13832).

Las condiciones de reacción eran las siguientes:

Un ciclo de 94°C durante 2 minutos, 34 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 51°C durante 30 segundos (ADNmt total), 56°C durante 30 segundos (delección común), 72°C durante 1 minuto y un ciclo final de 72°C durante 8 minutos. Todas las reacciones de PCR se llevan a cabo en la mezcla siguiente (50 μ l): ADN de muestra 1 μ l, cebador directo 0,6 μ M, cebador inverso 0,6 μ M, dNTP 0,2 mM, 5 μ l de Tampón de PCR 10x GeneAmp® (Perkin Elmer), 0,2 μ l de ADN polimerasa AmpliTaq® (Perkin Elmer), 35,75 μ l de agua doblemente destilada autoclavada estéril.

Después de la electroforesis, los productos de PCR se visualizan en un transiluminador de UV (TMW-20, Flowgen Ltd., Lichfield, Reino Unido) y se obtiene una imagen digital del gel usando un aparato de captura de imágenes (Alpha Imager 2000, Alpha Innotech Corporation, suministrado por Flowgen Ltd., Lichfield, Reino Unido). El programa informático de análisis de imágenes asociado (Alpha Ease v3.3, Alpha Innotech Corp.) permite el cálculo de la densidad óptica integrada (DOI) para cada producto de PCR en una serie de diluciones. La banda en la que se obtiene un valor de DOI de cero para tanto el ADNmt total como el ADNmt delecionado y los valores de dilución correspondientes se usan para calcular el porcentaje de delección común en la muestra, de modo que:

$$\text{Porcentaje de delección común} = \frac{\text{factor de dilución del ADNmt total}^{(\text{DOI Cero})} \times 100}{\text{factor de dilución de la delección común}^{(\text{DOI Cero})}}$$

ES 2 354 452 T3

Ejemplo 8

Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (DHPLC)

5 Se obtienen muestras y se extrae el ADN como en el Ejemplo 1. La PCR en 13 fragmentos solapantes usando dos condiciones de PCR diferentes como se describe por van den Bosch *et al.* (2000). Los siguientes tres pares de cebadores específicos de ADNmt para PCR: Secuencia de Oligonucléotido

10	Mt3118F	CCCTGTACGAAAGGACAAGAG SEC ID Nº: 13
	Mt3334R	TGAGGAGTAGGAGGTTGG SEC ID Nº:14
	Mt8207F	CCCATCGTCCTAGAATTATTCC SEC ID Nº: 15
15	Mt8400R	ATGGTGGGCCATACGGTAG SEC ID Nº: 16
	Mt14427F	CCCATGCCTCAGGATACTCCTC SEC ID Nº: 17
20	Mt14997R	GCGTGAAGGTAGCGGATG SEC ID Nº: 18.

25 Los productos de PCR de 1-2 kb se digieren en fragmentos de 90-600 pb y se resuelven a su temperatura de fusión óptima. Las mutaciones están representadas como dos picos y las mutaciones con bajos porcentajes, tales como una heteroplasmia <2%, como un “saliente” en el pico.

25 La DHPLC se realiza con una fase móvil que consiste en dos eluyentes (pH 7,0). El tampón A contiene acetato de trietilamonio (TEAA), que interacciona tanto con los grupos fosfato cargados negativamente en el ADN como con la superficie de la columna. El tampón B contiene TEAA con 25% del agente desnaturizante acetonitrilo. Los fragmentos se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo lineal a un caudal constante. El aumento de la concentración 30 de acetonitrilo desnaturizará los fragmentos. La Tabla 3 a continuación es un ejemplo de un método convencional para DHPLC de una reacción de PCR generada usando el programa informático WAVEMAKER (Transgenomics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35

TABLA 3

Método Convencional para DHPLC

40	Etapa	Tiempo	%A (tampón)	%B (tampón)	ML/min (caudal)
	Carga	0,0	52	48	0,90
45	Gradiente de Inicio	0,1	47	53	
	Gradiente de Terminación	4,1	39	61	
	Limpieza de Inicio	4,2	0	100	
50	Limpieza de Determinación	4,7	0	100	
	Equilibrado de Inicio	4,8	52	48	
55	Equilibrado de Terminación	6,8	52	48	

Las temperaturas para una resolución con éxito de los diversos heterodúplex se detallan a continuación y pueden sustituirse simplemente en los lugares pertinentes en la Tabla 2:

60

	Fragmento	Temp. de fusión (°C)	Gradiente de %Tampón B
	Mt3118F	59	51-59
65	Mt8207F	58	50-58
	Mt14427F	56	60-68

ES 2 354 452 T3

Ejemplo 9

- Un estudio exhaustivo de secuencias de bucle D de ADNmt de 49 pacientes con biopsia con aguja de próstata (46 diagnosticados con tumor maligno) demostró mutaciones de ADNmt en todos los tejidos prostáticos incluyendo hiperplasia prostática benigna (BPH), estroma y grados de Gleason disponibles en comparación con el ADN mitocondrial de la sangre de los pacientes. Además, un estudio ampliado de los genomas mitocondriales de 31 pacientes con prostatectomía demuestra cargas de hipermutación equivocables (Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003) en glándulas malignas, glándulas benignas adyacentes (cerca de las glándulas malignas) y glándulas benignas distantes (localizadas en tejido libre de patología maligna extirpado de cualquier patología maligna) emparejadas, como se demuestra en la Tabla 4.
- Las mutaciones de la Tabla 4 también se proporcionan en la SEC ID N°: 102, que enumera las sustituciones, en las SEC ID N°: 103 a 109, que enumeran las delecciones, y en las SEC ID N°: 110 a 138, que enumeran las inserciones. Las posiciones de polimorfismos y mutaciones se determinaron por comparación con la Secuencia de Referencia de Cambridge Revisada (2001), sin embargo, la numeración histórica se ha mantenido de modo que la delección en la posición 3106 se indica como un hueco y el polimorfismo poco frecuente 750A se ha conservado. La numeración de las bases se basa en la Secuencia de Referencia de Cambridge Revisada, que tiene un total de 16569 posiciones de bases. Se muestra en la Figura 1 un histograma que muestra el número de mutaciones por localización del genoma mitocondrial. Como puede observarse en la Figura 1, se encontraron las mutaciones por todo el genoma de ADNmt y en todas las próstatas enfermas. Sin embargo, también eran evidentes ciertos “puntos calientes”, por ejemplo en la región del bucle D y la región 16s. Estos conjuntos de datos implican que la designación de tejido maligno o benigno, según se realizó por un patólogo cualificado usando métodos histológicos y patrones de clasificación de rutina, no identifica la progresión a enfermedad temprana. Esto sugiere claramente que la transformación maligna comienza a nivel celular antes de que se alteren las características morfológicas de una célula. De forma importante, los patrones de mutación son completamente contradictorios para tejido de próstata emparejado de un paciente individual, o en comparación con otro paciente, indicando quizás posibles sitios titulares en los que pueda suceder la expansión clonal de células malignas. Además, biopsias con aguja separadas con la misma puntuación de Gleason del mismo individuo casi siempre demuestran patrones de mutaciones de ADNmt alternativos. Esto indica que la carga de mutación total más que los sitios de mutación específicos puede ser más representativa de la enfermedad y de la progresión de la enfermedad.
- Puesto que estos datos se reunieron a partir de individuos con cáncer de próstata conocido y en el grupo con prostatectomía con clasificación de estadío avanzado conocido, es probable que el tejido histológicamente benigno haya experimentado alguna transformación o transformaciones intracelulares asociadas con neoplasia y una posible progresión hacia malignidad. El tejido benigno que alberga mutaciones de ADNmt sirve como “biodetector” que puede controlarse para un aumento de mutaciones indicativo de la velocidad de progresión de la enfermedad. Esta velocidad también puede indicar la agresión tumoral. Además, la eficacia de una terapia específica también podría controlarse basándose en el cambio en este patrón de mutaciones.

Esta técnica puede usarse como ensayo de confirmación para biopsias con aguja benignas. Actualmente, cuando a un paciente se le realiza una biopsia con aguja en la próstata y el tejido parece histológicamente benigno se le envía a casa y habitualmente se programan biopsias con aguja de seguimiento en seis meses. El uso del método anterior examinaría el tejido de biopsia con aguja ya tomado y confirmaría que el tejido es benigno también a nivel molecular o encontraría pruebas de que es de hecho un tumor maligno en la próstata que se ha pasado por alto geográficamente mediante la técnica de biopsia con aguja, o que el tejido es preneoplásico o neoplásico a nivel molecular. Potencialmente, esto podría salvar a muchas personas de someterse a múltiples cirugías o permitir un tratamiento preventivo temprano.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 354 452 T3

Tabla 4
Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas

PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Homo-Homo	Hetero-Homo
10	10	T-C	T-T/C		200	200	A-G	A-A/G			
31	31		C-C/T		204	204	T-C	T-T/C			
											C-C/T
41	41	C-T	C-C/T		205	205		A-A/G			
55	55	C-T			207	207		A-A/G			
57	57	A-T					G-A	G-G/A			
61	61		C-C/T		208	208		T-T/C			
64	64	C-T			214	214		A-A/G			
72	72	C-T	C-C/T		217	217	C-T				
73	73	A-G	T-T/C		222	222	C-T				
81,1	81,1	INS T	A-A/G		225	225	A-G	A-A/G			
93	93		G-G/A		226	226	C-T	C-C/T			
94	94		A-A/G								G-G/A
104	104		C-C/T		229	229	G-T				
113	113		C-C/T		234	234		A-A/G			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
119	119	C-C/T			235	A-G
128	128	C-T				G-G/A
146	146	C-T	C-C/T		239	T-C
		T-C	T-T/C		247	G-G/A
150	150	C-T	C-C/T		248	DEL A
		T-C	T-T/C		262	C-C/T
152	152	C-T	C-C/T		263	G-G/T
		TGC	T-T/C			
153	153	A-G	A-A/G		264	A-G
		G-A	G-G/A		277	A-A/G
170	170		C-C/T		280	T-C
182	182	C-T	CC/T		295	277
185	185	G-A	G-G/A		297	C-C/T
			A-A/G		280	C-C/T
			G-G/T		295	T-T/C
188	188	A-G			303,1	G-A
		G-A	G-G/A		303,2	G-G/A
					305	INS C
					309	INS C
						C-C/T
						T-T/C

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
189	189	A-G	A-A/G			C-C/T
		G-A	G-G/A		309	DEL C
192	192	T-C			309,1	INS C
194	194	T-C	T-T/C		309,2	INS C
		C-T			309,3	INS C
195	195	C-T	C-C/T		310	DEL C
			T-T/C			T-T/C
196	196	T-C			311	DEL T
						C-C/T
198	198		C-C/T		311,1	INS C
199	199		T-T/C		312	C-C/T
					313	C-C/T
200	200	G-A	G-G/A			
315,1	315,1	INS C			1719	A-A/G
315,2	315,2	INS C			1761	A/T-A
323	323		G-G/A		1766	C/T-T
325	325	C-T	C-C/T		1811	G-A
329	329	G-T			1842	G-G/A
						A/G-A

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas													
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Homo-Homo	Homo-Hetero	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo
394	394		C-C/T		1883	1883							A/G-G
416,1	416,1	INS G/A			1888	1888	G-A		G-G/A				A/G-G
419	419		A-A/G										A/G-A
456	456	C-T			2005	2005							C/C-C
		T-T/C			2056	2056							A/G-G
462	462	T-C			2068,1	2068,1	INSA						
465	465		T-T/C		2075	2075							T/G-T
468	468		C-C/T		2257	2257							C/T-C
477	477	C-T			2258	2258							A/G-A
481	481	C-T	C-C/T		2259	2259	T-C						
482	482	C-T			2261	2261							C-C/T
489	489	C-T	C-C/T		2280	2280							C/T-C
497	497	T-C	T-T/C		2351	2351							C/T-T
499	499	A-G			2352	2352							C/T-T
501	501		C-C/T		2357	2357							C/T-C
505	505		C-C/T		2359	2359							C/T-C
506	506			C/T-C	2389	2389							C/T-C

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
508	508	G-A			2596	2596
513	513	A-G			2627	2627
513	513	DEL A			2657	2657
514,1	514,1	INS C			2683	2683
515	515		A-A/G		2689	2689
515	515	DEL A			2706	2706
515,1	515,1	INS A			2761	2761
517	517		T-T/A		2857	2857
523	523		A-A/G		2885	2885
523	523	DEL A			2927	2927
523,1	523,1	INS C			2948	2948
523,2	523,2	INS A			2952	2952
523,3	523,3	INS C			3010	3010
523,4	523,4	INS A				
533	533	A-G	A-A\G		3013	3013
536	536		C-C/T		3036	3036
567,1	567,1	INS C			3040	3040

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas											
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo
568,1	568,1	INS C			3046	3046					C/T-C
568,2	568,2	INS C									
709	709		A-A/G		3308	3307			T-T/C		
			G-G/A		3338	3337			C/T-T		
785	785		C-C/G		3349	3348			A/G-A		
857	857	G-C			3394	3393	C-T				
909	909		G-G/A		3398	3397	T-C				
1189	1189		C-C/T		3469,1	3468,1	INST				
1247	1247		G-G/A		3480	3479	G-A				
1431	1431		G-G/A		3499	3498			A/G-A		
1693	1693	C-T			3507	3506	C-A				
1709	1709		A/G-G		3589	3588			C-C/T		
1719	1719		A/G-G		3594	3593			C-C/T		
3657	3656	C-T			5663	5662			C-C/T		
3666	3665	G-A			5677	5676	C-T				
3688	3687		G-G/A		5882	5881			C-C/T		
3693	3692		G-G/A		5897	5896			C-C/T		

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
3744,1	3743,1	INST T			5984	5983
3908	3907	C-T			5985	5984
3966	3965		C-C/T		5999	5998
3969	3968	C-T			6009	6008
3992	3991	C-T			6028	6027
4017	4016	C-T			6037	6036
4185	4184	C-T			6041	6040
4216	4215	T-C	T-T/C		6047	6046
4217	4216		A-A/G		6059	6058
4239	4238	C-T			6147	6146
4418	4417		C-C/T		6219	6218
4561	4560	C-T			6221	6220
4569	4568		G-G/A		6224	6223
4580	4579		A-A/G		6307	6306
4591	4590		T-T/C		6314	6313
4646	4645	C-T			6382	6381
4655	4654		A-A/G		6548	6547

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homopolásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB	Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB
PB	Numeración Histórica**				Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
4703	4702		C-C/T		6553	6552
4716	4715		C-C/T		6557	6556
4722	4721		A-A/G		6579	6578
4733	4732		C-C/T		6643	6642
4735	4734		C-C/T		6667	6666
4787	4786	G-A	G-G/A		6686	6685
4826	4825		C-C/T		6691	6690
4864	4863		C-C/T		6776	6775
4892	4891		C-C/T			T-C
4917	4916	A-G	A-A/G		6827	6826
			G-G/A		6912	6911
4951	4950		C-C/T		6917,1	INS T
5036	5035		A-A/G		6953	6952
5046	5045		G-G/A		6989	6989
5102	5101		A-A/G		7007	7006
5147	5146	G-A	G-G/A		7013	7012
			A-A/G		7028	7027

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas o de heteroplásicas a heteroplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
5174	5173	C-C/T				T-T/C
5198	5197	G-G/A			7055	A-A/G
5213	5212	C-C/T			7059	G-G/A
5300	5299	C-C/T			7146	A-A/G
5312	5311	C-C/T			7159	T-T/C
5371	5370	C-C/T			7184	G-A
5424	5423	C-C/T			7256	G-G/A
5440	5439	C-C/T			7309	C-C/T
5456	5455	C-C/T			7389	T-T/C
5593	5592	T-T/C			7406,1	T-T/C
5633	5632	T-T/C			7407	INS C
5650	5649		G-G/A		7411	T-C
5655	5654		T-C/T		7476	T-T/C
5656	5655	A-G	A-A/G		7521	G-G/A
7756	7755		C-C/T		10295	G-G/A
7763	7762		G-G/A		10345	T-T/C
7768	7767	G-A	A-A/G		10355	C-C/T

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica*	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
7815	7814	C-C/T			10439	10438
7867	7866	C-C/T			10455	10454
7897	7896	G-A			10463	10462
8027	8026	G-A				T-C
8065	8064		G/A-G		10550	10549
8117	8116	C-C/T			10679	10678
8133	8132	C-C/T			10685	10684
8248	8247	A-A/G			10688	10687
8270	8269	C-T	C-C/T		10754	10753
8426,1	8425,1	INS G			10810	10809
8468	8467		C-C/T		10819	10818
8616	8615		A-A/G		10873	10872
8655	8654		C-C/T			T-C
8697	8696	G-A	G-G/A		10882	10881
8701	8700		A-A/G		10885	10884
8718	8717	A-G			10944	10943
8818	8817		T-T/C		10956	10955

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
8893	8892	A-T			10972	10971
8903	8902		C-C/T		10975	10974
9055	9054	A-G			10978	10977
9093	9092		G-G/A		9667	9666
9132	9131	A-G			9696	9695
9163	9162	A-G	A-A/G		9698	9697
9313	9312		A-A/G		9716	9715
			A-A/C		9767	9766
9327	9326		A-A/G		9778	9777
9352	9351		C-C/T		9899	9898
9405	9404		T-T/C		10143	10142
9413	9412		T-T/C		10295	10294
9419	9418		C-C/T		10345	10344
9445	9444		G-G/A		10355	10354
9477	9476	G-A	G-G/A		10439	10438
9502	9501	G-A			10455	10454
9540	9539		C-C/T		10463	10462

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
9548	9547	A-G				
9554	9553	G-G/A			10550	10549
9559	9558	C-C/T			10679	10678
9564	9563	G-G/A			10685	10684
9574	9573	C-C/T			10688	10687
9591	9590	G-G/C			10754	10753
9628	9627	G-G/A			10810	10809
9667	9666	G-A			10819	10818
9696	9695	C-C/T			10873	10872
9698	9697	C-T	C-C/T			
9716	9715	C-T			10882	10881
9767	9766	C-T			10885	10884
9778	9777		G-G/A		10944	10943
9899	9898	C-T			10956	10955
10143	10142	A-G			10972	10971
10975	10974	C-C/T			13398	13397
10978	10977	A-A/G			13431	13430

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
11001	11000	A/A/G			13436	13435
11013	11012	X-C/T			13468	13467
11024	11023	T-T/C			1376	13475
		C-C/T			13484	13483
11069	11068	A-A/G			13487	13486
11084	11083	A-A/G			13506	13505
11113	11112	T-C	T-T/C		13530	13529
11177	11176		C-C/T		13536	13535
11180	11179		G-G/T		13563	13562
11195	11194		G-G/A		13573	13572
11217	11216		C-C/T		13579	13578
11251	11250	A-G	A-A/G		13609	13608
		G-A	G-G/A			
11299	11298	C-T	C-C/T		13617	13616
11332	11331		T-T/C			T-C
11337	11336		G-A/G		13634	13633
11351	11350		G-A/G		13650	13649

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB	PB que elimina el hueco de posición en 3106
Numeración Histórica**				Numeración Histórica **		Homo-Homo
11356	11355		T-T/C		13261	13620
11377	11376		A-A/G		13631	13630
11420	11419		G-G/A		13637	13636
11647	11646	C-T			13638	13637
11719	11718	G-A	G-G/A		13651	13650
11812	11811	A-G	A-A/G		13655	13654
11852	11851		G-G/A		13674	13673
					13674	DEL C
11857	11856		C-C/T		13680	13679
11864	11863	C-T	C-C/T		13687	13686
11881	11880		C-C/T		13707	13706
11907	11906		T-T/C		13708	13707
11914	11913		G-G/A		13711	13710
12012	12011		C-C/T		A/G-A	
12013	12012				13712	13711
12308	12307		G-G/A		13725	13724
12372	12371		G-G/A		13731	13730

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB	Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB
					Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
			A-A/G		13734	13733
12492	12491		T-T/A		13743	13742
12624	12623	C-T			13748	13747
12633	12632	A-C	A-A/C		13759	13758
12654	12653		G-G/A			G-G/A
12810	12809		G-G/A		13766	13765
12959	12958		C-C/T		13788	13787
13079	13078			A/G-A	13789	13788
13089	13088	T-A			13805	13804
13105	13104		A-A/G		13841	13840
13111	13110	T-C			13880	13879
13212	13211		C-C/T		13888	13887 X-T X-C/T
13281	13280		T-T/C		13911	13910 G-G/A
13294	13293		A-A/G		13933	13932 A-A/G
13359	13358		G-G/A		14025	14024 C-C/T
13368	13367	G-A	G-G/A		14044	14043 C-C/T
		A-G	A-A/G		14135	14134 T-T/A

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas											
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo
14139	14138	G-G/A			15889	15888			T-T/C		
14167	14166	T-T/C			15904	15903	T-C		T-T/C		
14178	14177	T-T/C							C-A/C		
14182	14181	T-G	T-T/C		15907	15906			G-G/A		
14203	14202	A-A/G			15927	15926	A-G				
14220	14219	X-G	X-G/A		15928	15927	A-G		A-A/G		
14233	14232	A-G	A-A/G				G-A		G-G/A		
14281	14280	T-C	T-T/C		15998	15997				A/T/A	
			C-C/T		15999,1	15998,1	INS T				
14899	14898	G-G/A			16048	16047			G-G/A		
14903	14902	G-A	X-A/G		16051	16050			A-A/G		
14918	14917	G-G/A							G-G/A		
15043	15042	G-G/A			16063	16062			C-C/T		
15115	15114	T-T/C			16067	16066			C-C/T		
15162	15161	C-C/T			16069	16068			C-C/T		
15218	15217	G-A	G-G/A		16093	16092	X-C		T-T/C		
15244	15243	G-G/A					C-T		C-C/T		

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
15265	15264	C-C/T			16095	C-T
15286	15285	C-C/T			16111	T-T/C
15301	15300	A-A/G			16126	T-C
15302	15301	C-C/T				C-C/T
15307	15306	C-C/T			16129	G-A
15323	15322	A-G	A-A/G		16134	C-C/T
			G-G/A		16148	C-C/T
15324	15323	C-C/T			16153	A-A/G
15343	15342	X-C	X-C/T		16163	G-G/A
15355	15354	X-A	X-A/G		16172	C-C/T
15379	15378		C-C/T		16183	C-C/T
15384	15383	X-C	X-C/T			T-C
15429	15428		A-A/G		16186	T-T/C
15452	15451	C-A	C-C/A		16188	T-T/C
		A-C	A-A/C			C-C/T
15523	15522		C-C/T		16190	T-C
15525	15524		G-G/A		16191	C-C/T

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
15526	15525		C-C/T			T-C
15527	15526		C-C/T		16208	T-T/C
15557	15556		G-G/A			C-C/T
15587	15586		C-C/T			T-T/C
15607	15606	A-G	A-A/G		16223	
		G-A	G-G/A		16224	C-T
15670	15669		C-C/T		16223	C-C/T
15693	15692	C-T	C-C/T			T-T/C
15698	15697		C-C/T		16225	
15704	15703		C-C/A		16235	A-A/G
					16239	C-T
15708	15707		G-G/T			X-C
15762	15761		G-G/A		16246	G-G/A
15812	15811		A-A/G		16256	T-T/C
15826,1	15825,1	INS G				C-C/T
15834	15833		T-T/C		16270	C-T
15865	15864		A-A/G		16292	C-C/T
15884	15883	C-G	G-C/G		16294	C-C/T

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de heteroplásicas a heteroplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
16270	16269	T-C	T-T/C	C-C/T	A-A/G	16296
16278	16277	T-C				16295
16280	16279		A-A/G	A/G-A		C-T
16290	16289		C-C/T			C-C/T
16291	16290			T-T/C		T-T/C
16292	16291			C-C/T		
16293	16292			T-T/C		
16294	16293			A-A/G		
16295	16294 -		C-T	T-T/C		
16296	16295		C-T	C-C/T		
16298	16297			T-T/C		
16303	16302			C-C/T		
				G-G/T		

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB Numeración Histórica**	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
16304	16303		T-T/C			
16311	16310	C-T	C-C/T			
16319	16318	C-T	C-C/T			
16320	16319	G-A	G-G/A			
16325	16324		T-T/C			
16344	16343		A-A/G			
16356	16355		T-T/C			
16342	16341	C-G	C-C/T			
16352	16351		T-T/C			
16353	16352		C-C/T			
16354	16353		T-T/C			
16355	16354		T-T/C			
16359,1	16358,1	INS G				

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas					
PB	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB que elimina el hueco de posición en 3106
Numeración Histórica**					Numeración Histórica **
16360	16359		C-C/T		
16362	16361		C-C/T		
			T-T/C		
16370	16369		G-G/A		
16389	16388		G-G/A		
16390	16389	X-G	X/G/A		
16398	16397	A-G		G/A/G	
16399	16398	G-A		G/A/A	
16429	16428		X-T/C		
16465	16464	C-T		C-C/T	
		T-C		T-T/C	
16475	16474			T-T/C	
16514	16513			C-C/T	
16519	16518	T-C		T-T/C	
		C-T		C-C/T	
16526	16525	A-G			G-G/A

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mutaciones de bases: Mutaciones observadas de homoplásicas a homoplásicas, de homoplásicas a heteroplásicas y de heteroplásicas a homoplásicas						
PB	PB que elimina el hueco de posición en 3106	Homo-Homo	Homo-Hetero	Hetero-Homo	PB Numeración Histórica **	PB que elimina el hueco de posición en 3106
16527	16526		C-C/T			
16537	16536	T-C	T-T/C			

* El primer nucleótido representa el nucleótido normal, seguido del nucleótido mutado; separados por un "-".

* Cuando no hay sangre presente, se indica como una "X".

** Numeración histórica en la que la delección en el PB 3106 se indica como un hueco y el polimorfismo poco frecuente 750A se ha conservado.

ES 2 354 452 T3

TABLA 5

Cebadores de Bucle D (usados para tejido fijado con formalina y sangre para biopsias con aguja)			
SEC ID Nº:	Cebador	Longitud (nº bases)	5'-3'
19	15971f	20	TTAACTCCACCATTAGCACC
20	15f	20	CACCCATTAAACCACTCACG
21	16211f	22	CAGCAATCAACCCCTCAACTATC
22	16410r	19	AGGATGGTGGTCAAGGGAC
23	389r	20	CCTAACACCAGCCTAACAG
24	420r	18	GTGCATAACGCCAAAAGA
25	711r	21	AACGGGGATGCTTCATGTGT
Cebadores de tejido fijado con formalina (usados para 31 prostatectomías)			
SEC ID Nº:	Cebador	Longitud (nº bases)	5'-3'
26	649f	21	TAGGTTGGTCCTAGCCTTTC
27	1051f	26	ACAATAGCTAACGACCAAACGGAT
28	1247r	22	CAAGAGGTGGTGAGGTTGATCG
29	8959r	22	CGATAATAACTAGTATGGGGAT
30	8814f	22	CCAACATCTATAAACCTAGCC
31	9247f	19	GCCCATGACCCCTAACAGG
32	9868r	21	CGGATGAAGCAGATAGTGAGG
33	9711f	22	CTGGGTCTCTATTACCCCTCC
34	10663f	18	TCTTGCCGCCTGCGAAG
35	10766r	22	TTAGCATTGGAGTAGGTTAGG
36	11813r	26	GTAGAGTTGAAGTCCTTGAGAGAGG
37	11629f	23	AATCAGCCACATAGCCCTCGTAG
38	12709r	28	GGAAGATGAGTAGATATTGAAGAACTG
39	12528f	22	GAACTGACACTGAGCCACAACC
40	13516r	23	GGTCTTGGAGTAGAACCTGTG
41	13239f	23	CGTAGCCTCTCCACTTCAAGTC
42	15351r	23	TCGTGCAAGAATAGGAGGTGGAG
43	15144f	25	TCCC GTGAGGCCAAATATCATTCTG
44	6145r	24	CAGTTGCCAAAGCCTCCGATTATG
45	5867f	25	CAATGCTTCACTCAGCCATTACCC
46	13957r	22	CTAGATAGGGATTGTGCGGTG
47	13838f	23	CCCTAGACCTCAACTACCTAACCC
48	15026r	21	GGCAGATAAAGAATATTGAGG

ES 2 354 452 T3

Cebadores de tejido fijado con formalina (usados para 31 prostatectomías)				
	SEC ID Nº:	Cebador	Longitud (nº bases)	5'-3'
5	49	14937f	22	CATCAATGCCACATCACTCG
10	50	1938f	24	AGAGCACACCCGTCTATGTAGCAA
15	51	2084r	26	TACAAGGGGATTAGAGGGTTCTGTG
20	52	2973f	24	TAGGGTTACGACCTCGATGTTGG
25	53	3101r	24	TAGAAACCGACCTGGATTACTCCG
30	54	3728f	23	CATATGAAGTCACCCTAGCCATC
35	55	3893r	23	GTTCGGTTGGTCTCTGCTAGTGT
40	56	4888f	27	CAATCATATACCAAATCTCTCCCTCAC
45	57	5035r	25	CATCCTATGTGGGTAATTGAGGAGT
50	58	5981f	23	TGGAGTCCTAGGCACAGCTCTAA
55	59	6154r	24	GGAACTAGTCAGTTGCCAAAGCCT
60	60	6911f	24	TGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATT
65	61	7082r	26	GAAGCCTCCTATGATGGCAAATACAG
	62	7829f	25	CGCATCCTTACATAACAGACGAGG
	63	8029r	24	GGCTTCAATCGGGAGTACTACTCG
Cebadores de sangre (prostatectomía)				
	SEC ID Nº:	Cebador	Longitud (nº bases)	5'-3'
35	64	16485f	24	GAACTGTATCCGACATCTGGTTCC
40	65	919r	22	TTGGGTTAACCGTGTGACCGCG
45	66	1644r	26	CTCCTAAGTGTAAAGTTGGGTGCTTG
50	67	615f	24	ATGTTAGACGGGCTCACATCACC
55	68	1488f	24	CGTCACCCCTCCTCAAGTATACTTC
60	69	2612r	28	GGAACAAGTGATTATGCTACCTTGCAC
65	70	2417f	23	CACTGTCAACCCAACACAGGCAT
	71	3641r	23	GCTAGGCTAGAGGTGGCTAGAAT
	72	3230f	23	GTAAAGATGGCAGAGCCCCGGTAA
	73	4417r	26	TTTAGCTGACCTTACTTAGGATGGG
	74	4337f	24	ATGAGAATCGAACCCATCCCTGAG
	75	5551r	24	GGCTTGAAGGCTTGGTCTGTA
	76	6418f	23	AACCCCCTGCCATAACCCAATAC
	77	7554r	33	CTTGACAAAGTTATGAAATGGTTTTCTAATA
	78	7400f	22	CCCACCCCTACCACACATTGAA
	79	8441r	26	GTTGGGTGATGAGGAATAGTGTAGG

Cebadores de sangre (prostatectomía)			
SEC ID Nº:	Cebador	Longitud (nº bases)	5'-3'
80	8346f	26	CAACACCTTTACAGTGAAATGCC
81	9413r	24	GCCTTGGTATGTGCTTCCTCGTGT
82	10285r	21	GGTAGGGGTAAAAGGAGGGCA
83	9273f	21	TCAGCCCTCCTAATGACCTCC
84	10198f	19	CCCGCGTCCCTTCTCCAT
85	11408r	25	GGAGTCATAAGTGGAGTCCGTAAAG
86	11210f	24	TTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTT
87	12231r	26	GTTAGCAGTTCTGTGAGCTTCTCG
88	12096f	22	TCCTATCCCTCAACCCGACAT
89	13098r	26	CAACTATAGTGCTTGAGTGGAGTAGG
90	12881f	26	CATCCTCGCCTTAGCATGATTATCC
91	13851r	24	GTTGAGGTCTAGGGCTGTTAGAAG
92	14738f	24	AGAACACCAATGACCCCAATACGC
93	15731r	28	CTAGGAGTCAATAAGTGATTGGCTTAG
94	15347f	23	CACGAAACGGGATCAAACAACCC
95	16000r	24	CTTAGCTTGGGTGCTAATGGTGG
96	5544f	21	CACGCTACTCCTACCTATCTC
97	6482r	20	GAUTGCTGTGATTAGGACGG
98	13354f	23	TTTATGTGCTCCGGGTCCATCAT
99	14458r	22	GATGGCTATTGAGGAGTATCCT
100	14399f	21	ACACTCACCAAGACCTCAACC
101	15593r	23	ATCGGAGAATTGTGTAGGCGAAT

Ejemplo 10

50 Deleción de 3,4 kb en el ADNmt de Tejido de Próstata

Se identificó una delección de aproximadamente 3,4 kilobases (kb) por amplificación del genoma mitocondrial completo de tejido de próstata recién congelado. Usando una regresión lineal, se estimó que el tamaño de la delección era de entre 3000 pares de bases (pb) y 3500 pb. Se identificaron dos delecciones candidatas posibles usando Mitomap (Brandon, M. C., Lott, M. T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Navathe, S. B., Baldi, P. y Wallace, D. C. MITOMAP: a human mitochondrial genome database -actualización de 2004. Nucleic Acids Research 33 (Número de base de datos): D611-613, 2005; www.mitomap.org), la delección de 3397 pb en 9574-12972 y la delección de 3379 pb en 10744-14124. Para determinar cuál de las dos delecciones era correcta, si lo era alguna, se desarrolló un cebador directo que tenía un puente sobre la unión de delección para cada una de las dos candidatas, asegurando que el cebador se extendiera más allá de las regiones repetidas que flanquean las delecciones. La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra el diseño y la secuencia del cebador. Se obtuvieron resultados de amplificación positivos para el amplicón correspondiente a la delección de 3379 pb (denominada delección de 3,4 kb) en 10744-14124.

65 La delección elimina todo o parte en los genes siguientes: (i) la subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa, (ii) la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, (iii) la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, (iv) el ARNt de histidina, (v) el ARNt de serina 2 y (vi) el ARNt de leucina 2.

ES 2 354 452 T3

Se determinó que la delección de 3,4 kb estaba presente en 91% de 33 muestras de próstata recién congeladas. Con los cebadores de delección específicos, se ensayaron tejidos fijados con formalina para aumentar el valor de n.

- 5 Previamente, los presentes investigadores secuenciaron genomas mitocondriales completos de 32 muestras de te-
jido microdisecadas mediante LCM y 12 biopsias con aguja de próstatas histológicamente normales. Las secciones
titulares archivadas de cada una de estas muestras se usaron para el estudio siguiente. Se eliminaron 1-2 secciones
en serie de cada muestra. Se extrajo el ADN de cada muestra en su totalidad más que como una microdisecación.
Por lo tanto, cada muestra consistía en una mezcla de tejido de próstata glandular, así como de tejido de pró-
stata estromal. Esta extracción se realizó usando el Mini Kit de ADN QIAamp de Qiagen (Nº Cat. 51304). Des-
10pués de la extracción, las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro Nano-Drop y las concentraciones
se normalizaron posteriormente a 2 ng/ μ l. Cada muestra se amplificó usando 20 ng de aportación de ADN y un
kit iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc.). Las reacciones se procesaron en un Opticon® 2 (MJ
Research).
- 15 Como se muestra en la Figura 6, se observó una diferencia distintiva en el ciclo umbral y, por extensión, en la
cantidad de la delección entre las muestras de próstata malignas y las muestras de próstata benignas sintomáticas. Las
muestras malignas presentaban un ciclo umbral sistemáticamente antes que las muestras benignas.

20 Ejemplo 11

Estudio a Ciegas de la Delección de 3,4 kb - Comparación del Ciclo Umbral

- Después del estudio descrito en el Ejemplo 10, se seleccionaron 21 muestras adicionales, siendo 10 de las mis-
mas benignas y 11 de las mismas malignas. El estado patológico se determinó mediante biopsias con aguja realiza-
das por un patólogo cualificado. Las muestras se enmascararon de modo que los presentes investigadores desco-
nocían su estado patológico cuando realizaron este ensayo. Los presentes investigadores fueron capaces de predecir
el estado patológico correctamente en 81% de los casos examinando el ciclo umbral. De los 4 avisos incorrectos,
30 dos eran muestras malignas que se determinó que eran benignas y 2 eran muestras benignas que se determinó que
eran malignas. Se solicitó del médico información clínica de seguimiento para los 2 individuos en el último ca-
so, para determinar si se les había diagnosticado cáncer de próstata posterior a los resultados de la biopsia con
aguja usados para este estudio. Uno de los individuos que originalmente produjo una muestra benigna, pero que
se predijo mediante este estudio que tenía un tumor maligno, produjo posteriormente una muestra maligna. Co-
mo resultado, uno de los falsos positivos se convirtió en un positivo verdadero. Por lo tanto, el estado patológico
35 se predijo correctamente en 86% de los casos examinados en este estudio. El valor predictivo positivo final (PPV,
donde PPV = positivos verdaderos/(positivos verdaderos + falsos positivos)) para este estudio era de 91% y el va-
lor predictivo negativo (NPV, donde NPV = negativos verdaderos/(negativos verdaderos + falsos negativos)) era de
80%.

40 Ejemplo 12

Estudio de Delección de 3,4 kb - Métodos (n=76)

45 *Muestras Archivadas*

- Se examinaron setenta y seis tejidos de próstata para la delección de 3,4 kb en este estudio. Todas las muestras de
tejido estaban fijadas en formalina, siendo 25 malignas, siendo 12 normales y teniendo 39 enfermedad prostática be-
nigna como se muestra histológicamente. Del último grupo, más de la mitad tenían hiperplasia. Todos los especímenes
50 eran biopsias con aguja tomadas de los archivos de los investigadores.

Especímenes de Próstata

- 55 Se realizó la retirada de cinta adhesiva aplicada por presión (*tapelift*) en cada portaobjetos usando Prep-Strips
(Número de Catálogo LCM0207) de Arcturus Bio-science Inc. Esto permitió la eliminación de cualquier materia
particulada o tejido no adherente del portaobjetos antes de la extracción del ADN. Con el tejido todavía en los por-
taobjetos, los portaobjetos se aclaron con PBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato) para eliminar tanto fijador
como fuera posible. Las secciones de biopsia con aguja 1-2 en los portaobjetos se rasparon en tubos de microcentrí-
60 fuga estériles usando hojas de bisturí esterilizadas envueltas individualmente. Después, se aisló el ADN se purificó
usando un Mini Kit de ADN QIAamp® (Qiagen, Nº Cat. 51304) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
Se procesó un control de extracto negativo en paralelo con las extracciones de portaobjetos como punto de control
de calidad. La concentración total de ADN y la proporción de pureza para cada muestra se determinaron mediante
espectrofotometría (Nano-Drop ND-1000) y se prepararon diluciones de 2 ng/ μ l con el fin de una Reacción en Cadena
65 de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR).

ES 2 354 452 T3

Cebadores (Oligonucleótidos)

Los cebadores oligonucleotídicos purificados se sintetizaron químicamente por Invitrogen (California, Estados Unidos). Las secuencias de los cebadores y los tamaños esperados de los productos de PCR amplificados se enumeran en la Tabla 6. Además, el análisis de PCR para las delecciones de ADNmt incluía controles positivos (ADN de una fuente que se sabe que lleva el ADNmt mutante). Cada conjunto de cebadores con la excepción del TNF se comprobó frente a una línea celular rho 0 sin mitocondrias para confirmar la ausencia de coamplificación de pseudogenes.

10

TABLA 6

Cebadores de Amplificación

15

Par de Cebadores	Posición Amplificada 5'-3'	Longitud de producto amplificado (pares de bases)
Deleción 3.4 a	10729-14379 (menos de 3379 pb a 10744-14124)	273
Tiempo Real		
ADNmt de 12s	708-945	238
TNF	3756-3886	131
3.4 directo (10729-10743 - 14125-14139)		
5'TAGACTACGTACATAACCCTACTCCTA-3' SEC ID N°: 139		
3.4 inverso (14361-14379) 5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3' SEC ID N°: 140		
12s directo (708-728) 5'-CGTCCAGTGAGTTCACCCCTC-3" SEC ID N°: 141		
12s inverso (923-945) 5'-CACTCTTACGCCGGCITCTATT-3' SEC ID N°: 142		
TNF directo (3756-3775) 5' -CCTGCCCAATCCCTTATT-3' SEC ID N°: 143		
TNF inverso (3866-3886) 5'-GGTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3' SEC ID N°: 144		
Para cebadores de TNF, Referencia de Cebadores Eppendorf® HotMaster™ Solicitud N° 1		

20

30

35

40

45

50

55

HotMaster-An innovative Hot Start/Cold Stop technology for better PCR* results

George Halley y Vincent Prezioso, PhD

George Halley, Eppendorf-5 Prime, Inc., Boulder, CO, Estados Unidos

Vincent Prezioso, Brinkmann Instruments, BioSystems Application Lab, Westbury, NY

http://www.brinkmananncanada.com/applications/PCR_appl_hotmaster.asp

Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real

60

Se realizaron tres PCR separadas en cada muestra. Cada reacción era de un volumen total de 25 µl e incluía ADN de molde, un par de cebadores (12s o Deleción 3.4 o TNF), un kit iQ™ SYBR Green Supermix (Número de Catálogo 170-8882, Bio-Rad Laboratories Inc.) y agua destilada desionizada (ddH₂O). El TNF (factor de necrosis tumoral) comprendía cebadores de genes nucleares de copia única y el 12s comprendía cebadores de genoma mitocondrial total. El volumen y las concentraciones para el ADN de molde, los cebadores y el tampón de reacción se enumeran a continuación.

ES 2 354 452 T3

TABLA 7
Componentes de qPCR

Reactivos	Concentración por Reacción	Volumen por Reacción
Tampón de Reacción	1X	12,5 µl
Cebador (directo e inverso)	250 nM	0,0625 µl de cada 100 µmoles de solución madre
ddH ₂ O	N/A	2,375 µl
ADN de molde	20 ng	10,0 µl
Total		25 µl

Los parámetros de ciclado para cada amplicón se enumeran en la Tabla 8.

TABLA 8
Parámetros de Ciclado

Etapa	Temperatura (°C)	Duración
1	95	3 min
2	95	30 s
3	66 (cebadores de delección 3.4) o 61,5 (cebadores de 12s) o 61,5 (cebadores de TNF)	30 s
4	72	30 s
5	Lectura de Placas	
6	72	10 min
7	Lectura de la curva de fusión de 50°C-110°C cada 1°C	3 s
Repetir las etapas 2-5 44 veces durante un total de 45 ciclos.		

Análisis

El termociclado, la detección a tiempo real y el análisis de las reacciones se llevaron a cabo usando un Sistema de Detección de Fluorescencia Continua DNA Engine Opticon® 2 equipado con un programa informático Intuitive Opticon Monitor™ (MJ Research Inc.). El método de curva patrón se utilizaba para la cuantificación del ADN. Los inventores realizaron un conjunto de diluciones en serie (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1) de tres moldes generados por PCR purificados, un producto para la delección 3.4, uno para los cebadores 12s y uno para el TNF. A partir de éstas, se generaron tres curvas patrón diferentes que mostraban el número de copias de ADNmt total (amplicón 12s-cebadores de genoma mitocondrial total), delección 3.4 o ADN nuclear total (TNF-cebadores de genes nucleares de copia única). Los valores de C_T de las muestras pueden convertirse después en el número de copias de ADN por comparación del C_T de la muestra con el de los patrones. La delección 3.4 se consideraba ausente o a bajos niveles si la delección no se detectaba en 37 ciclos.

La determinación de malignidad se basa en la cantidad de la delección de 3,4 kb presente en la muestra normalizada, como se indica por la localización del ciclo umbral. Esta localización puede ser absoluta, como en más de 25 ciclos

ES 2 354 452 T3

pero menos de 35 ciclos, o más probablemente una proporción entre el ADN mitocondrial total presente como se indica por el amplicón 12s y la delección de 3,4 kb. Esto puede expresarse como porcentaje del ADN mitocondrial total. El número de células, como se representó por el amplicón de TNF, puede incorporarse para refinar la distinción entre tejido benigno y maligno.

5 Para automatizar los análisis de estas muestras, se emplearon herramientas de bioinformática. Las tres variables que se consideran para estos análisis son el ciclo umbral C_T del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), las especies totales de mitocondrias que contienen esos sitios de cebadores específicos y las mitocondrias que albergan la delección de interés.

10 Análisis de Grupos

El agrupamiento no estaba normalizado ni eran funciones logarítmicas usadas debido a los intervalos de datos similares y pequeños.

15 La Figura 7 muestra el movimiento real y las tendencias de los datos. El eje x es el número de paciente y el eje y es el ciclo umbral obtenido a partir de la PCR a tiempo real.

20 Es importante observar que cuanto mayor es el ciclo umbral, menor es la cantidad de la variable presente.

25 La tendencia general primaria mostrada en la Figura 7 se basa en las diferencias/proportiones entre las variables de Delección, Total y TNF. La delección es de escasa a ausente para las muestras benignas/normales (lado derecho) y aumenta (hacia la izquierda) con las muestras benignas anormales y malignas. Las muestras benignas anormales y malignas comienzan a diferenciarse por sí mismas entre sí basándose en la proporción de ciclo umbral de Delección respecto a TNF.

Aprendizaje Supervisado

30 El aprendizaje supervisado se basa en que el sistema intenta predecir resultados para muestras conocidas. La mitad de los datos se usaron para el entrenamiento y la otra mitad para ensayar el algoritmo. El aprendizaje supervisado compara sus predicciones con la respuesta diana y “aprende” de sus errores. Pero si el resultado esperado es superior o inferior al resultado real en los datos, el error se propaga de nuevo a través del sistema y los pesos se ajustan por consiguiente.

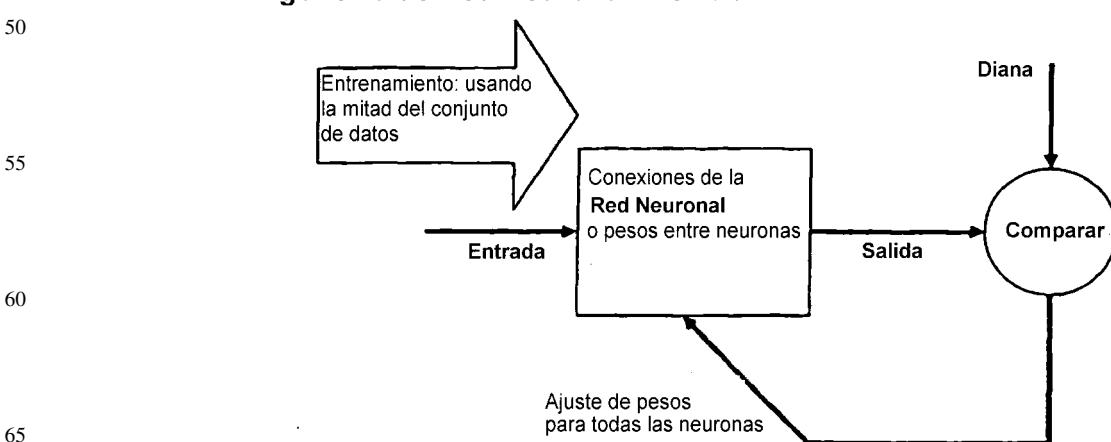
35 Conjunto de datos: De 5% a 35% - Benigno
De 35% a 65% - Hiperplasia
De 65% a 95% - Maligno.

40 Algoritmo de ANN (mostrado esquemáticamente a continuación):

La mitad del conjunto de datos se usó para el entrenamiento de ANN.

45 La otra mitad se usó para comparar la Exactitud = Comparar el conjunto de datos esperado con el conjunto de datos obtenido → 86,6%.

Algoritmo de Red Neuronal Artificial



ES 2 354 452 T3

Aprendizaje Supervisado de Datos de Delección Usando una Red Neuronal Artificial (ANN)

Tres Clasificaciones:

- 5 Benigna
- 10 Hiperplasia
- 15 Maligna

10 Se usan tres variables para cada clasificación basándose en el Ciclo Umbral C_T de PCR a Tiempo Real:

- Factor de Necrosis Tumoral (TNF) - Control de copias nucleares.
- 15 Mitocondrias Totales - Control de copias mitocondriales.
- Deleción - Mitocondrias en el estado delecionado.

20 *Resultados*

La mitad del conjunto de datos se usa para entrenar la ANN y la mitad restante se usa para comparar la exactitud.

Exactitud de Tres Clasificaciones = 86,6%

25 *Valor Predictivo Positivo (PPV);*

Benigno a Maligno = 88,2%

30 *Valor Predictivo Negativo (NPV)*

Benigno a Maligno = 76,5%.

35 *Ejemplo 13*

El uso de una delección de ADN mitocondrial de 3895 pb como marcador para la exposición al sol en piel humana

40 Desde el descubrimiento inicial de la posible asociación de la delección de 3895 pb con la exposición al sol como se describió por Harbottle *et al.*, 2004 y Durham *et al.*, 2003, trabajos adicionales han confirmado que la asociación está presente. Además, el trabajo adicional ha permitido el uso de esta delección para un ensayo de diagnóstico de exposición al sol o detección de cáncer de piel a través de la invención de un nuevo método para la detección de delecciones y reorganizaciones de secuencia de una forma totalmente cuantitativa. Este método proporciona la hibridación de un cebador o sonda con la secuencia recién formada creada por la delección o inserción implicada en la reorganización y, de este modo, permite el uso de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) como medio de detección. El uso de la plataforma de qPCR permite la detección cuantitativa de la delección más que un escenario de simple ausencia o presencia. Esta cuantificación es la base del ensayo ya que son las cantidades relativas de delección las que miden el nivel de exposición al sol o el carácter del tumor maligno más que la semicuantificación de simple presencia o ausencia previamente descrita. Además, la plataforma de qPCR permite el uso de tejido aparentemente no afectado o 50 no expuesto ya que la sensibilidad de detección es sustancialmente superior que la detección por PCR convencional y bromuro de etidio.

Antecedentes

55 La incidencia de cáncer de piel de tipo no melanoma (NMSC) está aumentando en poblaciones de origen europeo (Severi e English, 2004). Por ejemplo, se diagnostican un millón de nuevos casos cada año en los Estados Unidos (Wesson y Silverberg, 2003) y 65.000 en el Reino Unido (cifras proporcionadas por Cancer Research, Reino Unido). El NMSC representa aproximadamente 90% de los cánceres de piel y consiste en carcinomas de células basales y células escamosas (BCC y SCC, respectivamente). El BCC es la forma más común de NMSC y surge predominantemente a partir de los queratinocitos basales de la epidermis, pero también a partir de células en los folículos pilosos y las glándulas sebáceas. Son localmente invasivos pero rara vez metastatizan. Los SCC también proceden de los queratinocitos basales; sin embargo, al contrario que los BCC, los SCC pueden metastatizar. En comparación con los BCC, los SCC muestran el mayor aumento con la edad y se concentran en las personas de edad avanzada (Severi e English, 2004). La densidad relativa de NMSC es mayor en los sitios corporales expuestos “habitualmente” al sol cuando se 60 está al aire libre, tales como el cuero cabelludo, la cara, el cuello y las orejas, como se definen por Armstrong (2004). Sin embargo, los SCC difieren de forma apreciable de los BCC en que tienen una densidad mucho menor en sitios corporales que están expuestos “ocasionalmente” al sol, tales como hombros, espalda y pecho, como se definen por Armstrong (2004).

ES 2 354 452 T3

Por lo tanto, el determinante principal del NMSC es el componente de radiación ultravioleta (UVR) de la luz solar que induce daños en el ADN. De forma importante, es tanto el patrón (más continuo frente a intermitente) como la cantidad acumulada de exposición al sol lo que influye en el desarrollo de NMSC (Armstrong y Kricker, 2001). Para determinar un marcador fiable de exposición a UVR acumulada en piel humana, los inventores y otros han examinado

- 5 la idea novedosa de usar el ADN mitocondrial (ADNmt), más que el ADN nuclear, como biomarcador de daños en el
ADN inducidos por UV (Pang *et al.*, 1994; Berneburg *et al.*, 1997; Birch-Machin *et al.*, 1998; Birch-Machin, 2000). En
comparación con la exploración de mutaciones de genes de ADN nuclear tales como p53, existen ciertas ventajas en
el estudio de los daños del ADNmt en la piel expuesta al sol. En primer lugar, aunque existen pruebas en mitocondrias
10 para la reparación de la escisión de bases del daño oxidativo, no existen pruebas de la reparación de la escisión nuclear
para la reparación de fotoproductos de ADN (por ejemplo, dímeros de ciclobutano pirimidina) en ADNmt (LeDoux
et al., 1993; Croteau y Bohr, 1997; Pascucci *et al.*, 1997; Sawyer y Van Houten, 1999). En segundo lugar, cada célula
15 puede contener hasta varios miles de copias del genoma de ADNmt y las mitocondrias pueden tolerar por lo tanto
niveles muy elevados (de hasta 90%) de ADNmt dañado por complementación del tipo silvestre restante (Chomyn *et
al.*, 1992; Sciacco *et al.*, 1994). En su conjunto, estos factores conducen a la acumulación de fotodaños en el ADNmt
sin comprometer la función celular.

El uso de los daños en el ADNmt como biomarcador para una exposición al sol acumulada en piel humana es un campo de investigación relativamente nuevo, y trabajos previos han comparado simplemente los daños del ADNmt para distinguir entre piel protegida del sol y expuesta al sol (Pang *et al.*, 1994; Berneburg *et al.*, 1997; Birch-Machin *et
al.*, 1998). Esta estrategia está limitada ya que el NMSC se forma predominantemente en sitios corporales que están expuestos “habitualmente” al sol cuando se está al aire libre, a diferencia de los sitios que se exponen “ocasionalmente” al sol (Armstrong, 2004). En un intento por abordar esta limitación, el presente ejemplo demuestra que la frecuencia de aparición de una delección de ADNmt 3895 pb descrita poco frecuentemente (sólo descrita anteriormente en músculo enfermo (Moraes *et al.*, 1992)) es significativamente diferente entre sitios corporales que están expuestos “habitualmente” frente a “ocasionalmente” al sol. Además, el ejemplo demuestra la relación entre la etiología de la delección de 3895 pb con el componente UVR de la luz solar por inducción de la delección de 3895 pb *in vitro* con dosis subletales repetitivas de una fuente de luz UVA + UVB.

Materiales y Métodos

- 30 La radiación ultravioleta (UVR) en la luz solar está ampliamente reconocida como el determinante principal del cáncer de piel de tipo no melanoma (NMSC) en individuos caucásicos. Trabajos anteriores por los presentes inventores y otros han examinado el uso de los daños en el ADN mitocondrial (ADNmt) como biomarcador de una exposición al sol acumulada en la piel humana. Estos estudios han comparado los daños en el ADNmt entre piel protegida del sol y expuesta al sol. Esta estrategia está limitada porque el NMSC se forma predominantemente en sitios corporales que están expuestos “habitualmente” al sol cuando se está al aire libre, a diferencia de sitios que se exponen “ocasionalmente” al sol, y como tales difieren en su exposición acumulada a UV. En un intento por abordar esta limitación, este ejemplo investigó la frecuencia de aparición de una delección de ADNmt de 3895 pb descrita poco frecuentemente en 104 muestras de piel humana de la misma edad tomadas de sitios corporales expuestos habitualmente, ocasionalmente y raramente al sol. Había un aumento significativo en la frecuencia de delección con la exposición creciente a UV ($p<0,0001$) y era de interés que había una frecuencia de delección significativamente superior en sitios corporales que están expuestos “habitualmente” al sol en comparación con los que se exponen “ocasionalmente”, tanto en la dermis ($p=0,0018$) como en la epidermis ($p<0,0001$). La investigación de la delección de 3895 pb en las mismas muestras de NMSC usadas en un estudio previo de la delección común de 4977 pb mostró una frecuencia comparativamente superior de aparición de la delección de 3895 (8/10 frente a 4/10, respectivamente), aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa. Además, el ejemplo relaciona además entre la etiología de la delección de 3895 pb con el componente UVR de la luz solar por inducción de la delección de 3895 pb *in vitro* con dosis subletales repetitivas de una fuente de luz UVA + UVB. La frecuencia de la delección de 3895 pb en piel humana proporciona un biomarcador potencial para la exposición a UV acumulada y proporciona una herramienta de detección temprana para el desarrollo de NMSC, además de proporcionar un método de control de la seguridad a largo plazo de regímenes clínicos de fototerapia UV.

Muestras de Pacientes

- 55 Se tomó piel perilesional clínicamente normal de sitios corporales que están expuestos “habitualmente” al sol cuando se está al aire libre (tales como cuero cabelludo, cara, cuello y orejas) (epidermis n=21, dermis n=21, edad media ± ETM = $69,4 \pm 2,6$) y sitios corporales que están expuestos “ocasionalmente” al sol (hombros, espalda y pecho) (epidermis n=21, dermis n=21, edad media ± ETM = $63,1 \pm 3,6$) con consentimiento informado de 42 pacientes con NMSC que acudieron a la clínica de escisión de cáncer de piel de la Royal Victoria Infirmary, Newcastle, Reino Unido.
60 No hay diferencias de edad significativas entre los grupos expuestos habitualmente y ocasionalmente al sol ($p=0,158$: prueba t bilateral (corrección de Welch)). Además, de los 42 pacientes, el porcentaje de mujeres:hombres era casi el mismo (es decir, 52%:48%, respectivamente) así como el porcentaje de BCC y SCC, teniendo 57% de los pacientes un BCC. Se tomaron muestras de piel normal de sitios corporales que están rara vez expuestos al sol (tales como las nalgas y el talón) de muestras *postmortem* previamente obtenidas (epidermis n=10, dermis n=10, edad media = 73 años). La epidermis y al dermis se separaron usando dispasa a 0,25% a 4°C durante una noche (Durham *et al.*, 2003) y el ADN se extrajo usando un kit de extracción de tejido DNeasy de Qiagen. Se obtuvieron tumores epidérmicos, BCC (n=5), SCC (n=5), de pacientes que acudieron para la escisión del cáncer. Ninguno de los pacientes usado para este estudio tenía defectos en el ADNmt.

ES 2 354 452 T3

Irradiación con UV de células HaCaT

Se cultivó una línea celular queratinocítica espontáneamente inmortalizada (HaCaT) (Boukamp *et al.*, 1988) en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía suero fetal bovino a 10%, 5 UI por ml de penicilina y 5 g por ml de estreptomicina. Las células se cultivaron hasta una confluencia de 70%-90% en placas de Petri tratadas para cultivo de tejidos de 9 cm de diámetro, se lavaron en PBS y después se irradiaron en días alternos con una dosis subletal (0,5 J por cm² que es equivalente a 1 SED) de UVR usando una lámpara Hclarium de 40 W (Wolff B1.01, 290-400 nm, emisión de pico a 325 nm). A puntos temporales apropiados, se extrajo el ADN celular total de las células adherentes usando el kit de extracción de tejido DNeasy de Qiagen.

10

Análisis de PCR

La PCR se llevó a cabo en una reacción de 25 µl que contenía 200 ng de ADN genómico, 600 nM de cada cebador, dNTP 250 µM, 0,6 U por reacción de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), tampón GeneAmp (que contiene Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM y gelatina a 0,01% (p/vol). Los cebadores de PCR usados eran L404 (5' CTT TTG GCG GTA TGC ACT TT 3') (404-423nt) (SEC ID N°: 145) y H4676 (5' GAT TAT GGA TGC GGT TGC TT 3') (4676-4657nt) (SEC ID N°: 146). Los cebadores L404 y H4676 estaban diseñados para hibridar fuera de la delección de 3895 pb. Durante la amplificación de ADN, el tiempo de extensión de polimerasa corto (30 s) no permitió la amplificación de productos de PCR de tipo silvestre, permitiendo sólo la amplificación del producto de 375 pb de menor tamaño, que representa la especie de ADNmt delecionado. Las condiciones de PCR eran de 94°C durante 10 min, 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 56°C durante 30 s, 72°C durante 30 s y una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio (0,25 µg por ml).

25

Análisis de la secuencia de ADN

El producto de PCR 375 pb se escindió del gel y se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Alemania) y se clonó en un vector pCR®4-TOPO® usando un kit de clonación TOPO®TA (Invitrogen, Reino Unido). Para confirmar la identidad del producto de PCR de 375 pb, se secuenció el ADN usando secuenciación automática de ADN (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania).

30

Análisis de PCR radiactiva

Para detectar bajos niveles de la delección generada por UVR, la PCR se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente pero con adición de 3 µCi de [α -³²P]-dCTP (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Los productos de PCR se sometieron después a electroforesis mediante un gel de poliacrilamida no desnaturizante a 6% y se expusieron a una exploración en Phosphorimager durante aproximadamente 24 horas. Los fragmentos de PCR radiactivos se exploraron y visualizaron mediante un Phosphorimager, usando el programa informático ImageQuant (Molecular Dynamics, Reino Unido).

40

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis estadísticos usando StatCalc (Epi-info. CDC, Alberta, Georgia) empleando las pruebas de χ^2 , χ^2 de Pearson, exacta de Fisher y t para datos emparejados.

45

Resultados y Discusión

Confirmación de la identidad de la delección de 3895 pb

50 Se volvió a analizar el espectro de delección de ADNmt de NMSC y piel expuesta al sol de un estudio anterior (Durham *et al.*, 2003). Se descubrió que muchas muestras albergaban una delección de aproximadamente 4 kb de tamaño. Después de una búsqueda en la base de datos MITOMAP (Mitomap, 2004), se identificó que la delección era la especie de 3895 pb que se describió en los nucleótidos que abarcaban el arco menor 547-4443. Esta delección se había asociado previamente con el Síndrome de Kearns Sayre y con Oftalmoplejía Externa Progresiva Crónica (Moraes *et al.*, 1995). Para confirmar la identidad de la delección, se diseñó un ensayo de PCR específico de delección como se ha explicado en la sección de métodos. El producto de 375 pb de esta PCR se secuenció para confirmar que contenía la secuencia de unión de delección que es característica de la delección de 3895 pb, en concreto 5' CTAACC^{536 pb/4430 pb}ccataccccgaa^{548 pb/4442} AATGTT 3' (SEC ID N°: 147). Característicamente, esta secuencia contenía sólo una de las dos repeticiones de 12 pb que flanquean la delección de 3895 pb en ADNmt de tipo silvestre (letras minúsculas).

55 Una comparación de la frecuencia de la delección de 3895 pb en sitios corporales que están expuestos habitualmente al sol frente a los que están expuestos ocasionalmente

60 Como la delección de 3895 pb se observó originalmente en muestras de NMSC tomadas de sitios expuestos al sol, los presentes inventores abordaron la cuestión de si la frecuencia de la delección es un marcador de una exposición al sol acumulada creciente. Usando el ensayo de PCR específico de delección (véanse los Materiales y Métodos), se analizó la frecuencia de aparición en 104 muestras de piel humana dividida de la misma edad tomadas de sitios cor-

ES 2 354 452 T3

porales expuestos habitualmente, ocasionalmente y raramente al sol. Había un aumento significativo en la frecuencia de delección con exposición a UV creciente tanto en la epidermis ($p<0,0001$, $\chi^2=31,36$, 2df; prueba de χ^2 de Pearson) como en la dermis ($p<0,0001$, $\chi^2=28,68$, 2df). La Figura 8 muestra una frecuencia de aparición aumentada de la delección de 3895 pb observada con una exposición al sol creciente. La Figura 8a es un gel de agarosa teñido con

- 5 bromuro de etidio representativo que muestra una mayor frecuencia de la delección de 3895 pb en sitios corporales que están expuestos habitualmente (panel superior) al sol cuando se está al aire libre, a diferencia de los que se exponen ocasionalmente al sol (panel inferior) (D, dermis y E, epidermis). El control positivo representa una muestra con la delección de 3895 pb que se ha confirmado por secuenciación. El carril 1 en ambos paneles representa marcadores de peso molecular (Hyperladder IV- intervalo 1000-100 pb, Bioline, Londres, Reino Unido). Se añadió la
10 misma cantidad de ADN de molde a cada reacción de PCR. La Figura 8b es el histograma que muestra la frecuencia de la delección de 3895 pb en 104 muestras de piel dividida tomadas de diferentes sitios corporales expuestos al sol.

De forma importante, había una frecuencia de delección significativamente superior en sitios corporales que están
15 expuestos “habitualmente” al sol en comparación con los que están expuestos “ocasionalmente”, tanto en la dermis ($p=0,0018$, $\chi^2=9,72$, cociente de posibilidades 8,5; prueba de χ^2) como en la epidermis ($p<0,0001$, $\chi^2=17,53$, cociente de posibilidades 40) (Figura 8b). La delección no se detectó en los sitios corporales que se exponían “raramente” al sol (Figura 8b). Como las edades medias, las proporciones de sexos y los tipos de tumores de los que se tomó la piel perilesional eran muy similares entre los grupos expuestos habitualmente al sol y expuestos ocasionalmente al sol (véanse los Materiales y Métodos), es poco probable que los descubrimientos se confundan por estos factores.
20 Además, no había diferencia estadística en los valores de edad medios de esas muestras que albergaban (es decir, media = $66,95 \pm 2,84$) y no albergaban (media = $65,81 \pm 3,47$) la delección de 3895 pb ($p=0,80$, prueba t (corrección de Welch)).

25 *La delección de ADNmt de 3895 pb en NMSC*

La investigación de la delección de 3895 pb en las mismas muestras de NMSC que se usaron en un estudio previo de la delección común de 4977 pb (Durham *et al*, 2003) mostró una frecuencia de aparición comparativamente mayor de la delección 3895 (8/10 frente a 4/10, respectivamente), aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa.
30 Como estos tumores se escindieron de sitios corporales que estaban expuestos habitualmente al sol, es interesante especular que la delección de 3895 pb puede ser un marcador más sensible de exposición al sol acumulada que la delección común.

Históricamente, se ha asumido que la región del arco menor del genoma mitocondrial que contiene la delección de
35 3895 pb no alberga tantas delecciones como el arco mayor que contiene la delección común (Wei *et al*, 1996; Mitomap, 2004). Como resultado, la mayoría de los estudios previos ha tendido a centrarse en el espectro de delecciones en la
40 región del arco mayor. Podría ser por este “sesgo de investigación” que la delección de 3895 pb tiene una baja incidencia descrita en la bibliografía general. Como alternativa, la delección de 3895 pb puede aparecer de forma natural a niveles actualmente indetectables en tejidos normales, que después se enriquecen en la piel por exposición a UV.

45 *Ausencia de la delección de ADNmt de 3895 pb en sangre*

La delección de 3895 pb se ha descrito sólo previamente en músculo enfermo (Moraes *et al*, 1992). Aparte del presente estudio en piel, se desconoce la frecuencia de aparición en otros tejidos. Los presentes inventores investigaron la frecuencia de la delección en sangre realizando la PCR específica de delección en 16 muestras de sangre tomadas de pacientes de un grupo de edad similar a los de las muestras de piel. No se demostró que ninguna de las muestras de sangre albergase la delección (no se muestran los datos).

50 *Generación de la delección de 3895 pb en células HaCaT cultivadas por irradiación repetitiva con UV*

Para evaluar la relación causal entre la cantidad acumulada de exposición al sol y la frecuencia de aparición de la delección de 3895 pb, era necesario investigar el efecto de la luz solar *in vitro*. Como la luz solar contiene tanto UVA como UVB, se usó una lámpara Helarium (Diffey, 2002) para proporcionar una amplia serie de regímenes de dosis repetitivas de UVR subletales en un intento por generar la delección de 3895 pb en una línea celular derivada de la epidermis humana (HaCaT). La estrategia de dosis repetitiva de UVR óptima era una en la que se generaba la delección sin un grado significativo de muerte celular. Usando un ensayo basado en PCR radiactiva se demostró que los primeros signos de inducción de la delección de 3895 pb en células adherentes se observaron después de 17 dosis diarias alternas de 0,5 J por cm^2 (es decir, 1 SED) de UVR.

55 La Figura 9 muestra que la lámpara Helarium (UVA/UVB) induce la delección de 3895 pb en células HaCaT después de 17 dosis de 0,5 J por cm^2 de UVR. Las células HaCaT se irradiaron con 0,5 J por cm^2 (es decir, 1 SED) de UVA/UVB día sí día no durante un total de 19 dosis. Se extrajo el ADN celular total de células adherentes y se sometieron 100 ng a PCR para amplificar la delección de 3895 pb. Los primeros signos de un aumento inducible por UV de la delección de 3895 pb se observaron después de 17 dosis repetitivas de UVR. El control positivo es ADN de una muestra de tumor que alberga la delección de 3895 pb, mientras que el control negativo no contiene ADN. Además, como se usaron dosis subletales de UVR, el nivel de la delección se mantuvo en la línea celular después de dos dosis de UV posteriores, una propiedad que es importante si la delección de 3895 pb puede usarse como supuesto biomarcador acumulado de exposición al sol en piel humana. Esto es de interés dados los descubrimiento muy recientes

ES 2 354 452 T3

de Berneberg *et al* (2004) (publicado durante la revisión del manuscrito), que han demostrado *in vivo* que la delección común inducida por UVA puede estar presente 16 meses después del cese de la irradiación.

Las observaciones descritas anteriormente son importantes por varias razones. En primer lugar, el estudio ha usado una fuente de UVR que emite tanto UVA como UVB, representando de este modo más estrechamente una fuente de UVR solar simulada que los estudios previos que generaban la delección común usando solamente UVA (Bemeburg *et al*, 1999; Koch *et al*, 2001). En segundo lugar, esta es la primera vez que se ha generado una delección distinta de la delección común de 4977 pb mediante dosis repetitivas de UVR. Además, al contrario que el estudio de Berneburg que utilizaba fibroblastos, los presentes experimentos se han realizado en una línea celular derivada de queratinocitos y éste es el tipo celular que da origen al NMSC.

Significación funcional

Las regiones que están delecionadas en la delección de 3895 pb son del sitio de unión a mtTF1 en el bucle D al ARNr de metionina. Los genes delecionados incluyen ARNr 12s, ARNr 16s, ND1 y también los promotores para la transcripción de las cadenas tanto H como L. Debe conseguirse un umbral determinado de ADNmt de tipo silvestre:delecionado antes de que se observe una alteración de la función respiratoria mitocondrial (Sciullo *et al*, 1994). Para genes de ADNmt codificantes de proteínas, tales como los eliminados por la delección de 3895 pb, el valor umbral para la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial es de aproximadamente 65% y superior (Hayashi *et al*, 1991; Chomyn *et al*, 1992). Por ejemplo, un trabajo anterior ha demostrado que las muestras de piel humana que albergan <25% de la delección común de ADNmt de 4977 pb no muestran una deficiencia de la función mitocondrial, según se determinó por una tinción histoquímica doble de las actividades citocromo oxidasa y succinato deshidrogenasa (Durham *et al*, 2002). Puesto que no existe una tinción histoquímica funcional para la delección de 3895 pb, la delección se cuantificó en las muestras de paciente usando análisis de Southern. En presencia de los controles apropiados, este análisis no detectaba la presencia de la delección de 3895 pb, sugiriendo por lo tanto que los niveles de la delección son inferiores a 2%-5% (no se muestran los resultados). Por lo tanto, basándose en el trabajo previo con la delección común, es poco probable que los niveles de la delección de 3895 pb en las muestras de pacientes causen cualquier efecto funcional por toda la dermis o epidermis, aunque no pueden descartarse pequeños efectos focales.

Supuesto mecanismo

Se ha sugerido previamente que el mecanismo para la generación de la delección común implica un acontecimiento de recombinación intragenómica por emparejamiento erróneo de cadenas deslizadas y puede ocurrir en las secuencias de ADN de repetición de 13 pb que flanquean la delección común (Schon *et al*, 1989; Shoffner *et al*, 1989; Mita *et al*, 1990; Degoul *et al*, 1991). Como la delección de 3895 pb está flanqueada por repeticiones de 12 pb, su generación puede suceder por un mecanismo similar. El mecanismo para la generación de la delección común propone que las repeticiones de 13 pb son susceptibles a la flexión del ADN, permitiendo de este modo que se abra una pequeña región o "burbuja" de ADN monocatenario (Schon *et al*, 1989). Los presentes resultados sugieren que los UVR pueden ser un factor contribuyente a la generación de la delección de 3895 pb. El mecanismo para esto puede suceder afectando directa o indirectamente a los sitios estructuralmente lábiles en las repeticiones de 12 pb por apertura de una "burbuja" de ADN monocatenario que aumentaría el acontecimiento de recombinación.

Conclusiones

En resumen, el presente ejemplo ha demostrado que la frecuencia de un ADNmt de 3895 pb raramente descrito es significativamente diferente entre sitios corporales que están expuestos "habitualmente" frente a "ocasionalmente" al sol cuando se está al aire libre. La investigación de la delección de 3895 pb en las mismas muestras de NMSC usadas en un estudio previo de la delección común de 4977 pb mostró una frecuencia comparativamente superior de aparición de la delección de 3895 pb. Además, la relación entre la etiología de la delección de 3895 pb con el componente UVR de la luz solar se ha establecido induciendo la delección de 3895 pb *in vitro* con dosis subletales repetitivas de una fuente de luz UVA + UVB. La frecuencia de la delección de 3895 pb en piel humana proporciona un biomarcador potencial para exposición a UV acumulada en piel humana y puede proporcionar a su vez una herramienta de detección temprana para el desarrollo de NMSC, así como proporcionar un método de control de la seguridad a largo plazo de regímenes de fototerapia UV clínicos.

Ejemplo 14

Análisis de PCR a tiempo real de la delección de ADN mitocondrial 3895 en NMSC y su uso como marcador cuantitativo para la exposición a luz solar en piel humana

Materiales y métodos

Muestras de Piel Humana

Se tomaron muestras de tumores y de piel perilesional emparejadas con el consentimiento informado de pacientes que se sometieron a la escisión de un NMSC, en concreto, un Carcinoma de Células Basales (BCC) ($n=5$, intervalo de edad 55-89 años, media de 78 años) o un Carcinoma de Células Escamosas (SCC) ($n=5$, intervalo de edad de 70-87 años, media de 78 años) en la Clínica de Pacientes Ambulantes de la Royal Victoria Infirmary, Newcastle,

ES 2 354 452 T3

Reino Unido. Para los estudios de exposición al sol, se tomó piel perilesional clínicamente normal de sitios corporales que estaban expuestos “habitualmente” al sol cuando se está al aire libre (tales como cuero cabelludo, cara, cuello y orejas) (epidermis n=30, dermis n=30, edad media \pm ETM = 70,45 \pm 2,161) y sitios corporales que estaban expuestos “ocasionalmente” al sol (hombros, espalda y pecho) (epidermis n=22, dermis n=22, edad media \pm ETM = 63,77 \pm 3,501). No había diferencias de edad significativas entre los grupos expuestos habitualmente y ocasionalmente al sol ($p=0,1134$): prueba t bilateral (corrección de Welch). Para todas las muestras de piel perilesional, se separó la epidermis y la dermis usando dispasa a 0,25% a 4°C durante una noche (Durham *et al.*, 2003) y se extrajo el ADN usando un kit de extracción de tejido DNeasy de Qiagen. Ninguno de los pacientes usados para este estudio tenía un defecto de ADNmt.

10

Análisis de PCR

La PCR se llevó a cabo en una reacción de 25 μ l que contenía 200 ng de ADN genómico, 600 nM de cada cebador, dNTP 250 μ M, 0,6 u/reacción de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), tampón GeneAmp (que contiene Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM y gelatina a 0,01% (p/v). Los cebadores de PCR L404 y H4676 (Tabla 9 y Figura 10) estaban diseñados para hibridar fuera de la delección de 3895 pb. Durante la amplificación de ADN, el tiempo de extensión de polimerasa corto (30s) no permitió la amplificación de productos de PCR de tipo silvestre, permitiendo sólo la amplificación de los fragmentos de ADNmt delecionados y más cortos. Las condiciones de PCR eran de 94°C durante 10 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 56°C durante 30 s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Se visualizaron los productos de amplificación en un gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio (0,25 μ g/ml).

15

Esto se ha mejorado dos veces, primero usando Deep Vent (New England Biolabs) y después mediante una mejora adicional de la sensibilidad usando Taq Faststart de Roche. Esta ha permitido pasar de medir la delección en muestras expuestas al sol de pacientes de edad avanzada a ser capaces de medir la delección en pacientes jóvenes.

20

Análisis de PCR a Tiempo Real

Se ha establecido un ensayo de PCR TaqMan fiable para la cuantificación de la delección de 3895 pb. El método de PCR cuantitativa TaqMan proporciona una medición a tiempo real de la aportación de diana como acumulación de PCR mediante una sonda marcada doble. La sonda hibrida entre los cebadores directo e inverso y se escinde por la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa durante la fase de extensión de la PCR. Por lo tanto, el colorante indicador 5'-terminal FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC y el colorante inhibidor 3' terminal TAMRA (6-carboxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina) unidos a la sonda se separan, dando como resultado una emisión de fluorescencia del colorante indicador. La sonda no puede servir como cebador por sí misma porque está 3'-terminalmente bloqueada con un grupo fosfato. El método usa una sonda patrón interna (sonda IS, Tabla 1 y Figura 10) en la región del citocromo b del genoma (Koch *et al.*, 2001) para estimar el número total de copias para el ADNmt (es decir, delecionado y de tipo silvestre). El nivel de la delección de 3895 pb se determina mediante una sonda (sonda 3895, Tabla 9 y Figura 10) que abarca el punto de rotura de la delección, asegurando que sólo se amplifique si está presente la delección. La cuantificación del nivel de delección se determina por comparación de la proporción del patrón interno respecto a la delección de 3895 pb.

30

Se realizaron reacciones de amplificación como triplicados de 25 μ l en una microplaca de 96 pocillos. Se amplificaron reacciones de ADNmt total y ADNmt delecionado en tubos separados, conteniendo cada uno 100 ng de ADN, Mastermix Universal TaqMan 1X (ABI), 300nM de cada cebador patrón interno (ISF y ISR, Tabla 9 y Figura 10) y 100 nM de la sonda IS, o 300 nM de cada cebador de la delección de 3895 pb (3895F y 3895R, Tabla 9) y 100 nM de la sonda 3895 (Figura 10). Se realizó PCR y análisis de fluorescencia usando un ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Reino Unido). Las condiciones de amplificación eran las siguientes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minutos a 60°C. El valor de R_n es la señal indicadora diana normalizada respecto a la referencia pasiva, un colorante incluido en el tampón de reacción TaqMan. ΔR_n se define como la diferencia entre R_n⁺ (R_n de una reacción que contiene todos los componentes incluyendo el molde) y R_n⁻ (R_n de un control sin molde). El ciclo en el que se detecta un aumento estadísticamente significativo en ΔR_n se denomina el ciclo umbral (Ct). Las señales de fluorescencia se consideran significativas si la intensidad fluorescente supera 10 veces la desviación típica del valor de R_n de fondo para definir un umbral.

35

El método de PCR a tiempo real es nuevo y no se ha publicado anteriormente. El método tiene una sensibilidad aumentada y permite la cuantificación, en comparación con la PCR convencional semicuantitativa. Este tipo de detección específica de punto de rotura es la misma técnica usada para la detección de próstata y es novedosa. Los inventores han demostrado que es útil en la detección de reorganizaciones mitocondriales específicas para el cáncer de próstata y la exposición al sol, pero también pueden usarse para la detección de otras reorganizaciones.

40

La Figura 10 muestra la localización de cebadores de PCR y sondas TaqMan y es una representación esquemática del genoma de ADNmt que contiene la delección de 3895 pb. Los cebadores ISF/ISR y la sonda IS hibridan con el ADNmt tanto de tipo silvestre como delecionado. La detección de la delección de 3895 pb se realizó con los cebadores 3895F/3895R y la sonda 3895. La sonda 3895 específica sólo hibrida con el ADNmt delecionado ya que se une a través de la unión de delección. Además, la aparición de la delección de 3895 pb reúne los cebadores específicos de delección (es decir 3895F:3895R y L404:H4676) lo bastante cerca para permitir la generación de un amplicón en las condiciones de PCR dadas.

ES 2 354 452 T3

Clonación TOPO TA

La clonación de la región de control y la delección 3895 se llevaron a cabo usando un kit de Clonación TOPO TA (Invitrogen, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La clonación TOPO TA aprovecha la actividad transferasa terminal independiente de molde de la *Taq* polimerasa que añade una sola desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de los productos de PCR. El vector linealizado suministrado con el kit tiene un solo resto 3' desoxitimidina (T) saliente, que permite una ligación eficaz entre el producto de PCR y el vector. La presencia de un inserto del tamaño correcto se confirmó por análisis de fragmentos de restricción con EcoR1 en el vector pCR4-TOPO.

10 Resultados

Establecimiento de un Ensayo de PCR Cuantitativa a Tiempo Real para la Delección de 3895 pb

Después de determinar que era posible detectar y cuantificar de forma fiable el porcentaje de copias del genoma mitocondrial que alberga la delección de ADNmt 3895 pb, se examinó la linealidad de las dos reacciones de PCR usando la sonda patrón interna (sonda IS) o la sonda de delección 3895 (sonda 3895) sobre un amplio intervalo de concentraciones de molde. En ambos casos, se generó ADN de molde por clonación del producto de PCR apropiado en un vector de clonación (véanse los métodos). La concentración de cada molde se determinó fluorométricamente (GRI, Reino Unido) y se realizaron amplificaciones de PCR a tiempo real usando entre 50 ng y 50 pg de ADN de molde para cada sonda (Figura 11). La relación entre el valor de CT y la concentración de molde era lineal tanto para la delección de 3895 pb ($r=0,9952$) como para el patrón interno ($r=0,9941$). Además, el gradiente para la amplificación de cada molde era el mismo. Esto confirma que cada molde se amplifica con el mismo grado de eficacia. Como resultado, los valores de CT pueden usarse por lo tanto como medida del ADN de molde y para cuantificar la cantidad relativa de la delección de 3895 pb respecto al ADNmt de tipo silvestre. La capacidad de estas curvas patrón para predecir con exactitud la proporción de ADNmt delecionado:de tipo silvestre se confirmó usando un intervalo de las mezclas de molde delecionado:de tipo silvestre clonado (no se muestran los datos).

La Figura 11 muestra la sensibilidad de la PCR a tiempo real respecto al número de copias de molde. Se muestra el ciclo umbral (es decir, CT, eje vertical) a concentraciones decrecientes de ADN de molde (intervalo de dilución de 1/10-1/10000 de lug/ul de molde) o la delección de 3895 pb (A) o el patrón interno de tipo silvestre (B). Existe una relación lineal entre la concentración de molde y el número de ciclo umbral (CT) para ambas amplificaciones. Cada número representa la media \pm DT para tres observaciones independientes.

Cuantificación de la Delección de 3895 pb en Tumores

El nivel de la delección de 3895 pb en dermis y epidermis tanto de NMSC como perilesional histológicamente normal se determinó tanto mediante PCR TaqMan a tiempo real como mediante un ensayo de PCR convencional previamente establecido (Figura 12). Se descubrió que los niveles de la delección de 3895 pb cuantificados por PCR a tiempo real concordaban generalmente con los estimados mediante el análisis de PCR no cuantitativa convencional.

La Figura 12 muestra la cuantificación de PCR a tiempo real y la amplificación de PCR convencional de la delección 3895 pb en tumores mostrando geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que muestran la incidencia de la delección de 3895 pb en dermis (D) y epidermis (E) tumoral (T) y perilesional histológicamente normal, tanto de BCC como de SCC. Debajo de cada carril se muestra el nivel de la delección de 3895 pb ilustrado como porcentaje en cada muestra, según se cuantificó por PCR TaqMan a tiempo real. Se determina que las muestras marcadas con "ND" son cero, ya que el CT de la PCR a tiempo real era >36, que es el nivel observado en el control sin molde. El carril 1 en todos los paneles = marcadores de peso molecular (Hyperladder IV- intervalo 1000-100 pb, Bioline Ltd, Londres, Reino Unido). Se añadió la misma cantidad de ADN de molde a cada reacción de PCR.

El patrón de aparición simple de la delección de 3895 pb en BCC era generalmente similar al observado en SCC. Tanto en BCC como en SCC, la delección estaba presente en 3 de 5 pacientes (aunque no los mismos pacientes). En la piel perilesional, la presencia de la delección era más frecuente en la dermis (4 de 5 para BCC, 3 de 5 SCC) en comparación con la epidermis (2 de 5 BCC y 1 de 5 SCC). Sin embargo, aunque el número absoluto de muestras es pequeño, existen diferencias entre los resultados de BCC y SCC cuando se considera el nivel real de la delección más que su patrón de aparición simple. Por ejemplo, para las muestras en las que la delección estaba presente tanto en dermis tumoral como perilesional, el nivel de la delección era mayor en la dermis para pacientes con SCC, mientras que tendía a ser cierto lo contrario para los pacientes con BCC. Además, era interesante observar que las muestras de BCC tomadas de 2 áreas diferentes de la cara mostraban niveles enormemente diferentes de la delección (es decir, 7,14% frente a 0,02%) que pueden reflejar variaciones en el grado de exposición al sol acumulada. Se decidió investigar este aspecto adicionalmente determinando el nivel, al contrario que el patrón de aparición, de la delección en un subconjunto relativamente grande de muestras perilesionales histológicamente normales tomadas de diferentes sitios corporales expuestos al sol.

Cuantificación de la delección de 3895 pb en un subconjunto más grande de muestras de piel perilesional histológicamente normal tomadas de diferentes sitios corporales expuestos al sol

Se seleccionó piel perilesional histológicamente normal más que muestras tumorales para evitar confundir factores distintos del sitio de exposición al sol acumulada. Usando PCR Taqman cuantitativa a tiempo real, se examinó el

ES 2 354 452 T3

nivel de la delección de 3895 pb en 104 muestras de piel humana dividida de la misma edad tomadas de diversos sitios expuestos al sol definidos como expuestos habitualmente (n=60) y expuestos ocasionalmente (n=44) cuando se está al aire libre. La Figura 13 muestra un ejemplo típico de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio del amplicón 3895 pb y el nivel correspondiente de delección de 3895 pb según se detectó por PCR a tiempo real en

- 5 tres pares de muestras expuestas habitualmente y ocasionalmente al sol. La Figura 13 muestra la cuantificación por
 10 PCR a tiempo real y la amplificación por PCR convencional de la delección 3895 en geles de agarosa con bromuro de etidio representativos expuestos habitualmente al sol y expuestos ocasionalmente al sol que muestran ejemplos típicos de su nivel correspondiente de delección 3895 según se detectó por PCR a tiempo real de tres pares de muestras
 15 habitualmente expuestas al sol y tres pares de muestras ocasionalmente expuestas al sol. El nivel de delección se representa como porcentaje. El carril 1 en ambos paneles = marcadores de peso molecular (Hyperladder IV- intervalo de 1000-100 pb, Bioline Ltd, Londres, Reino Unido). Se añadió la misma cantidad de ADN de molde a cada reacción de PCR. El control positivo en ambos paneles es el ADN de tumor a partir del que se clonó y se secuenció el producto de PCR para producir el molde para la PCR a tiempo real. Una comparación de los niveles de la delección de 3895 pb detectados por PCR a tiempo real con los detectados por PCR convencional mostró de nuevo una buena correlación entre las dos técnicas.

Por lo tanto, se decidió analizar todas las muestras usando el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados de este análisis mostraban claramente una incidencia aumentada de la delección de 3895 pb con una exposición al sol creciente. La Figura 14 es un diagrama de dispersión que muestra la cuantificación de la delección de 3895 pb en
 20 piel habitualmente expuesta al sol y ocasionalmente expuesta al sol. Los niveles de la delección de 3895 pb se expresan como porcentaje en dermis y epidermis expuesta habitualmente al sol y expuesta ocasionalmente al sol, según se determinaron por PCR Taqman a tiempo real. El nivel medio de delección se indica mediante una línea horizontal para cada conjunto de muestras.

25 En términos específicos, el análisis de PCR cuantitativa a tiempo real mostraba un nivel significativamente mayor de la delección en las muestras expuestas habitualmente al sol en comparación con las muestras expuestas ocasionalmente al sol (p=0,0009 para la dermis, p=0,008 para la epidermis; prueba t bilateral). Curiosamente, las muestras dérmicas albergaban una mayor frecuencia de la delección que la epidermis (p=0,0143 expuesta ocasionalmente al sol, p=0,0007 expuesta habitualmente al sol). Como las edades medias, las proporciones de sexos y los tipos de tumores
 30 de los que se tomó la piel perilesional eran muy similares entre los grupos expuestos habitualmente al sol y expuestos ocasionalmente al sol (véanse los métodos), es poco probable que los descubrimientos se confundan por estos factores.

TABLA 9

Nombre	Colorante	Posición	Secuencia
ISF		16042-16066	5'-GAT TTG GGT AAC ACC CAA GTA TTG-3' SEC ID Nº: 148
ISR		16125-16102	5'-AAT ATT CAT GGT GGC TGG CAG TA-3' SEC ID Nº: 149
Sonda IS	Vic	16069-16101	5'-CAC CCA TCA ACA ACC GCT ATG TAT TTC GTA CA-3' Tamra SEC ID Nº: 150
3895F		491-508	5'-CAA CCC TCG CCC ATC CTA-3' SEC ID Nº: 151
3895R		4516-4489	5'-CCT GCA AAG ATG GTA GAG TAG ATG AC-3' SEC ID Nº: 152
Sonda 3895	Fam	527//4450	5'-TGC TAA CCC CAT ACC CCG AAA ATG TTG G-3' Tamra SEC ID Nº: 153
L404		404-423	5' CTT TTG GCG GTA TGC ACT TT 3') SEC ID Nº: 145
H4676		4676-4657	5' GAT TAT GGA TGC GGT TGC TT 3') SEC ID Nº: 146

60 Ejemplo 15

Confirmación del ensayo de biopsia

Se recuperaron muestras de biopsia de núcleo con aguja previamente no usadas de los archivos de muestras de próstata: 62 benignas, 49 malignas, 30 biopsias proximales a tumor aunque no contienen células malignas. En conjunto, se analizaron 141 muestras totales, así como 7 muestras adicionales, 6 para la generación de la curva patrón y 1 control negativo (contaminación de reactivo/reacción). Los ensayos completos se repitieron tres veces, una vez cada uno por tres individuos independientes.

ES 2 354 452 T3

Se realizó una consulta a ciegas en la Red Neuronal Artificial (ANN) con las muestras benignas adyacentes a o proximales a un tumor. Además, algunas muestras, que se determinó que eran distales al tumor (mapeadas en esta localización después de la prostatectomía) se incluyeron también. El resultado era que el tejido "normal" en estrecha proximidad con el tumor tenía una elevada frecuencia de la delección de 3,4 kb, que concuerda con tejido maligno vecino. Sin embargo, el beniguo distal conservaba su distintivo benigno (Figura 15). Este ensayo será capaz de confirmar la malignidad basándose en el tejido normal obtenido de una localización próxima a un tumor y se basa en la búsqueda de la delección de 3,4 kb. Se ha demostrado que los cambios moleculares en el ADN mitocondrial (es decir, la delección) se producen y preceden a cambios morfológicos detectables en el tejido. Por lo tanto una región tisular de una muestra que pueda parecerle normal o benigna a un patólogo bajo observación visual puede haber comenzado a acumular mutaciones en la vía hacia la malignidad. Esta capacidad es un gran complemento para la práctica clínica existente de biopsia de próstata y diagnóstico histológico por un patólogo. El uso del ensayo de PSA para explorar para cáncer de próstata da como resultado un gran número de procedimientos de biopsia, estimándose que el 70% no muestran células malignas. Estas biopsias se diagnostican como benignas y pueden dividirse en dos categorías: benignas verdaderas, es decir, sin tumor presente en la próstata; y benignas falsas, en las que está presente tumor en la próstata pero el procedimiento de biopsia con aguja no ha conseguido muestrear el tumor maligno. Mediante ensayo molecular del tejido benigno, se puede volver a asegurar que aquellos individuos en la categoría benigna verdadera son de hecho benignos, de modo que se les puede realizar un seguimiento menos estrecho con menores procedimientos de biopsia o sin procedimientos de biopsia de seguimiento, o se puede proporcionar una detección más temprana de un tumor maligno que está causando síntomas pero que todavía no es detectable con el procedimiento de biopsia, anulando la necesidad de una biopsia adicional para el diagnóstico y proporcionando una oportunidad al clínico para comenzar más pronto el tratamiento y para un tratamiento probablemente más eficaz del paciente. Este ensayo proporcionará tanto una nueva garantía como una confirmación a los análisis de biopsia actuales, que están plagados de grandes cantidades de diagnósticos falsos negativos.

25 Ejemplo 16

Mapeo del Tumor de Próstata

30 Un resultado potencial adicional de la investigación emprendida para el descubrimiento de un marcador de comportamiento tumoral es la capacidad para proporcionar un modelo tridimensional de la localización del tumor dentro de la próstata basándose en especímenes de biopsia con aguja por sextantes. La capacidad de la delección de 3,4 kb para reflejar la presencia de tumor maligno en tejido beniguo vecino será crítica para este procedimiento de mapeo. Este mapa proporcionaría al urólogo y al oncólogo un modelo virtual del tumor de próstata y puede contribuir a las 35 decisiones de tratamiento.

Referencias

- 40 Alonso, A. C Alves, M. P. Suarez-Mier, C Albarran, L Pereira, L Fernandez de Simon, P. Martin, O Garcia, L Gusmao, M Sancho, A Amorim 2005. *J Clin Pathology* 58: 83-86.
Anderson S, et al., *Nature* 290: 457-464, 1981.
- 45 Andrews R M, et al., *Nature Genetics* 23(2): 147, 1999.
- Armstrong, B. K. y Kricker, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*, 63, 8-18.
- 50 Armstrong, B. K. (2004). How sun exposure causes skin cancer: an epidemiological perspective. En Prevention of Skin Cancer, Hill, D., Elwood, J.M. y English, D.J. (eds), Vol. 3. págs. 89-116. Cancer Prevention - Cancer Causes. Kluwer Academic Publishers.
- Barringer et al., *Gene*, 89: 117 1990.
- 55 Bassam B J, Caetano-Anolles P M, Gresshoff P M., *Anal. Biochem.* 196: 80-83, 1991.
- Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T. y Krutmann, J. (1997). Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol*, 66, 271-5.
- 60 Bemeburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H. y Krutmann, J. (1999). Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem*, 274, 15345-9.
- Bemeburg, M., Plettenberg, H., Medve-Konig, K., Pfahlberg, A., Gers-Barlag, H., Gefeller, O. y Krutmann, J. (2004). Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion *in vivo* in normal human skin. *J Invest Dermatol*, 122, 1277-83.

ES 2 354 452 T3

- Berthon P, Valeri A, Cohen-Akeninc A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, Latil A et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 62: 1416-1424, 1998.
- 5 Birch-Machin M A y Krishnan K. *Mitochondrion*, 1, pág. 45 (2001).
- Birch-Machin M A, et al., *Methods in Toxicology*, Volumen 2, 51-69, 1993.
- 10 Birch-Machin M A, Lindsey J, Lusher M y Krishnan K. *Mitochondrion*, 1 Supl. 1, S30 (2001).
- Birch-Machin M A, Online Conference Report (Sunburnt DNA), International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, *New Scientist*, 2000(a).
- 15 Birch-Machin M A, Taylor R W, Cochran B, Ackrell B A C, Turnbull D M. *Ann Neurol* 48: 330-335, 2000(b).
- Birch-Machin, M. A. (2000). Mitochondria and skin disease. *Clin Exp Dermatol*, 25, 141-6.
- 20 Birch-Machin, M. A., Tindall, M., Turner, R., Haldane, F. y Rees, J. L. (1998). Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo-rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol*, 110, 149-52.
- Bogliolo, M, et al., *Mutagenesis*, 14: 77-82, 1999.
- 25 Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. y Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106, 761-71.
- Brierley E J, Johnson M A, Lightowers R N, James O, Turnbull D M., *Ann Neurol* 43(2): 217-223, 1998.
- 30 Brockington, et al., *Nature Genet* 4: 67-71, 1993.
- Brown, M. D., et al., *Am J. Humn Genet*, 60: 381-387, 1997.
- 35 Brumley, R. L. Jr. y Smith, L. M., 1991, Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res.* 19: 4121-4126 *Nucleic Acids Res.* 19: 4121-4126.
- Buttyan R, Sawczuk I S, Benson M C, Siegal J D, Olsson C A., *Prostate* 11: 327-337, 1987.
- 40 Byrne E., *Curr Opin Reumatol* 4(6): 784-793, 1992.
- Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman J G, Jen J et al., *Cancer Res* 57: 4997-5000, 1997.
- Carew J. S. y Huang P. *Molecular Cancer* <http://www.molecular-cancer.com> (2002)
- 45 Chee, M. et al *Science* 274; 610-614, 1996.
- Chen J. Z. et al. *Cancer Research* (62): 6470-6474 (2002).
- Chen J. Z. et al. *Carcinogenesis* (Vol 24) Nº 9 1481-1487 (2003).
- 50 Chinnery P F y Turnbull D M., *Lancet* 354 (suplemento 1): 17-21, 1999.
- Chinnery P F y Turnbull D M., *Lancet* 354 (suplemento 1): 17-21, 2000.
- Chinnery P F, Howel N, Turnbull D M. *J. Med. Genet.*; 36: 425-436, 1999.
- 55 Chollat-Traquet, C, Tobacco or health: a WHO programme., *Eur J Cancer*, 28(2-3): 311-315, 1992.
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S.T., Nonaka, I., Angelini, C. y Attardi, G. (1992). MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4221-5.
- Cohen D, Barton G, The cost to society of smoking cessation., *Thorax*. 53(2): S38-42, 1998.
- 60 Corral-Debrinski et al., *Mutat Res*, 275: 169-180, 1991.
- Corral-Debrinski et al., *Mutat Res*, 275: 169-180, 1991.
- Cortopassi G, Wang E., *Biochim Biophys Acta* 1271(1): 171-176, 1995.

ES 2 354 452 T3

- 5 **Cortopassi G. A. y Arnheim, H.** Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans, *Nucleic Acids Tes.* 18, 6927-6933 1990.
- 10 **Croteau D L, Stierum R H, Bohr V A, Mutat Res** 434(3): 137-148, 1999.
- 15 **Croteau, D. L. y Bohr, V. A. (1997)**. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem*, 272, 25409-12.
- 20 **Davis R M, Boyd G M, Schoenborn C A**, "Common courtesy" and the elimination of passive smoking. Results of the 1987 *National Health Interview Survey*. *JAMA* 263(16): 2208-10, 1990
- 25 **Degouli, F., Nelson, I., Amselem, S., Romero, N., Obermaier-Kusser, B., Ponsot, G., Marsac, C. y Lestienne, P. (1991)**. Different mechanisms inferred from sequences of human mitochondrial DNA deletions in ocular myopathies. *Nucleic Acids Res*, 19, 493-6.
- 30 **Diffey, B. L. (2002)**. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28, 4-13.
- 35 **Dong J T, Isaacs W B, Rinker-Schaeffer C W, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaaca J T, Barrett J C., Science** 268: 884-886, 1995.
- 40 **Driezen P, Brown K S.**, Searchable database of questionnaire items from populations surveys of tobacco use in Canada: A summary report to the Ontario Tobacco Research Unit (Toronto, Ontario) 1999.
- 45 **Durham, S. E., Krishnan, K. J., Betts, J. y Birch-Machin, M. A. (2003)**. Mitochondrial DNA damage in non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer*, 88, 90-5.
- 50 **Easton R D, Merriwether A D, Crews D E y Ferrell R E., Am. J. Hum. Genet.** 59: 202-212, 1996.
- 55 **Fahn H, Wang L, Hseith R, Chang S, Kao S, Huang M y Wei Y. American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, 154: 1141-1145, 1996.
- 60 **Fahn H J, Wang L S, Kao S H, Chang S C, Huang M H, Wei Y H., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 19(6): 901-9, 1998.
- 65 **Finegold D., Mitochondrial Disease- Primary Care Physician's Guide. Psy-Ed. Corp D/B/A Exceptional Parents Guide: 12, 1997.**
- 70 **Flanagan N, Birch-Machin M A, Rees J L., Hum Mol Genet** 9 (17): 2531-2537, 2000.
- 75 **Flanagan N, Ray A J, Todd C, Birch-Machin M A y Rees J L. J Invest. Dermatol** (2001) 117 (5) 1314-1317.
- 80 **Fliss M S, et al. Science** 287: 2017-2019, 2000.
- 85 **Gattermann, N, Berneburg, M, Heinisch, J, Aul, C, Schneider, W., Leukemia** 9(10): 1704-10, 1995.
- 90 **Green R, Reed J C., Science** 281 (5381): 1309-1312, 1998.
- 95 **Guatelli, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 87: 1874 1990.
- 100 **Gulavita, Sunil Dr. Northwestern Ontario Cancer Centre - Personal Communication.**
- 105 **Habano S, Nakamura, Sugai T., Oncogene** 17 (15): 1931-1937, 1998
- 110 **Harbottle et al., The Journal of Investigative Dermatology**: 1518-1521, 2004.
- 115 **Harding R M, et al., Am. J. Hum. Genet.** 66, 1351-1361, 2000.
- 120 **Harman, D., Proc Natl Acad Sci USA** 78(11): 7124-8, 1981.
- 125 **Hattori et al, Age-dependant increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia, AM. Heart J.**, 121, 1735-1742, 1991.
- 130 **Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y. y Nonaka, I. (1991)**. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci*, 88, 10614-10618.

ES 2 354 452 T3

Hayward S W, Grossfeld G D, Tlsty T D, Cunha G R., *Int J Oncol* 13: 35-47, 1998.

Healy E, Birch-Machin M A, Rees J L. Capítulo 1 1. The Human Melanocortin 1 Receptor Gene. In the Melanocortin Receptors (Cone RD (ed)). *Humana Press Inc. Nueva Jersey, Estados Unidos*, 1999

5 Healy E, Birch-Machin M A, Rees J L., *Lancet* 355, 1072-1073, 2000.

Hearst N, Hulley S B. Using secondary data. In Designing clinical research: an epidemiological approach. Ed. Hulley, S. y Cummings, S., *Baltimore: Williams y Wilkins*, páginas 53-62, 1988.

10 Hopgood, R., et al, 1992, Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products, *Biotechniques* 13: 82-92

15 Hsieh, R H y Wei, Y H, Age-dependent multiple deletions in human muscle mitochondrial DNA, in preparation 1992 <Http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html>

Huang G M, Ng W L, Farkas J, He L, Liang H A, Gordon D, Hood R., *Genomics* 59(2): 178-86, 1999.

20 Huoponen, Kirsil, Leber hereditary optic neuropathy: clinical and Molecular genetic findings, *Neurogenetics* (2001) 3: 119-125.

Ikebe et al., Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence, *Biochem. Biophys. Res. Common.* 170, 1044-1048, 1990.

25 Innis et al PCR Protocols, A Guide to Methods and Application, *Academic Press Inc. San Diego* 1990.

Kaiserman M J, *Chronic Dis Can* 18(1): 13-9, 1997.

30 Kalra J, Chaudhary A K, Prasad K., *Int. J. Exp. Pathol.* 72(1): 1-7, 1991.

Katayama et al., Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals, *Biochem. Int.*, 25, 47-56 1991.

35 Kleinle S, et al., *Human Genet.* 290: 457-465, 1997.

Koch, H., Wittem, K. P. y Bergemann, J. (2001). In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol.*, 117, 892-7.

40 Konishi N, Cho M, Yamamoto K, Hiasa Y. *Pathol. Int.* 47: 735-747, 1997.

Krishnan K y Birch-Machin M A. *British Journal of Dermatology* (2002), 146, 723.

45 Kwok et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 1173 1989.

Landegren et al. *Science*, 241: 1077 1988.

Landis S H, Murray T, Bolden S, Wingo P A. *Cancer J. Clin.* 49: 8-31

50 LeDoux S P, et al. *Mutat Res* 434(3): 149-159, 1999.

LeDoux, S. P., Patton, N. J., Avery, L. J. y Wilson, G. L. (1993). Repair of N-methylpurines in the mitochondrial DNA of *xeroderma pigmentosum* complementation group D cells. *Carcinogenesis*, 14, 913-7.

55 Lee H C, et al. *FEBS Letters* 354: 79-83, 1994.

Lee H C, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 362(2): 309-16, 1999.

Lee H C, Lu C Y, Fahn H J, Wei YH. *Federation of European Biochemical Societies*, 441: 292-296, 1998.

60 Leonard y Shapira 1997 Li Y, et al., En: Oxygen Radicals and the Disease Process, Amsterdam, Países Bajos: Harwood Academic Publishers, 237-277, 1997.

Lindsey J, Lusher M, Krishnan K J y Birch-Machin M A., *British Journal of Dermatology* (2001), 144, 655.

65 Linnane et al., 1990.

Liu C S, Kao S H, Wei Y H. *Environ. Mol. Mutagen* 30(1): 47-55, 1997.

ES 2 354 452 T3

- 5 **Lopez**, J. V. *et al.* (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the cat. *J. Mol. Evol.* 39, 174-190.
- Lowes S, Krishnan K, Lindsey J, Lusher M y Birch-Machin M A. *British Journal of Dermatology* (2002), 146,
5 736.
- 10 **Luckey**, J. A., *et al*, 1993, High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* 218:
154-172.
- 10 **McCormack, Douglas**. Website: <http://cormactech.com/dna>, 2001.
- 15 **Meibner C, von Wurmb N, Oehmichen M**, *Int. J. Legal Med.* 110: 288-291, 1997.
- 15 **Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G**, *Science* 286: 774-779, 1999.
- 20 **Miquel J, de Juan E, Sevilla I**. *EXS* 62: 47-57, 1992.
- 20 **Mita, S., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Shanske, S., Arnaudo, E., Fabrizi, G. M., Koga, Y., DiMauro, S. y Schon, E. A.** (1990). Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 18, 561-7.
- 25 **Mitochondrial Research Society** <http://www.mitoresearch.org/diseases.html>.
- 25 **Mitomap**. (2004). <http://www.mitomap.org>
- 30 **MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database**. <http://www.mitomap.orgu2005>.
- 30 **MITOMAP: A human mt genome database** (www.gen.emory.edu/mitomap.html).
- 35 **Moraes, C. T., Ricci, E., Petruzzella, V., Shanske, S., DiMauro, S., Schon, E. A. y Bonilla, E.** (1992). Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nat Genet*, 1, 359-67.
- 35 **Moraes, C. T., Sciacco, M., Ricci, E., Tengan, C. H., Hao, H., Bonilla, E., Schon, E. A. y DiMauro, S.** (1995). Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. *Muscle Nerve*, 3, S 150-3.
- 40 **Mullis y Falloona** *Methods Enzymol* 155, 335 1987.
- 40 **Nachman M W, Brown W M, Stoneking M, Aquardo C F**, *Genetics* 142: 53-963, 1996.
- 45 **National Cancer Institute of Canada**, Canadian cancer statistics 2000., *National Cancer Institute of Canada*, Toronto, Ont. 2000.
- 45 **Naviaux, R K.**, Mitochondrial Disease- Primary Care Physician's Guide. Psy-Ed. Corp D/B/A Exceptional Parents Guide: 3-10, 1997.
- 50 **Newton, C R y Graham, A.**, *Introduction to Biotechniques Series* 1997.
- 50 **Oefner P J, Underhill P A.**, *Current protocols in human genetics* 19, 7.10.1-12, 1998.
- 55 **Ozen M, et al**, *Prostate* 36: 264-271, 1998.
- 55 **Pang, C. Y., Lee, H. C., Yang, J. H. y Wei, Y. H.** (1994). Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. *Arch Biochem Biophys*, 312, 534-8.
- 60 **Parsons T J, et al.**, *Nature Genet*. 15 (4): 363-368, 1997.
- 60 **Pascucci, B., Versteegh, A., van Hoffen, A., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. y Dogliotti, E.** (1997). DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J Mol Biol*, 273, 417-27.
- 65 **Penta J S, Johnson F M, Wachsman J T, Copeland W C.**, *Mut. Res.* 488, 119-133, 2001.
- 65 **Polyak Y, et al.**, *Nature Genet*. 20 (3): 291-293, 1998.
- 65 **Ray A J, Pickersgill L, Turner R, Nikaido O, Rees J L, Birch-Machin M A.**, *J. Invest. Dermatol* 115(4): 674-679, 2000.
- 65 **Ray A J, Rees J L, Birch-Machin M A.**, *Brit. J. Dermatol.* 140: 788, 1999.

ES 2 354 452 T3

- Ray A J, Rees J L, Birch-Machin M A., *J. Invest. Dermatol.* 110: 692, 1998.
- Rees J L, Skin cancer. In: The Genetic Basis of Human Cancer, eds Vogelstein B, Kinzler K. Nueva York: McGraw-Hill, pág. 527-536, 1998.
- Rehman I, Quinn A J, Healy E, Rees J L. *Lancet* 344: 788-789, 1994.
- Rehman I, Takata M, Wu Y Y, Rees J L. *Oncogene* 12: 2483-2490, 1996.
- SAS Enterprise Mining Users Guide, SAS Inc., 2000.
- Sawyer, D. E. y Van Houten, B. (1999). Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res*, 434, 161-76.
- Schon, E. A., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Nakase, H., Zeviani, M. y DiMauro, S. (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 244, 346-9.
- Schurr T G, Ballinger S W, Gan Y, Hodge J A, Merriwether D A, Lawrence D N, Knowler W C, Weiss K M y Wallace D C., *Am. J. Hum. Genet.* 46: 613-623, 1990.
- Sciacco, M., Bonilla, E., Schon, E. A., DiMauro, S. y Moraes, C. T. (1994). Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet*, 3, 13-9.
- Seidman, M. D. et al., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 123: 1039-1045, 1997.
- Seo, Jinwook et al., Interactively optimizing signal-to-noise ratios in expression profiling: project-specific algorithm selection and detection p-value weighting in Affymetrix microarrays, *Bioinformatics*, Vol. 20, pág. 2534-2544, 2004a.
- Seo, Jinwook, et al., Interactive Color Mosaic and Dendrogram Displays for Signal/Noise Optimization in Microarray Data Analysis, IEEE International Conference on Multimedia and Expo 2003.
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, A Rank-by-Feature Framework for Interactive Exploration of Multidimensional Data, will appear in the journal, *Information Visualization*, 2005a. (pdf).
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, A Rank-by-Feature Framework for Unsupervised Multidimensional Data Exploration Using Low Dimensional Projections, *Proc. IEEE InfoVis* 2004b, pág. 65-72.
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Interactive Exploration of Multidimensional Microarray Data: Scatterplot Ordering, Gene Ontology Browser, and Profile Search, HCIL-2003-25, CS-TR-4486, UMIACS-TR-2003-55.
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Interactively Exploring Hierarchical Clustering Results, *IEEE Computer*, Volumen 35, Número 7, pág. 80-86, julio 2002. [borrador inicial (pdf)]
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Knowledge Integration Framework for Information Visualization, será publicado en LNCS por Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Nueva York, 2005b. (pdf).
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Understanding Clusters in Multidimensional Spaces: Making Meaning by Combining Insights from Coordinated Views of Domain Knowledge, *Technical Report*, HCIL-2004-03, 2004c.
- Severi, G. y English, D. J. (2004). Descriptive epidemiology of skin cancer. En Prevention of Skin Cancer, Hill, D., Elwood, J.M. y English, D.J. (eds), Vol. 3. pág. 73-88. Cancer Prevention - Cancer Causes. Kluwer Academic Publishers.
- Shankey T V, Jin J K, Dougherty S, Flanigan R C, Graham S, Pyle J M., *Cytometry* 21: 30-39, 1995.
- Shay J W, Werbin H., *Mutat. Res.* 186: 149, 1987.
- Sherrat E J, Thomas A W, Alcolado J C., *Clin. Sci.* 92: 225-235, 1997.
- Shoffner J M, Brown M D, Torroni A, Lott M T, Cabell M F, Mirra S S, Beal M F, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts R L, Juncos J L, Hansen L A, Crain B J, Fayad M, Reckford C L, y Wallace D C., *Genomics* 17: 171-184, 1993.
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Voljavec, A. S., Soueidan, S. A., Costigan, D. A. y Wallace, D. C. (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7952-6.

ES 2 354 452 T3

- Singh K. K. y Modica-Napolitano J. S. Expert reviews in molecular medicine. <http://www.ermm.cbcu.ac.uk> (2002.)
- Smith D G, Malhi R S, Eshleman J, Lorenz J G y Kaestle F A., *Am. J. Hum. Genet.* 110: 271-284, 1999.
- Smith R, Birch-Machin M A, Rees J L. *J. Invest. Dermatol.* 111: 101 -104, 1998.
- SpringNet - CE Connection: Screening, Diagnosis: Improving Primary Care Outcomes. Sitio web: <http://www.spring-net.com/ce/j803a.htm>
- Stone A C y Stoneking M. *Amer. J., Phys. Anthro.* 92(4): 463-471, 1993.
- Tamura S, et al. *Eur. J. Cancer [A]* 35 (2): 316-319, 1999.
- Tanaka, M. et al, 1996, *Automated sequencing of mtDNA, Methods Enzymol.* 264: 407-421.
- Taniike, M. et al., *BioChem BioPhys Res Comun,* 186: 47-53, 1992.
- Taylor R W, Birch-Machin M A, Bartlett K, Turnbull D M., *J Biol Chem,* 269, 3523-3528 1994.
- Tijssen, P. (ed) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization with Polynucleotide Probes, Elsevier, N.Y., 1993.
- Tori et al., Ageing-associated deletions of human diaphragmatic mitochondrial DNA, *AM. J. Respir. Cel. Mol. Biol.*, en imprenta 1992.
- Valnot, Isabelle, et al., A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency, *Human Genetics* (1999) 104: 460-466.
- Van De Graff, K M, Fox, S I. Concepts of Human Anatomy and Physiology., Dubuque: WM. C. Brown Publishers, 1995.
- Van den Bosch B J C, et al., *Nucleic Acids Res.* 28: 89, 2000.
- Von Wurmb, N, Oehmichen, M, Meissner, C., *Mutat Res.* 422: 247-254, 1998.
- Wald y Wallace, D. C., Mitochondrial Diseases in man and Mouse. *Science*, 5(283): 1482-1497, 1999.
- Wald, N J, Hackshaw, A K, Cigarette Smoking: an epidemiological overview. *Br Med Bull.* 52(1): 3-11, 1996.
- Wallace D C. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 91: 8739-8746, 1994.
- Wallace D C., *Annu Rev Biochem.* 61: 1175-1212, 1992.
- Wallace et al., Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy, *Science*, 1427-1429.
- Walsh P C, Partin A W. *Cancer* 80: 1871-1874, 1997.
- Ward 1993.
- Ward R H, Frazier B L, Dew-Jager K, Paabo S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8720-8724, 1991.
- Wei Y H. Proceedings of the Nat. Sci. *Council of the Republic of China* abril 22(2): 5567, 1998.
- Wei, Y. H., Pang, C. Y., You, B. J. y Lee, H. C. (1996). Tandem duplications and large-scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. *Ann NY Acad Sci*, 786, 82-101.
- Weinstock M A: En: JJ Stem RS, MacKie RM y Weinstock MA, Grob (eds) *Epidemiology*. Blackwell (UK). págs. 121-128, 1998.
- Wesson, K. M. y Silverberg, N. B. (2003). Sun protection education in the United States: what we know and what needs to be taught. *Cutis*, 71, 71-4, 77.
- Woodwell D A. National Ambulatory Medical Care Survey: 1997 Summary. Advance data from vital and health statistics; nº 305. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 1999.
- Wu y Wallace *Genomics*, 4: 560, 1989.

ES 2 354 452 T3

55 **Xu J, et al.**, *Nature Genet* 20: 175-179, 1998.

5 **Yamaguchi K T, et al.**, *Free Radical Res. Commun.* 16(3): 167-74, 1992.

10 **Yeh, J. J., et al.**, *Oncogene Journal*, 19: 2060-2066, 2000.

15 **Yen et al.**, Age-dependent 6 kb deletion in human liver mitochondrial DNA, *Biochem. Int.* 26, 457-468 1992.

20 **Yen et al.**, Ageing-associated 5kb deletion in human liver mitochondrial DNA, *Biochem., Biophys., Res. Common.*, 178, 124-131 1991.

25 **Zeviani M, et al.** *Am. J. Hum. Genet.* 47: 904-914, 1990.

30 **Zhang et al.**, Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual, *FEBS Lett.* 297, 34-38 1992.

35 **Zhang, C., et al.**, *BioChem. BioPhys. Res. Comun.*, 195: 1104-1110, 1993.

40 **Zhao, Po et al.**, In vivo filtering of *in vitro* MyoD target data: An approach for identification of biologically relevant novel downstream targets of transcription factors, *Comptes Rendus Biologies*, Vol. 326, Issues 10-11, octubre-noviembre 2003, págs. 1049-1065.

45 25

50 30

55 35

60 40

65 45

50 50

55 55

60 60

65 65

ES 2 354 452 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de detección de una delección que abarca aproximadamente los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt humano, en el que dicha delección está asociada con cáncer de próstata, en un sujeto que tiene ADNmt, que comprende:
 - (a) proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto; y
 - (b) detectar la presencia de la delección en el ADNmt.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la delección es de aproximadamente 3379 pb.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la delección comprende sustancialmente genes que codifican la subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa, la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa, la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, el ARNt de histidina, el ARNt de serina 2 y el ARNt de leucina 2.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de detectar la presencia de la delección en el ADNmt comprende un análisis de PCR seleccionado del grupo que consiste en análisis de PCR específico de delección, análisis de PCR radiactiva, análisis de PCR cuantitativa y PCR a tiempo real.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el análisis de PCR es PCR cuantitativa que comprende el uso de una ADN polimerasa Taq termoestable recombinante.
- 25 6. Uso de una matriz para diagnosticar el cáncer de próstata, comprendiendo la matriz una pluralidad de elementos de ácido nucleico y un sustrato sólido, en la que uno de los elementos de ácido nucleico está asociado con una delección en aproximadamente los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt humano, en la que el elemento de ácido nucleico tiene una posición única en dicha matriz y se asocia de forma estable con el sustrato sólido.
- 30 7. Uso de una delección de ADNmt que abarca aproximadamente los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt humano como biomarcador para el cáncer de próstata.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que la delección es de aproximadamente 3379 pb.
- 35 9. El uso de la reivindicación 7, en el que la delección se detecta en tejido maligno, tejido benigno adyacente, tejido benigno distante, lesiones precursoras, fluido de masaje de próstata, orina, orina post-DRE o sangre, en un sujeto que tiene cáncer de próstata o con progresión hacia cáncer de próstata, o un sujeto sin cáncer de próstata.
10. Un método para el mapeo tridimensional del tumor de próstata, que comprende:
 - (a) proporcionar una muestra obtenida de muestras de biopsia con aguja por sextantes; y
 - (b) detectar la ausencia o presencia de una delección que abarca aproximadamente los oligonucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt humano en cada una de las muestras por sextantes.
- 45 11. Uso de un kit para detectar una delección de ADNmt asociada con cáncer de próstata, comprendiendo el kit una matriz que incluye un elemento de ácido nucleico asociado con una delección en aproximadamente los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt humano, y al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en: una microplaca desechable, medios para sujetar la microplaca desechable, medios para la extracción de ADNmt, cebadores, reactivos e instrucciones.
- 50 12. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a la SEC ID N°: 139 como cebador directo.
- 55 13. El método de la reivindicación 1, en el que el método se usa para detectar cáncer de próstata, una predisposición a cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata.
14. Uso de un kit para detectar una delección de ADNmt asociada con cáncer de próstata, comprendiendo el kit:
 - (a) un tampón; y
 - (b) un cebador que tiene una secuencia correspondiente a la SEC ID N°: 139.

Espectro de Mutaciones del Cáncer de Próstata

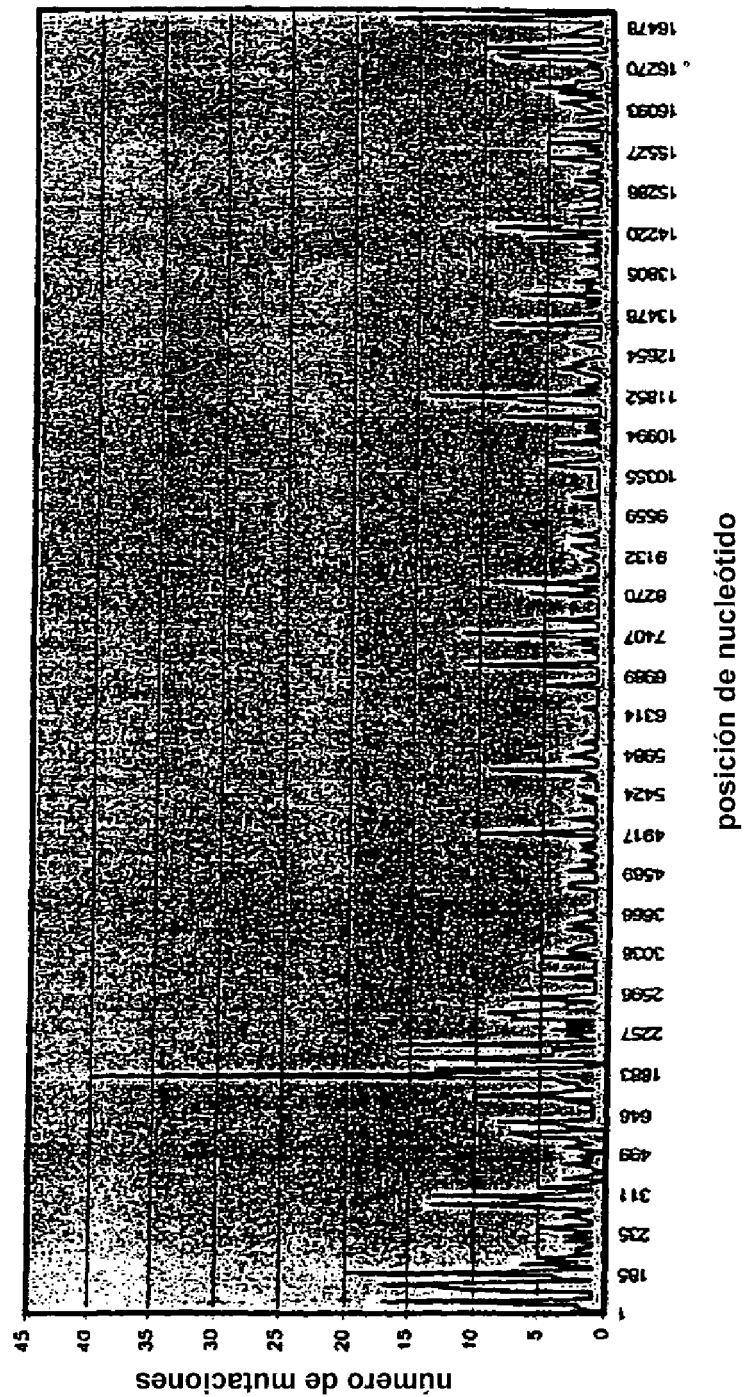


Figura 1

ES 2 354 452 T3

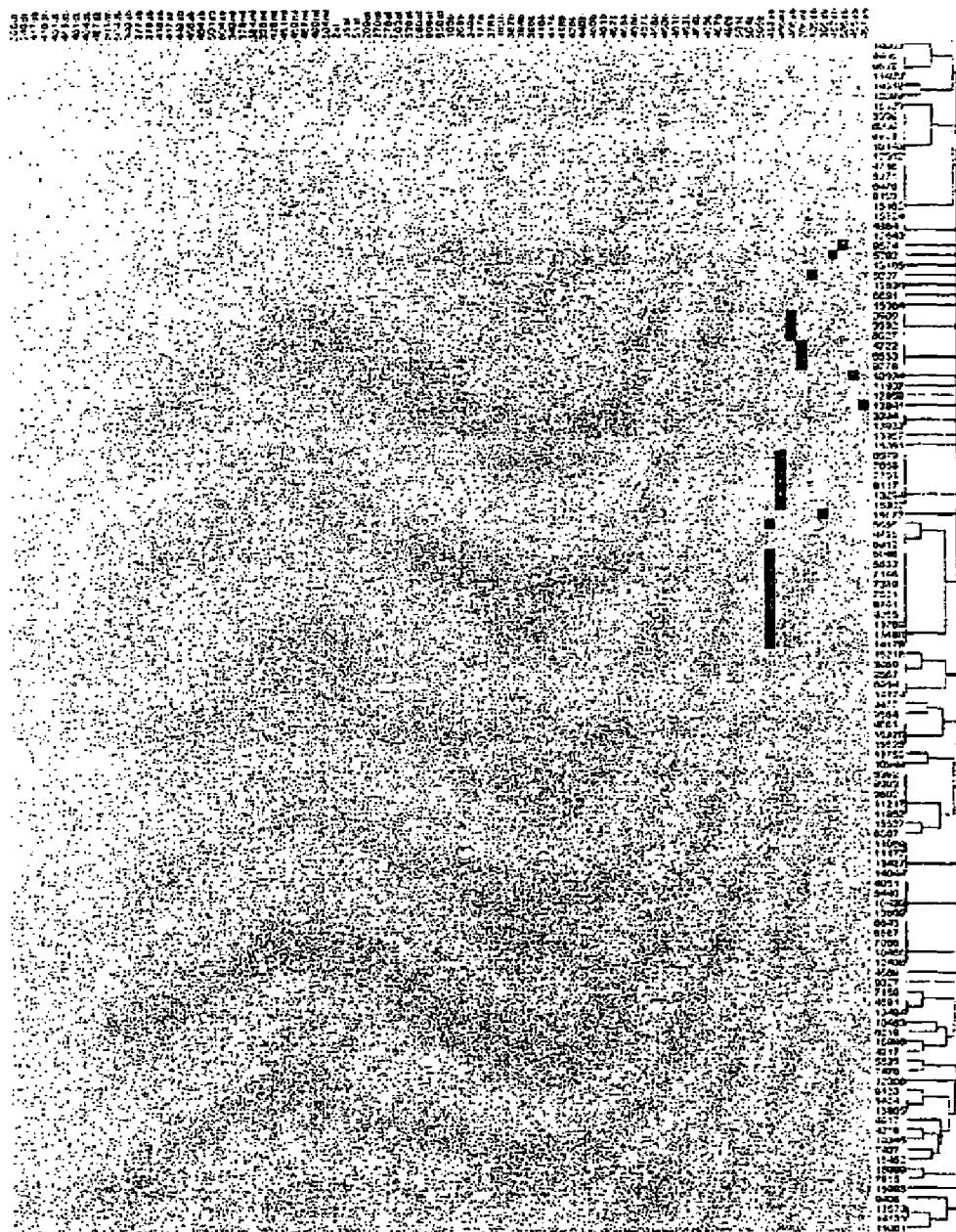


Figura 2

ES 2 354 452 T3

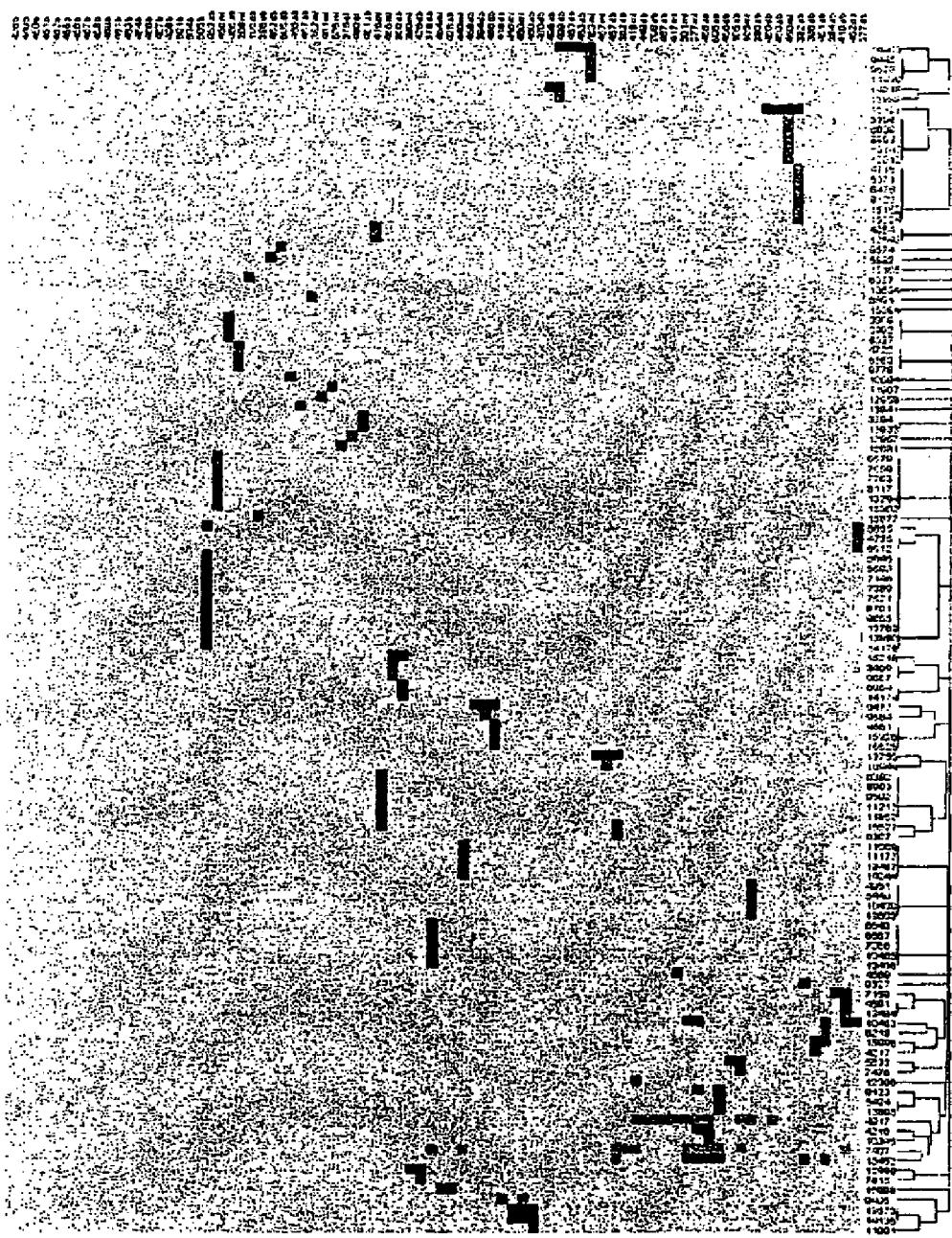


Figura 3

ES 2 354 452 T3

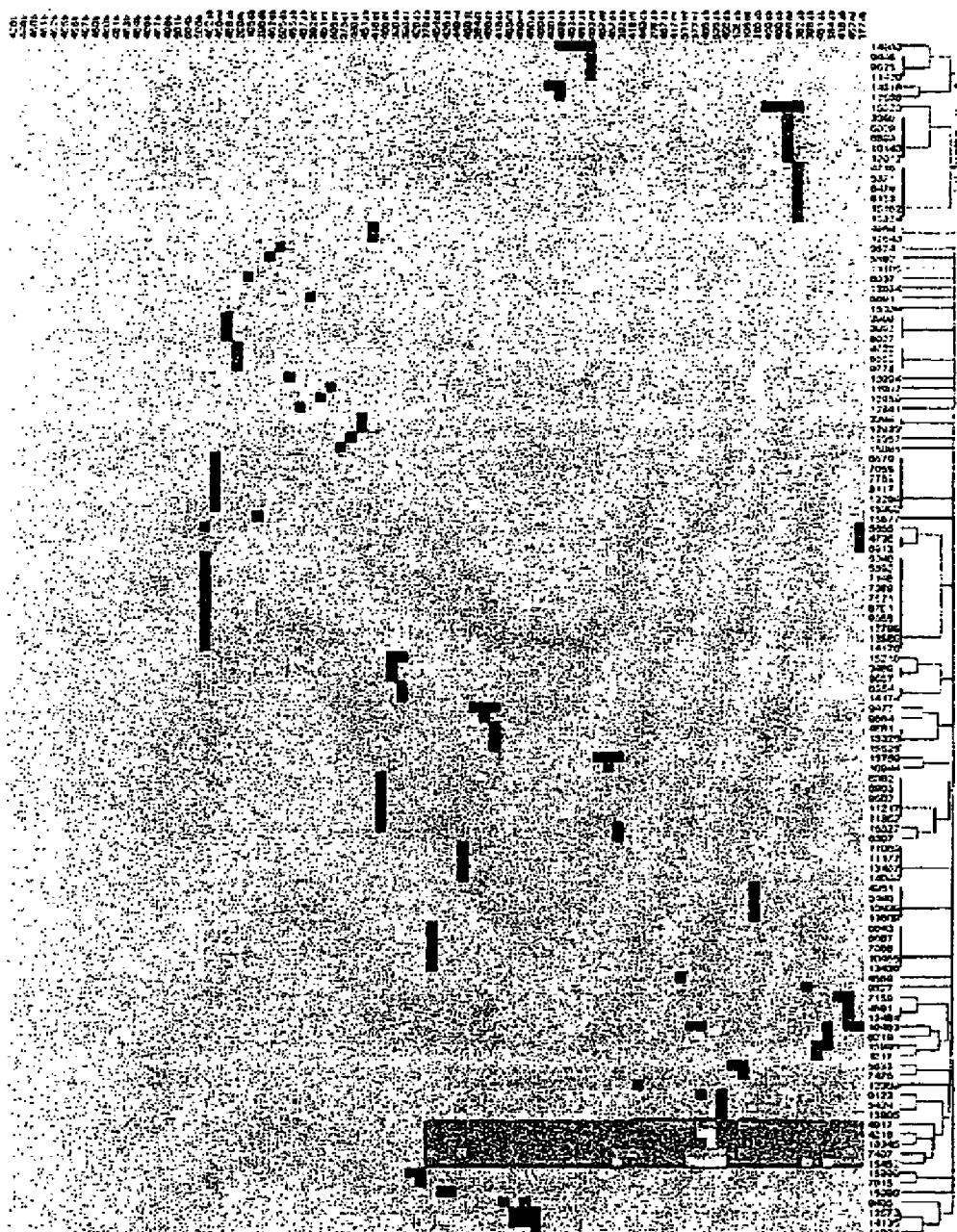


Figura 4

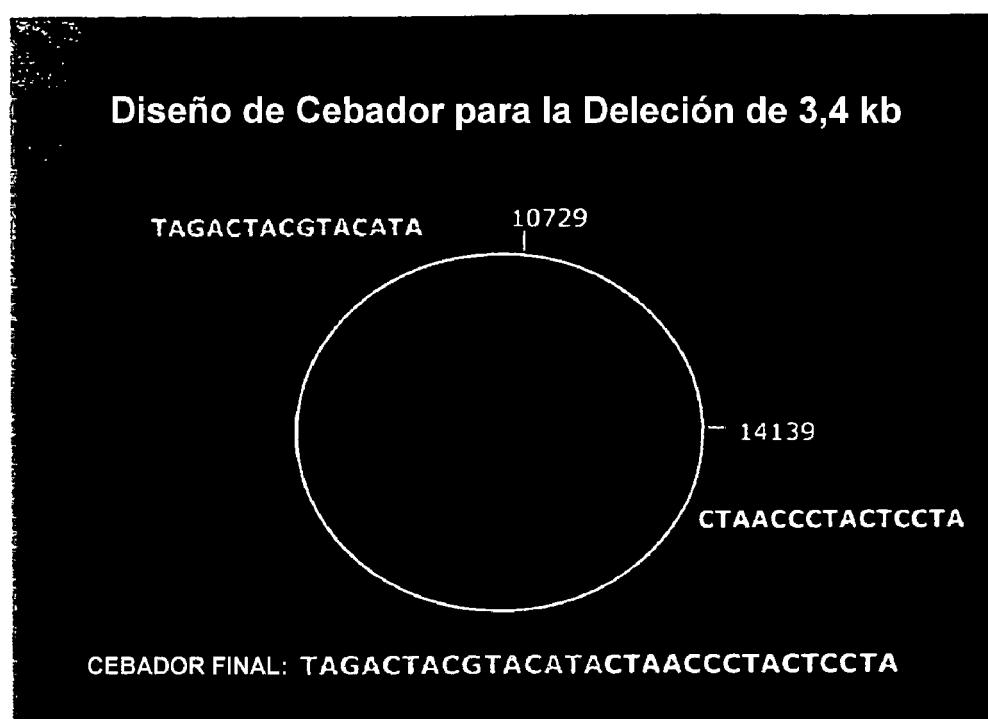


Figura 5

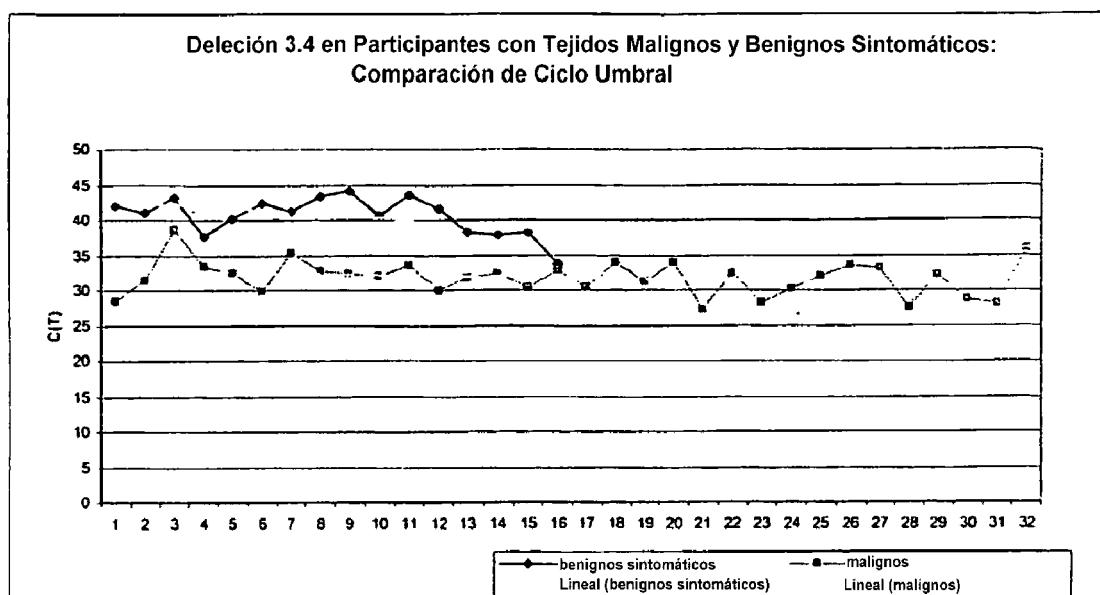


Figura 6

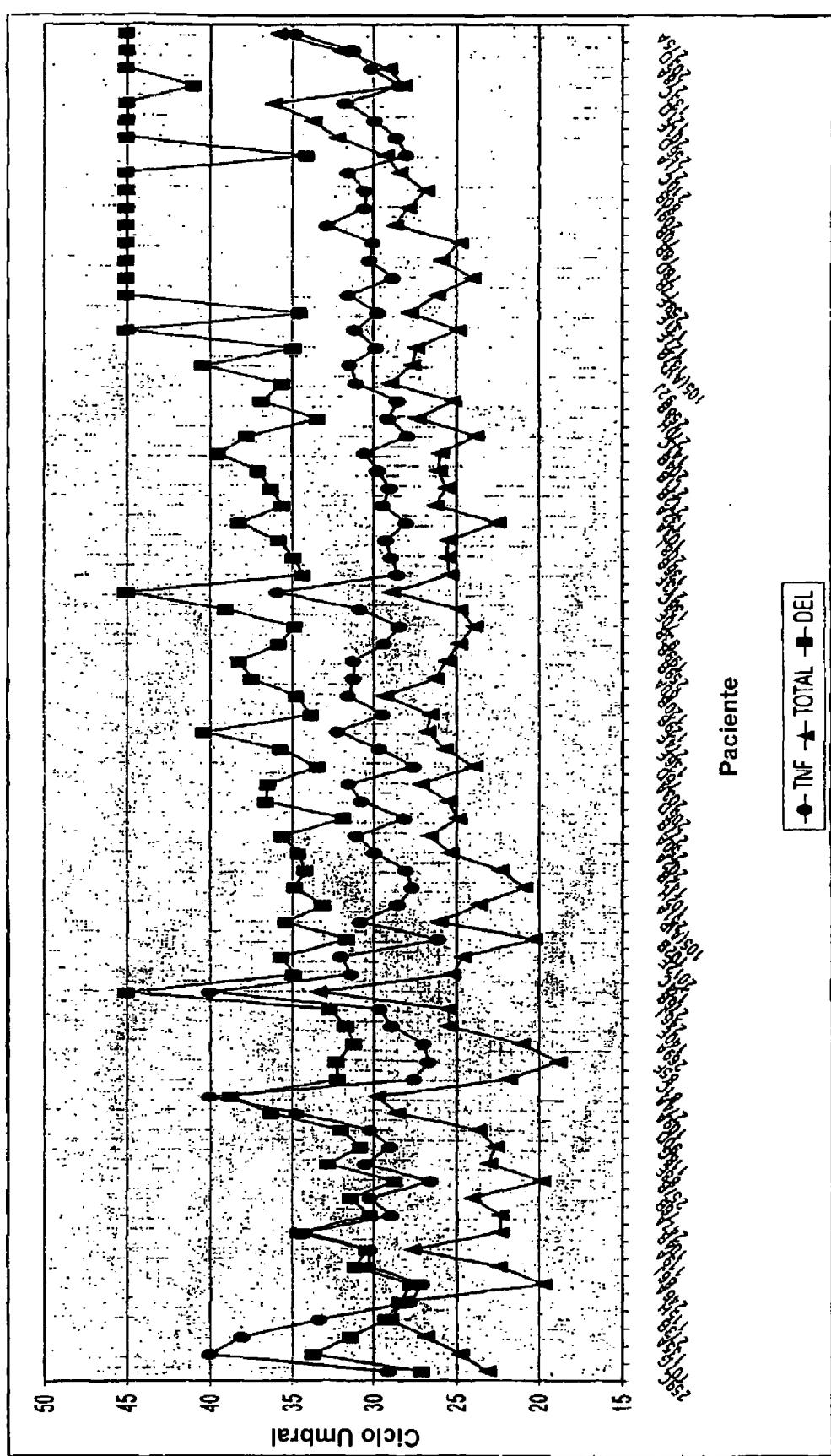


Figura 7

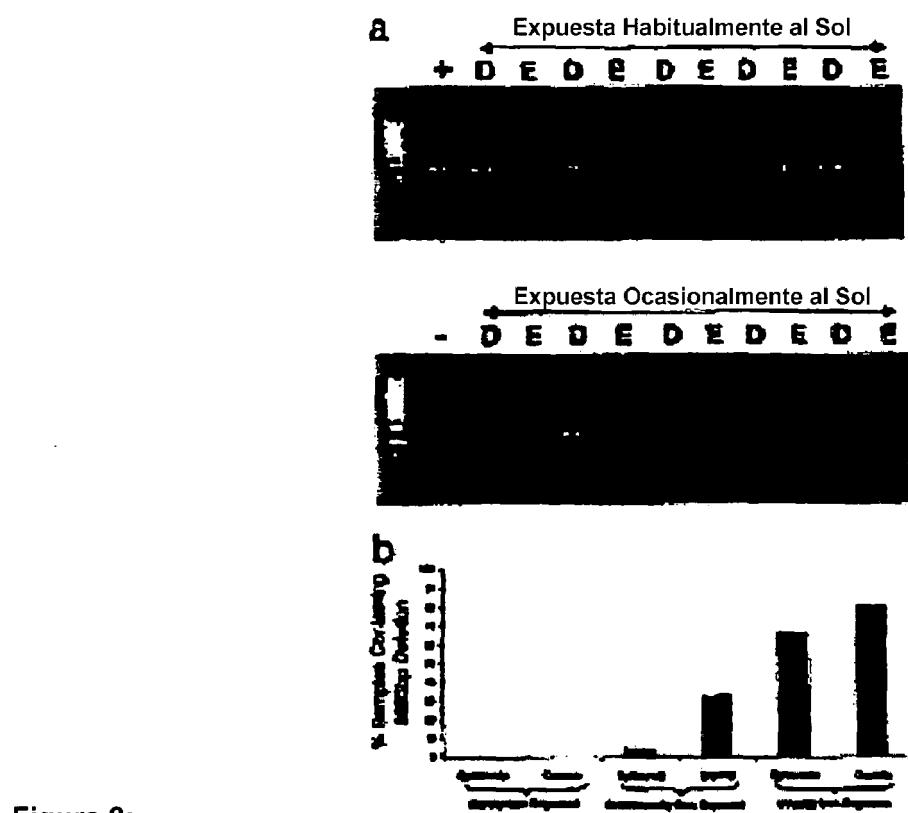


Figura 8:

ES 2 354 452 T3

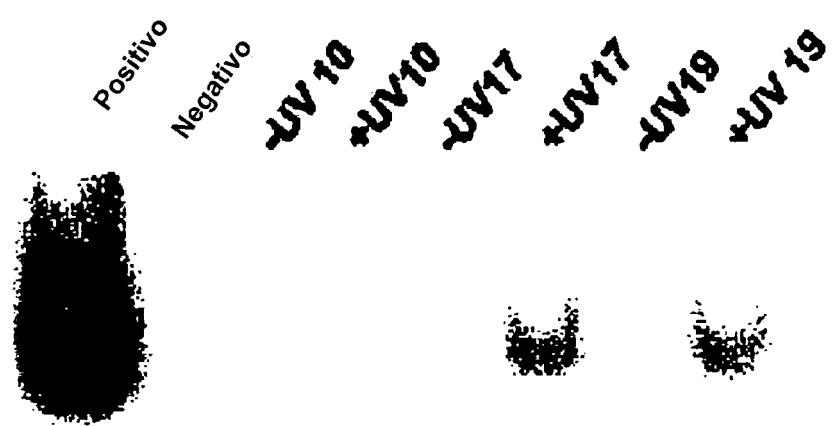


Figura 9:

ES 2 354 452 T3

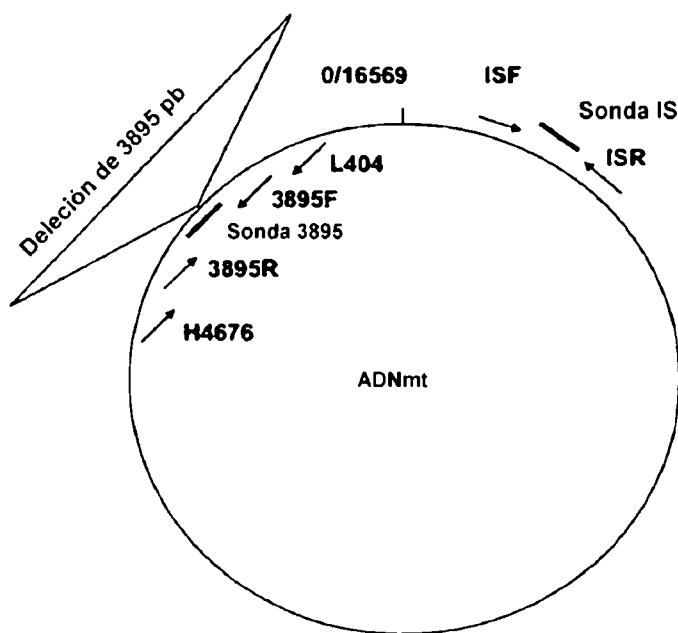


Figura 10

ES 2 354 452 T3

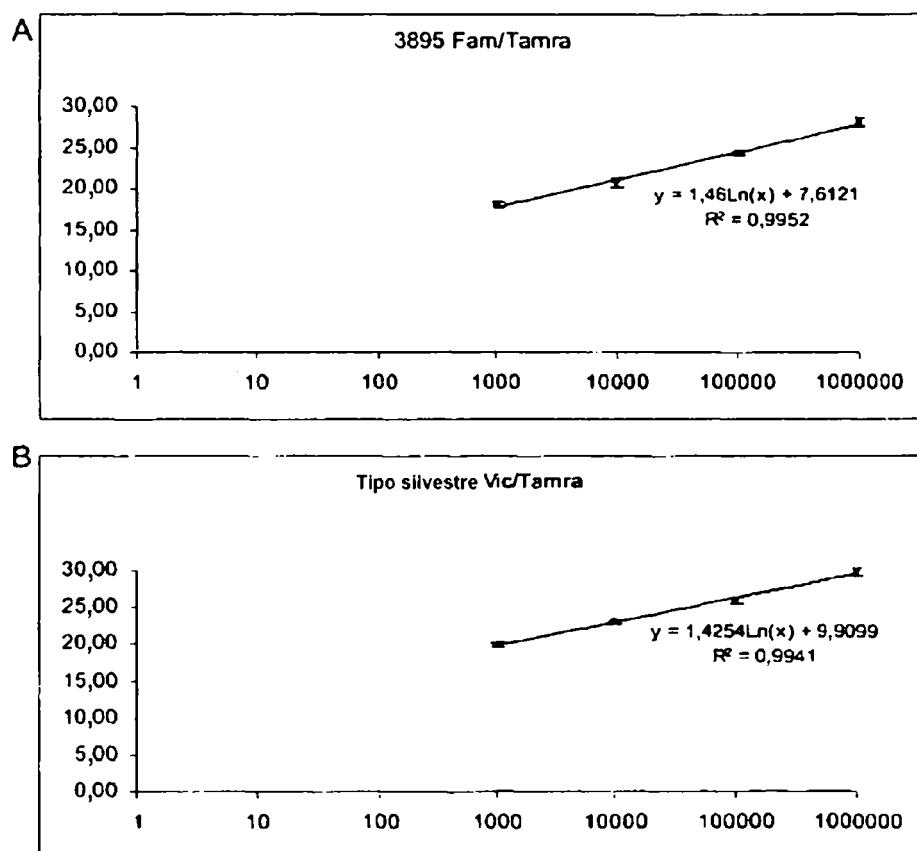


Figura 11

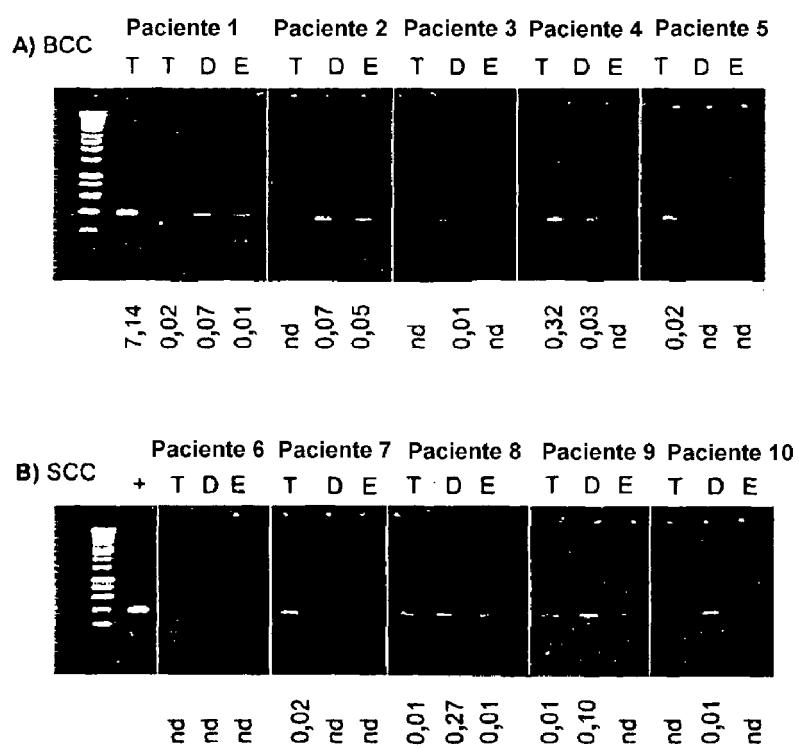
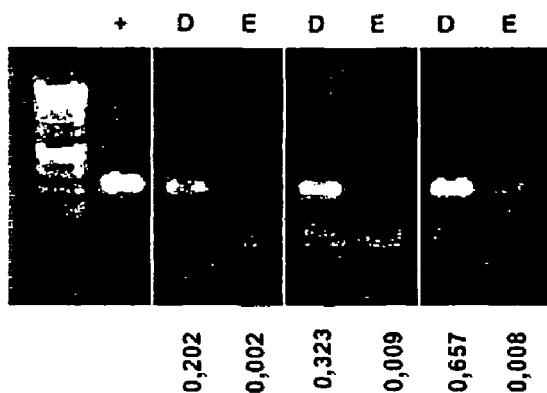


Figura 12

A) Expuesta Habitualmente al Sol



B) Expuesta Ocasionalmente al Sol

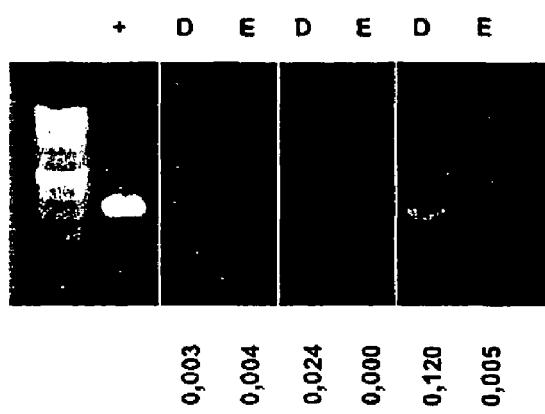


Figura 13

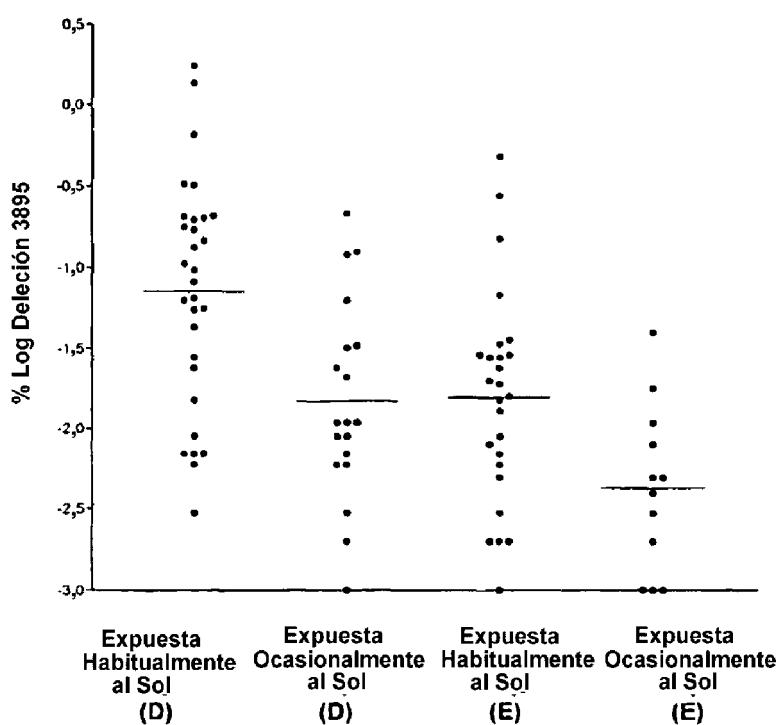


Figura 14

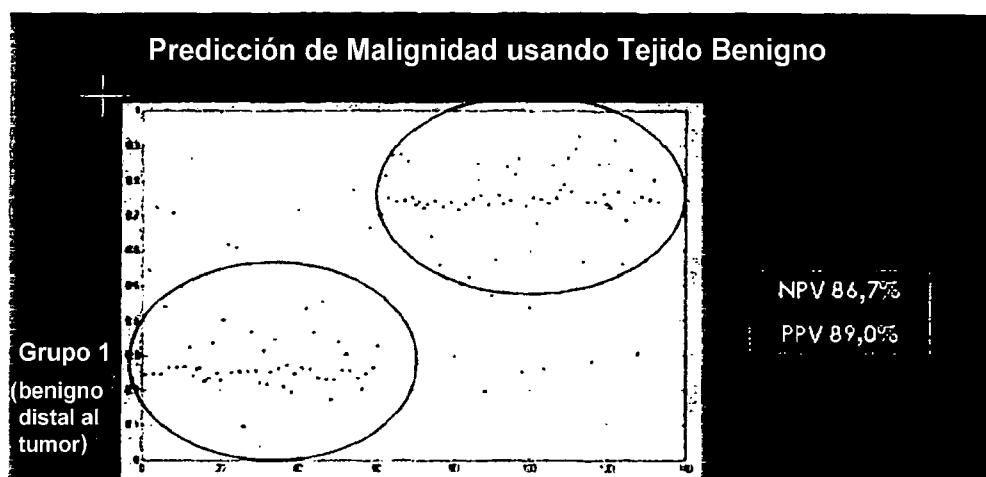


Figura 15