



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 433**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743564 .9**
96 Fecha de presentación : **23.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1649017**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Uso de la actividad PARP inhibidora de ARNI para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **25.07.2003 GB 0317466**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2011

73 Titular/es: **The University of Sheffield
Western Bank
Sheffield, South Yorkshire S10 2TN, GB**

72 Inventor/es: **Helleday, Thomas**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Uso de la actividad PARP inhibidora de ARNI para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

5 **[0001]** Esta invención se refiere al uso de un agente que inhibe la actividad de una enzima que media en la reparación de roturas en las cadenas de ADN para el tratamiento de algunas formas de cáncer, en particular el cáncer de mama.

10 **[0002]** La recombinación homóloga (RH) ha demostrado jugar un importante papel en la reparación del daño que se produce en las horquillas de replicación del ADN en células de mamíferos (2). De esta manera, las células deficientes en RH muestran un crecimiento retardado y presentan mayor nivel de inestabilidad genética. Se piensa que la inestabilidad genética debida a la pérdida de reparación de la RH en cánceres humanos contribuye significativamente al desarrollo del cáncer en estas células (1).

15 **[0003]** La modificación después de la transcripción de las proteínas nucleares mediante poli-ADP-ribosilación (PARP) en respuesta a las roturas en las cadenas de ADN desempeña un importante papel en la reparación del ADN, la regulación de la apoptosis, y el mantenimiento de la estabilidad genómica.

20 **[0004]** La poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP-1) es una proteína nuclear abundante en células de mamíferos que cataliza la formación de polímeros de poli-ADP-ribosa (PAR) usando NAD^+ como sustrato. Tras el daño del ADN, la PARP-1 se une rápidamente a una cadena de ADN (monocatenaria o bicatenaria) rota y cataliza la adición de cadenas de PAR cargadas negativamente a sí mismo (automodificación) y a otras proteínas (véase [3, 4] para revisiones). Se piensa que la unión de la PARP-1 a las roturas en las cadenas de ADN protege las lesiones del ADN de un procesamiento adicional hasta que la PARP-1 se disocia de la cadena rota por la carga negativa acumulada resultante de los polímeros PAR (5,6).

30 **[0005]** Aunque se ha involucrado a la PARP-1 en algunos procesos nucleares, tales como la modulación de la estructura de la cromatina, la replicación del ADN, la reparación y la transcripción del ADN, los ratones con PARP-1 inactivada se desarrollan normalmente (7). Las células aisladas de estos ratones presentan un fenotipo de hiperrecombinación e inestabilidad genética en la forma de niveles crecientes de SCE, micronúcleos y tetraploidía (8-10). Se puede producir también inestabilidad genética en estos ratones con PARP-1 inactivada mediante acortamiento telomérico, frecuencia creciente de fusión cromosómica y aneuploidía (11), aunque todos estos resultados no se podrían repetir en otro lote de ratones con PARP-1 inactivada (12). En los ratones inactivados anteriores, la mutación null de PARP-1 rescata la recombinación V(D)J desequilibrada en ratones SCID (13). Estos resultados apoyan la opinión sugerida por Lindahl y colaboradores de que la PARP-1 tiene un papel protector frente a la recombinación (5). Estos autores propusieron que la unión de la PARP-1 a las roturas en las cadenas de ADN evita que la maquinaria de recombinación reconozca y procese lesiones de ADN o, alternatively, que las cargas negativas acumuladas tras la poli-ADP-ribosilación repelan las secuencias de ADN recombinogénicas adyacentes. Solo el último modelo es consistente con la propia inhibición de la PARP-1 y la expresión de un mutante PARP-1 negativo dominante, induciendo SCE, la amplificación génica y la recombinación homóloga (RH [14-18]).

45 **[0006]** Los estudios basados en el tratamiento de células con inhibidores de la PARP o de células derivadas de ratones con PARP-1 o PARP-2 inactivados indica que la supresión de la actividad de la PARP-1 aumenta la susceptibilidad celular a los agentes que dañan el ADN e inhibe la reunión de la cadena rota (3,4, 8-11, 19, 20, 47).

50 **[0007]** Se han usado inhibidores de la actividad de la PARP-1 en combinación con agentes anticancerosos tradicionales, tales como radioterapia y quimioterapia (21). Se usaron los inhibidores en combinación con agentes metilantes, venenos de la topoisomerasa y radiaciones ionizantes y se encontró que potenciaban la efectividad de estas formas de tratamiento. Se sabe, sin embargo, que dichos tratamientos producen daño y muerte de las células no cancerosas o "sanas" y están asociados con efectos secundarios desagradables.

55 **[0008]** Existe por tanto una necesidad de tratamiento del cáncer que sea eficaz y selectivo al mismo tiempo en la eliminación de células cancerosas y que no necesite administrarse en combinación con tratamientos de radioterapia o quimioterapia.

60 **[0009]** Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que las células deficientes en la recombinación homóloga (RH) son hipersensibles a los inhibidores de la PARP en comparación con las células naturales. Esto es sorprendente debido a que los ratones con PARP-1 inactivada viven de manera normal indicando de este modo que la PARP-1 no es esencial para la vida. De esta manera, no se esperaría que dichas células fueran sensibles a la inhibición de la PARP.

[0010] De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un agente que inhibe la

actividad de una enzima que media en la reparación de roturas de las cadenas de ADN en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que están producidas por un defecto genético en un gen que media en la recombinación homóloga.

[0011] En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o dolencia en un mamífero, que incluye un ser humano, que está producida por un defecto genético en un gen que media en la recombinación homóloga, dicho procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la actividad de una enzima que media en la reparación de cadenas de roturas en el ADN u otras lesiones presentes en las horquillas de replicación.

[0012] En un aspecto preferido, dicha enzima es la PARP. En un aspecto preferido adicional dicho agente es un inhibidor de la PARP o una molécula de ARNi específica del gen PARP.

[0013] En un aspecto preferido adicional, el uso es en el tratamiento del cáncer.

[0014] Preferiblemente, el medicamento es una composición farmacéutica constituida por el inhibidor de la PARP en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0015] La sensibilidad específica de tumores defectivos en la RH respecto de la inhibición de la PARP-1 significa que las células que se encuentran normalmente en división en el paciente no se verán afectadas por el tratamiento. El tratamiento de las células cancerosas defectivas en la RH que usan un inhibidor de la PARP tiene también la ventaja de que no necesita administrarse como una terapia de combinación junto con los tratamientos de radioterapia o quimioterapia convencionales, evitando por tanto los efectos secundarios asociados con estas formas convencionales de tratamiento.

[0016] Un defecto genético en un gen que media en la recombinación homóloga puede ser debido a una mutación en, la ausencia de, o la expresión defectiva de, un gen que codifica una proteína implicada en la RH.

[0017] En un aspecto adicional, la invención proporciona además el uso de un inhibidor de la PARP en la fabricación de un medicamento para inducir la apoptosis en células defectivas en la RH.

[0018] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inducir la apoptosis en células defectivas en la RH en un mamífero, cuyo procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la PARP.

[0019] Al producir la apoptosis en células defectivas en la RH debería ser posible reducir o detener el crecimiento de un tumor en el mamífero.

[0020] Preferiblemente, las células defectivas en la RH son células cancerosas.

[0021] Las células cancerosas defectivas en la RH pueden ser parcial o totalmente deficientes en la RH. Preferiblemente, las células cancerosas son totalmente deficientes en la RH.

[0022] El término "cáncer" o "tumor" incluye cáncer de pulmón, de colon, de páncreas, gástrico, de ovarios, de cuello de útero o de próstata. El cáncer puede incluir también cáncer de piel, de riñón, de hígado, de vejiga o cerebral. En un aspecto preferido, el cáncer es en un mamífero, preferiblemente un ser humano.

[0023] El cáncer que se va a tratar puede ser una forma heredada de cáncer en la que el paciente que se va a tratar tiene una predisposición familiar al cáncer. Preferiblemente, el cáncer que se va a tratar es un cáncer hereditario vinculado a genes. En una realización preferida de la invención, el cáncer es un cáncer de mama hereditario vinculado a genes.

[0024] En un aspecto preferido, el inhibidor de la PARP es útil en el tratamiento de células cancerosas defectivas en la expresión de un gen implicado en la RH. Los genes con función sugerida sobre la RH incluyen XRCC1, ADPRT (PARP-1), ADPRTL2 (PARP-2), CTPS, RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD52, RAD54, RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR, chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, RAD9, FEN-1, Mus81, Eme1, DDS1, BARD (véanse (2, 3, 5, 22-28) para las revisiones).

[0025] Un gen implicado en la RH puede ser un gen supresor del tumor. La invención proporciona de esta manera el tratamiento de células cancerosas defectivas en la expresión de un gen supresor del tumor. Preferiblemente, el gen supresor del tumor es BRCA1 o BRCA2.

[0026] El cáncer de mama es la dolencia cancerosa más común entre mujeres en el mundo occidental en la actualidad. Algunas familias tienen una fuerte predisposición al cáncer de mama, que se debe a menudo a una mutación heredada en un alelo de cualquiera de BRCA1 o BRCA2. Sin embargo, estos pacientes siguen manteniendo un alelo funcional. De esta manera, estas pacientes se desarrollan normalmente y no tienen consecuencias fenotípicas de esta mutación. Sin embargo, en una célula, puede perderse el alelo funcional, convirtiendo esta célula en cancerosa y al mismo tiempo deficiente en la recombinación homóloga (RH). Esta etapa es crítica para el inicio de un tumor (1).

[0027] Los presentes inventores han encontrado de manera sorprendente que las células deficientes en BRCA2 son 100 veces más sensibles a la citotoxicidad del inhibidor de la PARP, NU1025, que las células naturales.

[0028] De esta manera, en un aspecto preferido, la invención proporciona el uso de un inhibidor de la PARP en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células cancerosas defectivas en la RH, debido, por ejemplo a la pérdida de expresión de BRCA1 y/o BRCA2.

[0029] Las células cancerosas que se van a tratar pueden ser parcial o totalmente deficientes en la expresión de BRCA1 o BRCA2. Se pueden identificar mutaciones de BRCA1 y BRCA2 usando técnicas de PCR multiplex, técnicas de matriz (29,30) o usando otros cribados conocidos de la persona experta.

[0030] Se pueden seleccionar inhibidores de la PARP útiles en la presente invención a partir de inhibidores de PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, tanquirasa 1 o tanquirasa 2 (véase 31 para una revisión). En una realización preferida, el inhibidor de PARP útil en la presente invención es un inhibidor de la actividad de PARP-1

[0031] Los inhibidores de la PARP útiles en la presente invención incluyen bencimidazol-carboxamidas quinazolin-4-[3H]-onas y derivados de isoquinolina (por ejemplo, 2-(4-hidroxifenil)bencimidazol-4-carboxamida (NU1085), 8-hidroxi-2-metilquinazolin-4-[3H]ona (NU1025); 6(5H)fenantridinona; 3 aminobenzamida; bencimidazol-4-carboxamidas (BZ1-6) e indoles de lactamas tricíclicas (T11-5) [32]. Se pueden identificar inhibidores adicionales de PARP ya sea mediante diseño [33] ya sea mediante el novedoso ensayo FlashPlate [34]

[0032] Se puede administrar el inhibidor de la PARP formulado como composición farmacéutica de cualquier manera conveniente eficaz efectiva para dirigir células cancerosas incluyendo, por ejemplo, administración por rutas intravenosa, intramuscular, intradérmica, intranasal, tópica, entre otras. Los vehículos o diluyentes útiles en la composición farmacéutica pueden incluir, pero no limitarse a disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y sus combinaciones.

[0033] En terapia o como profiláctico, se puede administrar el principio activo a un individuo en forma de una composición inyectable, por ejemplo como una dispersión acuosa estéril. Se puede administrar el inhibidor directamente a un tumor o se puede dirigir al tumor mediante administración sistémica.

[0034] Una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidor es normalmente una que es suficiente para conseguir el efecto deseado y puede variar de acuerdo con la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o dolencia, y de la potencia del inhibidor. Se apreciará que se pueden emplear diferentes concentraciones para la profilaxis y para el tratamiento de una enfermedad activa.

[0035] Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que el nivel de dosificación diaria del principio activo será de hasta 100 mg/kg, por ejemplo de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal, normalmente hasta 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 15, 20 o 30 mg/kg de peso corporal. En última instancia, sin embargo, la cantidad de inhibidor administrada y la frecuencia de administración será a discreción de un médico.

[0036] Una ventaja terapéutica de usar inhibidores de la PARP para tratar células cancerosas es que se necesitan solo muy pocas dosis para tener un efecto terapéutico en el tratamiento del cáncer reduciendo, por tanto, la acumulación sistémica de los inhibidores y cualquier efecto tóxico asociado.

[0037] Un aspecto preferido de la invención proporciona un agente que es una molécula de ARN inhibidor (ARNi).

[0038] Una técnica para extirpar específicamente la función génica es a través de la introducción de ARN bicatenario, denominado también como ARN inhibidor (ARNi), en una célula, lo que da como resultado la destrucción del ARNm complementario a la secuencia incluido en la molécula de ARNi. La molécula de ARNi comprende dos cadenas complementarias de ARN (una cadena de sentido directo y una cadena de sentido contrario) hibridadas entre sí para formar una molécula de ARN bicatenario. La molécula de ARNi se deriva normalmente de la secuencia exónica o de codificación del gen que se va a extirpar.

[0039] Preferiblemente, dicha molécula de ARNi se deriva de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo constituido por:

- a) una secuencia de ácido nucleico como la secuencia representada por la secuencia en la Figura 9, 10, 11, 12, 13 o 14 o uno de sus fragmentos;
- b) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con las secuencias de ácido nucleico de la Figura 9, 10, 11, 12, 13 o 14 y que codifica un gen de PARP;
- c) una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencias que están degeneradas como resultado del código genético de las secuencias de ácido nucleico definidas en (a) y (b).

[0040] Recientes estudios sugieren que las moléculas de ARNi que oscilan entre 100-1000 pb derivados de la secuencia de codificación son inhibidores eficaces de la expresión génica. De manera sorprendente, solo se requieren unas pocas moléculas de ARNi para bloquear la expresión génica, lo que implica que el mecanismo es catalítico. El sitio de acción parece ser nuclear ya que apenas se detecta ARNi en el citoplasma de las células, lo que indica que el ARNi ejerce su efecto durante la síntesis o el procesamiento del ARNm.

[0041] Más preferiblemente, dicha molécula de ARNi, de acuerdo con lo anterior, tiene una longitud de entre 10 bases de nucleótidos (bn) – 1000bn. Incluso más preferiblemente, dicha molécula de ARNi tiene una longitud de 10bn; 20bn; 30bn; 40bn; 50bn; 60bn; 70bn; 80bn; 90bn; o 100pb. Incluso de manera aún más preferible, dicha molécula de ARNi tiene 21bnu de longitud.

[0042] Incluso de manera aún más preferible, la molécula de ARNi comprende la secuencia de ácido nucleico aaa agc cau ggu gga gua uga (PARP-1)

[0043] Incluso de manera aún más preferible, la molécula de ARNi está constituida por la secuencia de ácido nucleico aag acc aa uuc ucc agu uca ac (PARP-2)

[0044] Incluso de manera aún más preferible, la molécula de ARNi está constituida por la secuencia de ácido nucleico aag acc aac auc gag aac aac (PARP-3)

[0045] La molécula de ARNi puede comprender bases de nucleótidos modificados

[0046] Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno del resto de los aspectos *cambiando lo que haya que cambiar*.

[0047] La presente invención se describirá ahora por medio de ejemplos solo con referencia a las figuras que la acompañan, en las que:

La Figura 1 es una gráfica que demuestra que las células deficientes en la RH son hipersensibles al efecto tóxico producido por la inhibición de la PARP-1. Crecimiento de colonias de líneas de células AA8 de hámster chino (tipo natural) irs1SF (deficiente en RH[4]), CXR3 (irs1SF complementado con XRCC3 [2]), V79 (natural), irs1 (deficiente en RH[5]) o irs1X2.2 (irs1 complementado con XRCC2 [1]) tras exposición a 3-AB (A), ISQ (B) o NU1025 (C). Se muestran los promedios (símbolos) y las desviaciones estándar de al menos tres experimentos. Se usó el ensayo del crecimiento de colonias;

La Figura 2 es una gráfica que muestra la supervivencia celular en presencia del inhibidor de la PARP NU1025 en células V79 naturales, células VC-8 deficientes en BRCA2 y células VC-8 complementadas con el gen BRCA2 funcional (VC-8 nº 13, VC-8+B2). Se usó el ensayo de crecimiento de colonias;

La Figura 3 es un histograma que muestra el porcentaje de las células en apoptosis tras 72 horas de incubación con NU1025;

Figura 4. (a) Análisis de transferencia Western de lisados de proteínas aislados de células de cáncer de mama MCF-7 (p53^{nat}) o MDA-MB-231 (p53^{mut}) después de 48 horas de la transfección con ARNi. (b) Crecimiento de colonias de células MCF-7 tratadas con ARNi o (c) células MDA-MB-231 tras exposición al inhibidor de la PARP NU1025. Se muestran los promedios (símbolos) y las desviaciones estándar (barras) de al menos tres experimentos.

Figura 5. Células deficientes en BRCA2 fracasan en la reparación de una lesión de recombinación formada en las horquillas de replicación por inhibidores de la PARP. (a) Visualización de las roturas en las cadenas bicatenarias (DSB) en células proficientes o deficientes en BRCA2 después de un tratamiento de 24 horas con

NU1025 (0,1 mM) mediante electroforesis en gel con campo pulsante. Se usó hidroxurea 2 mM como control positivo. (b) visualización de focos de γ H2Ax en células V-C8+B2 y V-C8 sin tratar. Numerosas células que contenían focos de γ H2Ax (c) o focos RAD51 (d) visualizados en células V-C8+B2 y V-C8 después de un tratamiento de 24 horas con NU1025 (10 μ M). Se muestran los promedios (símbolos) y los errores estándar (barras) de tres a nueve experimentos. (e) Un modelo sugerido de muerte celular inducida en células deficientes en BDCA2.

Figura 6. Es importante en la PARP-1, y no en la PARP-2, evitar la formación de una lesión recombinogénica, productora de muerte en ausencia de BDCA2. (a) RT-PCR en ARN aislado de células SW480SN.3 tratadas con ARNip de BRCA2, PARP-1 y PARP-2 en combinaciones tal como se muestra durante 48 horas. (b) Supervivencia clonogénica después de 48 horas del agotamiento de BRCA2, PARP-1 y PARP-2. Se muestran los promedios (símbolos) y las desviaciones estándar (barras) de al menos tres experimentos. Dos y tres estrellas designan la significancia estadística en el test de la t $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente. (c) Transferencia Western de PARP-1 en células SW480SN.3 tratadas con diferentes ARNip.

Figura 7. (a) Visualización de polímeros PAR en células V79 sin tratar y (b) tratadas con timidina (5 mM durante 24 horas). (c) Porcentaje de células que contienen >10 sitios de actividad de la PARP tras el tratamiento con hidroxurea (0,2 mM) y timidina (5 mM). Se contaron al menos 300 núcleos para cada tratamiento y experimento. (d) Supervivencia de células V-C8+B2 tras el tratamiento simultáneo con hidroxurea o (e) timidina y NU1025 (10 μ M). (f) Se midió la actividad de la PARP por el nivel de NAD(P)H ¹¹ libre, tras el tratamiento con MMS, hidroxurea (0,5 mM) o timidina (10 mM). Se representan gráficamente los promedios (símbolos) y las desviaciones estándar (barras de errores) de al menos tres experimentos.

Figura 8. (a) Visualización de polímeros PAR en células V-C8 y (b) V-C8+B2 sin tratar. (c) Cuantificación del porcentaje de células que contienen >10 sitios de actividad de PARP en células V-C8 y V-C8+B2 sin tratar. (d) Nivel de NAD(P)H medido en células V-C8 y V-C8+B2 sin tratar. Tres estrellas designan $p < 0,001$ en el test de la t. (e) Visualización de RAD51 y de sitios de actividad de la PARP en células V79 después de 24 horas de tratamiento con timidina (5 mM). (f) Un modelo del papel de la PARP y la RH en las horquillas de replicación atascadas.

La Figura 9 es la secuencia del ADNc humano de la PARP-1;

La Figura 10 es la secuencia del ADNc humano de la PARP-2;

La Figura 11 es la secuencia del ADNc humano de la PARP-3;

La Figura 12 es la secuencia del ADNg de la Tanquirasa 1;

La Figura 13 es la secuencia del ARNm humano de la Tanquirasa 2;

La Figura 14 es la secuencia del ARNm de la VPARP.

Materiales y procedimientos

Citotoxicidad de los inhibidores de PARP en células defectivas en la RH: XRCC2, XRCC3 o BRCA2

Cultivo celular

[0048] Las líneas celulares irs1, irs1X2.1 y V79-4 fueron una donación de John Thacker [40] y Larry Thompson [41] proporcionó las líneas celulares AA8, irs1SF y CXR3.

[0049] Las líneas celulares VC-8, VC-8+B2, VC-8 n° 13 fueron un regalo de Malgorzata Zdzienicka [42]. Todas las líneas celulares en este estudio se hicieron crecer en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero fetal de bovino al 10% (100 U/ml) y sulfato de estreptomycin (100 μ g/ml) a 37°C en una atmósfera que contiene CO₂ al 5%.

Ensayo de toxicidad – ensayo de crecimiento de colonias

[0050] Se plaquearon 500 células suspendidas en medio en una placa Petri 4 horas antes de la adición de 3-AB, ISQ o NU1025. Se disolvieron ISQ y NU1025 en DMSO a una concentración final de 0,2% en medio de tratamiento. 7 – 12 días después, cuando se observaron las colonias, se fijaron y tiñeron estas colonias con azul de metileno en metanol (4 g/l). Posteriormente. Se contaron las colonias constituidas por más de 50 células.

Experimentos de apoptosis

[0051] Se plaquearon $0,25 \times 10^6$ células en placas Petri y se hicieron crecer durante 4 horas antes del tratamiento con NU1025. Después de 72 horas, se tripsinizaron las células y se volvieron a suspender con medio que contenía algunas células flotantes procedentes de la muestra. Se aglomeraron las células mediante centrifugación y se volvieron a suspender para el análisis de la apoptosis con anexina-V conjugada con FTTC y yoduro de propidio (PI) (ApoTarget, Biosource International) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (Becton-Dickinson FACSsort, láser de 488 nm), y se determinó el porcentaje de células apoptóticas por la fracción de células vivas (PI-negativas) unidas con anexina-V conjugada con FITC.

Inmunofluorescencia

[0052] Se plaquearon las células en cubres 4 h antes de los tratamientos de 24 h según se ha indicado. Tras los tratamientos, se retiró el medio y se enjuagaron los cubres una vez en PBS a 37°C y se fijaron según se ha descrito en muchas partes [2]. Los anticuerpos primarios y las diluciones usadas en este estudio fueron anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra PAR (Trevigen; 1:500), anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra Rad51 (C-20, Santa Cruz; 1:200) y anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra Rad51 (H-92, Santa Cruz; 1:1000). Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpo de cabra conjugado con Cy-3 dirigido contra IgG de conejo (Zymed; 1:500), anticuerpo de cabra conjugado con Alexa 555 dirigido contra IgG F(ab')₂ de conejo (Molecular Probes; 1:500), anticuerpo de burro conjugado con Alexa 546 dirigido contra IgG de cabra (Molecular Probes; 1:500), anticuerpo de burro conjugado con Alexa 488 dirigido contra IgG de conejo (Molecular Probes; 1:500). Se diluyeron los anticuerpos en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 3%. Se tiñó el ADN con 1 µg/ml de ToPro (Molecular Probes). Se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 usando un objetivo de inmersión en aceite planapocromático 63X/NA 1.4 y longitudes de onda de excitación de 488, 546 y 630 nm. Se adquirieron las imágenes a través de un objetivo de proyección máxima de secciones ópticas separadas de 0,50 µm y con un espesor de sección de 1,0 µm. Se procesaron las imágenes usando Adobe PhotoShop (Abacus Inc). Se contaron al menos 300 núcleos en cada porta y los que contenían más de 10 focos RAD51 o sitios de actividad de PARP se clasificaron como positivos.

Ensayos de actividad de la PARP

[0053] Se usó una sal de tetrazolio soluble en agua (WST-8 5 mM) para controlar la cantidad de NAD(P)H mediante su reducción a colorante de formazán de color amarillo [43]. Se plaquearon 5000 células al menos por triplicado en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se cultivaron en 100 µl de medio de crecimiento normal durante 4 h a 37°C. A continuación se añadió tampón CK8 (Dojindo Molecular Technology, Gaithersburg, EE.UU), que contenía WST-8, tanto con o sin tratamiento con agentes que dañan el ADN a las concentraciones indicadas. Se determinó la reducción de WST-8 en presencia de NAD(P)H midiendo la absorbancia visible (DO₄₅₀) cada 30 min. Se preparó también un medio blanco que contenía solo el medio y el tampón CK8. Se calcularon los cambios en los niveles de NAD(P)H comparando la absorbancia de los pocillos que contenían células tratadas con agentes que dañan el ADN y las tratadas solo con DMSO. Se calcularon de forma alterna los niveles de NAD(P)H en diferentes líneas celulares tras 4 h de incubación en tampón CK8.

[0054] Se evaluó también la capacidad de NU1025 para inhibir la actividad de PARP-1 en células permeabilizadas usando una modificación del procedimiento de Halldorsson y col [44], y descrita con detalle en muchas partes [45]. De manera breve: se incubaron 300 µl de células permeabilizadas tratadas con NU1025 (15 min) a 6°C con oligonucleótido (conc. final 2,5 µg/ml), NAD 75 µM + [³²P] NAD (Amersham Pharmacia, Amersham, Reino Unido) en un volumen total de 400 µl. La reacción finalizó después de 5 min añadiendo TCA al 10% frío en hielo, NaPPI al 10% durante 60 min antes de filtrar a través de un filtro Whatman GF/C (LabSales, Maidstone, Reino Unido), enjuagado 6x con TCA al 1% y NaPPI al 1%, se dejó secar, y se midió la radioactividad incorporada para determinar la actividad de PARP-1. Se expresaron los datos como pmol de NAD incorporados/10⁶ células por referencia a patrones de [³²P]NAD.

Electroforesis en gel de campo pulsante

[0055] Se plaquearon $1,5 \times 10^6$ células en placas de 100 mm y se dejaron 4 h para la unión. La exposición al fármaco fue durante 18 h tras las cuales las células se tripsinizaron y se dispersaron 10⁶ células en cada inserción de agarosa al 1%. Se incubaron estas inserciones como se ha descrito en muchas partes (8) y se separaron mediante electroforesis en gel de campo pulsante durante 24 h (BioRad; ángulo de 120° tiempo de inversión de 60 a 240 s, 4 V/cm). Se tiñó posteriormente el gel con bromuro de etidio para el análisis.

Tratamiento del ARNip

[0056] Se adquirieron un combinado de BRCA2 SMART prediseñado y ARNip mezclados (Dharmacon, Lafayette, CO). Se sembraron 10000 células en placas de 6 pocillos y se dejaron durante la noche antes de transfectarse con ARNip 100 nM usando Reactivo de Oligofectamina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación se cultivaron las células en medio de crecimiento normal durante 48 h antes de la tripsinización y se volvieron a plaquar para las pruebas de toxicidad. Se confirmó la supresión de BRCA2 mediante transferencia Western (tal como se ha descrito anteriormente [46]) de los extractos de proteínas tratados con ARNip con un anticuerpo dirigido contra BRCA2 (Oncogene, Nottingham, Reino Unido).

EJEMPLOSLas células deficientes en la recombinación homóloga son hipersensibles a la inhibición de PARP-1

[0057] Para investigar la implicación de la RH en las respuestas celulares a la inhibición de PARP-1, se estudiaron los efectos de los inhibidores de PARP-1 sobre la supervivencia de las líneas celulares deficientes en la reparación de la EH. Se encontró que las células deficientes en la RH (es decir, irs1SF que es defectiva en XRCC3 o its1 que es defectiva en XRCC2 [véase la Tabla 1] fueron muy sensibles al efecto tóxico de 3-aminobenzamida (3-AB) y a dos inhibidores más potentes de PARP-1: 1,5-dihidroxiisoquinolina (ISQ; [37]) u 8-hidroxi-2-metilquinazolinona (NU1025 [38, 39]) (Figura 1). La sensibilidad en las células irs1SF a 3-AB, ISQ o NU1025 se corrigió mediante la introducción de un cósmido que contenía un gen XRCC3 funcional (CXR3). De manera similar, la sensibilidad en las células irs1 a 3-AB, ISQ o NU1025 se corrigió mediante la introducción de un cósmido que contenía un gen XRCC2 funcional (irs1X2.2).

Las células deficientes en BRCA2 son hipersensibles a la inhibición de PARP-1

[0058] Se investigó la supervivencia de las células deficientes en BRCA2 (VC8) y en las células naturales (V79Z) en presencia de inhibidores de la PARP-1. Se encontró que las células VC8 eran muy sensibles al efecto tóxico de NU1025 (Figura 2). La sensibilidad en las células VC8 se corrigió mediante la introducción de un gen BTCA2 funcional tanto en el cromosoma 13 (VC8 nº 13) como en un vector de expresión en exceso (VC8+B2). Este resultado demuestra que la sensibilidad de los inhibidores de PARP-1 es una consecuencia directa de la pérdida de la función de BRCA2.

[0059] Para investigar si la inhibición de la PARP-1 estimula la apoptosis en las células deficientes en BRCA2, se investigó el nivel de la apoptosis 72 horas después de la exposición NU1025. Se encontró que NU1025 estimuló la apoptosis solo en células VC8, lo que demuestra que la pérdida de la actividad de la PARP-1 en células deficientes en BRCA2 estimula estos promedios de muerte (Figura 3)

Las células de cáncer deficientes en BRCA2 son hipersensibles a la inhibición de PARP-1

[0060] Se examinó si las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 (p53 natural) y MDA-MB-231 (p53 mutado) mostraban una sensibilidad similar a NU1025 tras el agotamiento de BRCA2. Se encontró que los inhibidores de PARP redujeron fuertemente la supervivencia de las células MCF7 y MDA-MB-231 solo cuando BRCA2 se destruyó con una mezcla de ARNip de BRCA2 (Figura 4). Esto demuestra que las células de cáncer de mama en las que se agotó BRCA2 eran sensibles a los inhibidores de PARP con respecto al estado de p53.

Las células deficientes en BRCA2 mueren por la inhibición de la PARP-1 en ausencia de roturas de ADN bicatenario (DSB) pero en presencia de γ H2Ax

[0061] Se sabe que la RH está implicada en la reparación de las DSB y otras lesiones que se producen durante la replicación del ADN [2]. Para determinar si la sensibilidad de las células deficientes en BRCA2 es el resultado de una incapacidad para reparar las DSB tras el tratamiento con NU1025, se midió la acumulación de las DSB en células V79 y V-C8 tras tratamiento con niveles muy tóxicos de NU1025. Se encontró que ninguna DSB fue detectable mediante el análisis electroforético en gel de campo pulsante del ADN obtenido de las células tratadas (Figura 5A), sugiriendo que se acumulan bajos niveles de DSB u otros sustratos recombinogénicos tras la inhibición de PARP en las células deficientes en la RH, (Figura 5B) con el estímulo de γ H2Ax (Figura 5B). La razón por la cual las células deficientes en BRCA2 mueren tras la inducción de estas lesiones recombinogénicas se debe probablemente a una incapacidad para reparar dichas lesiones. Para ensayar esto, se determinó la capacidad de las células V-C8 deficiente en BRCA2 y de las células complementadas en BRCA2 para focos de RDA51 en respuesta a NU1025. Se encontró que los focos de RAD51 se inducían a su vez en células V-C8+B2 tras el tratamiento con NU1025 (estadísticamente significativo en el *test de la t* $p < 0,05$; Figura 5D). Esto indica que las lesiones recombinogénicas desencadenan la reparación de la RH en estas células, permitiéndoles sobrevivir. En contraste,

las células V-C8 deficientes en BRCA2 fueron incapaces de formar focos RAD51 en respuesta al tratamiento con NU1025 (Figura 5D) indicando sin RH, lo que dejaría las lesiones recombinogénicas sin reparar y de esta manera produce la muerte celular.

5 La PARP-1, y no la PARP-2, es la importante para evitar la formación de una lesión recombinogénica

[0062] Existen dos PARP principales presentes en el núcleo de las células de mamíferos, la PARP-1 y la PARP-2, y todos los inhibidores de la PARP de los que se ha informado inhiben ambas formas. Con el fin de distinguir qué PARP es responsable del efecto, los inventores probaron si la ausencia de PARP-1 y/o PARP-2 daba como resultado la acumulación de lesiones tóxicas, disminuyendo éstas y BRCA2 con ARNip en células humanas (Figura 6a). Los inventores encontraron que la supervivencia clonogénica se redujo significativamente cuando las proteínas PARP-1 y BRCA2 se agotaron simultáneamente en las células humanas (Figura 6b). El agotamiento de la PARP-2 con BRCA2 no tuvo efecto sobre la supervivencia clonogénica y el agotamiento de PARP-2 en PARP-1 y en células con BRCA2 agotada no dio como resultado una toxicidad adicional. Estos resultados sugieren que la PARP-1, y no la PARP-2, es la responsable de reducir las lesiones recombinogénicas tóxicas en células humanas. La eficacia de la clonación se redujo solo hasta el 60% del control en células con PARP-1 y BRCA2 agotadas simultáneamente, mientras que no sobrevivieron las células deficientes en RH en los tratamientos con inhibidores de PARP. Esto se podría conseguir con un agotamiento incompleto de la abundante proteína PARP-1 por el ARNip (Figura 6c), que puede ser suficiente para mantener la función de la PARP-1 en alguna de estas células.

20 La PARP-1 se activa por los inhibidores de la replicación

[0063] La RH está también implicada en la reparación de las lesiones que se producen en las horquillas de replicación atascadas, lo que puede no implicar las DSB detectables [2]. Para probar si PARP tiene un papel en las horquillas de replicación, se examinó la activación de PARP en células tratadas con agentes (timidina o hidroxiurea) que retrasa o detiene la progresión de las horquillas de replicación del ADN. La timidina agota el dCTP de las células y ralentiza las horquillas de replicación sin producir DSB. La hidroxiurea agota algunos dNTP y bloquea la horquilla de replicación, que está asociada con la formación de las DSB en las horquillas de replicación [2]. Ambos agentes inducen potentemente la RH [2]. Se tiñeron células V79 de hámster tratadas durante 24 horas con timidina o hidroxiurea para los polímeros PAR. Esto desveló un aumento sustancial en el número de células que contenían sitios de actividad de la PARP (Figura 7C). Este resultado sugiere una función de PARP en las horquillas de replicación atascadas. Se demostró también que la inhibición de PARP con NU1025 aumenta la sensibilidad a la timidina o a la hidroxiurea en células V-C8+B2 (Figura 7D, E). Este resultado sugiere que la actividad de la PARP es importante en la reparación de las horquillas de replicación atascadas o, alternativamente, que evita la inducción de muerte en las células con horquillas de replicación atascadas.

[0064] La PARP se activa rápidamente en roturas de cadenas bicatenarias (SSB) y atrae enzimas de reparación del ADN [3-6]. El metil-metano sulfonato (MMS) produce la alquilación del ADN, que se repara mediante reparación por excisión de bases. La PARP se activa rápidamente mediante la SSB intermedia formada durante esta reparación, que agota los niveles de NAD(P)H (Figura 7F). Los inventores encontraron que la activación de la PARP y la reducción de los niveles de NAD(P)H es mucho más lenta después de los tratamientos con timidina o hidroxiurea. Se puede explicar esta lenta activación de PARP por la acción indirecta de la timidina y la hidroxiurea y el tiempo necesario para acumular horquillas de replicación atascadas a medida que las células entran en la fase S del ciclo celular.

45 La PARP-1 y la RH tienen papeles independientes en las horquillas de replicación atascadas

[0065] Se determinó el número de sitios de actividad de la PARP en células V-C8 deficientes en BRCA2 sin tratar. Se encontró que más células V-C8 contienen sitios de actividad de PARP en comparación V-C8+B2 (Figura 8A, B, C). También, las células V-C8 tienen menores niveles de NAD(P)H libre que las células corregidas (Figura 8D), como probable resultado de la creciente actividad de la PARP. De manera importante, estos sitios de actividad no se solapan con focos de RAD51 (Figura 8E).

[0066] Los resultados del presente documento sugieren que la PARP y la RH tienen papeles independientes en la protección o el rescate de horquillas de replicación atascadas (Figura 8F). Una pérdida de actividad de PARP puede estar compensada por una creciente RH mientras que una pérdida de RH puede estar compensada por una creciente actividad de PARP. Sin embargo, la pérdida de estas rutas conduce a la acumulación de horquillas de replicación atascadas y a la muerte, como en el caso de células deficientes en BRCA2 inhibidas por PARP.

[0067] Tal como se muestra en el modelo reseñado en la Figura 8F, la PARP y la RH tienen papeles complementarios en las horquillas de replicación atascadas. (i) Las horquillas de replicación pueden atascarse cuando encuentran un obstáculo en la plantilla de ADN. Adicionalmente, pueden atascarse temporalmente, debido a

la ausencia de dNTP u otros cofactores de la replicación. (II) PARP se une a las horquillas de replicación atascadas u otros daños asociados a la replicación, estimulando la polimerización. Los polímeros PAR negativamente cargados resultantes pueden proteger las horquillas de replicación atascadas, repeliendo las proteínas que normalmente procesarían las horquillas de replicación (por ejemplo, resolvasas), hasta que la horquilla de replicación se puede restaurar espontáneamente cuando los dNTP y otros cofactores llegas a estar disponibles. Alternativamente, los polímeros PAR o PARP pueden atraer proteínas para resolver el bloqueo de la replicación por otros medios. (iii) En ausencia de actividad de la PARP, se puede usar la RH como una ruta alternativa para reparar las horquillas de replicación atascadas. Este modelo compensatorio explica el creciente nivel de RH como focos de RAD51 que se encuentran en células³⁻⁵ y la mayor actividad de la PARP que se encuentra en células deficientes en RH (es decir, V-C8). Las replications espontáneas de bloques/lesiones solo son letales en ausencia tanto de PARP como de RH.

[0068] **Tabla 1.** Genotipo y origen de las líneas celulares usadas en este estudio.

Línea celular	Genotipo	Defecto	Origen	Referencia
AA8	Wt	Wt	CHO	[41]
irs1SF	<i>XRCC3</i> ⁻	<i>XRCC3</i> ⁻ , deficiente en RH	AA8	[41]
CXR3	<i>XRCC3</i> ⁻ + <i>hXRCC3</i>	Wt	irs1SF	[41]
V79-4	Wt	Wt	V79	[40]
irs1	<i>XRCC2</i> ⁻	<i>XRCC2</i> ⁻ , deficiente en RH	V79-4	[40]
irs1X2.2	<i>XRCC2</i> ⁻ + <i>hXRCC2</i>	Wt	irs1	[40]
V79-Z	Wt	Wt	V79	[42]
VC8	<i>BRCA2</i> ⁻	<i>BRCA2</i> ⁻ , deficiente en RH	V79-Z	[42]
VC8 nº 13	<i>BRCA2</i> ⁻ + <i>hBRCA2</i>	Wt	VC8	[42]
VC8+B2	<i>BRCA2</i> ⁻ + <i>hBRCA2</i>	Wt	VC8	[42]

15 REFERENCIAS:

[0069]

- [1] A. R. Venkitaraman Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, Cell 108 (2002) 171-182.
- [2] C. Lundin, K. Erixon, C. Amaudeau, N. Schultz, D. Jenssen, M. Meuth y T. Helleday Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells, Mol Cell Biol 22 (2002) 5869-5878.
- [3] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva y G.G. Poirier Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, Biochem J 342 (1999) 249-268.
- [4] Z. Herceg y Z.Q. Wang Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death, Mutat Res 477 (2001) 97-110.
- [5] T. Lindahl, M.S. Satoh, G.G. Poirier y A. Klungland Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks, Trends Biochem Sci 20 (1995) 405-411.
- [6] M.S. Satoh y T. Lindahl Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair, Nature 356 (1992) 356-358.
- [7] S. Shall y G. de Murcia Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?, Mutat Res 460 (2000) 1-15.
- [8] Z.Q. Wang, L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff y E.F. Wagner PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis, Genes Dev 11 (1997) 2347-2358.
- [9] C.M. Simbulan-Rosenthal, B.R. Haddad, D.S. Rosenthal, Z. Weaver, A. Coleman, R. Luo, H.M. Young, Z.Q. Wang, T. Ried y M.E. Smulson Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999) 13191-13196.
- [10] J.M. de Murcia, C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F.J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon y G. de Murcia Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells, Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 7303-7307.
- [11] F. d'Adda di Fagagna, M.P. Hande, W.M. Tong, P.M. Lansdorp, Z.Q. Wang y S.P. Jackson Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability, Nat Genet 23 (1999) 76-80.
- [12] E. Samper, F.A. Goytisolo, J. Menissier-de Murcia, E. Gonzalez-Suarez, J.C. Cigudosa, G. de Murcia y M.A. Blasco Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability, J Cell Biol 154 (2001) 49-60.
- [13] C. Morrison, G.C. Smith, L. Stingl, S.P. Jackson, E.F. Wagner y Z.Q. Wang Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis, Nat Genet 17 (1997) 479-482.
- [14] V. Schreiber, D. Hunting, C. Trucco, B. Gowans, D. Grunwald, G. De Murcia y J.M. De Murcia A dominantnegative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage, Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 4753-4757.

- [15] J.H. Kupper, M. Muller y A. Burkle Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells, *Cancer Res* 56 (1996) 2715-2717.
- 5 [16] J. Magnusson y C. Ramel Inhibitor of poly(ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells in vivo in *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis* 5 (1990) 511-514.
- [17] A.S. Waldman and B.C. Waldman Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation), *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 5943-5947.
- 10 [18] A. Semionov, D. Cournoyer y T.Y. Chow Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase stimulates extrachromosomal homologous recombination in mouse Ltk-fibroblasts, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4526-4531.
- [19] F. Dantzer, V. Schreiber, C. Niedergang, C. Trucco, E. Flatter, G. De La Rubia, J. Oliver, V. Rolli, J. Menissier de Murcia y G. de Murcia Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair, *Biochimie* 81 (1999) 69-75.
- 15 [20] F. Dantzer, G. de La Rubia, J. Menissier-De Murcia, Z. Hostomsky, G. de Murcia y V. Schreiber Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1, *Biochemistry* 39 (2000) 7559-7569.
- [21] L. Tentori, I. Portarena y G. Graziani Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, *Pharmacol Res* 45 (2002) 73-85.
- 20 [22] T. Lindahl y R.D. Wood Quality control by DNA repair, *Science* 286 (1999) 1897-1905.
- [23] K.W. Caldecott DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia, *Cell* 112 (2003) 7-10.
- [24] D. D'Amours y S.P. Jackson The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 317-327.
- 25 [25] A.D. D'Andrea y M. Grompe The Fanconi anaemia/BRCA pathway, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 23-34.
- [26] S.P. Jackson Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis* 23 (2002) 687-696.
- [27] R. Kanaar, J.H. Hoeijmakers y D.C. van Gent Molecular mechanisms of DNA double strand break repair, *Trends Cell Biol* 8 (1998) 483-489.
- [28] D.C. van Gent, J.H. Hoeijmakers y R. Kanaar Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat Rev Genet* 2 (2001) 196-206.
- 30 [29] S.L. Neuhausen y E.A. Ostrander Mutation testing of early-onset breast cancer genes BRCA1 and BRCA2, *Genet Test* 1 (1997) 75-83.
- [30] G. Kuperstein, W.D. Foulkes, P. Ghadirian, J. Hakimi y S.A. Narod A rapid fluorescent multiplexed-PCR analysis (FMFA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes, *Clin Genet* 57 (2000) 213-220.
- 35 [31] A. Chiarugi Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited, *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002) 122-129.
- [32] C.R. Calabrese, M.A. Batey, H.D. Thomas, B.W. Durkacz, L.Z. Wang, S. Kyle, D. Skaltzky, J. Li, C. Zhang, T. Boritzki, K. Maegley, A.H. Calvert, Z. Hostomsky, D.R. Newell y N.J. Curtin Identification of Potent Nontoxic Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitors: Chemopotential and Pharmacological Studies, *Clin Cancer Res* 9 (2003) 2711-2718.
- 40 [33] D. Ferraris, Y.S. Ko, T. Pahutski, R.P. Ficco, L. Serdyuk, C. Alemu, C. Bradford, T. Chiou, R. Hoover, S. Huang, S. Lautar, S. Liang, Q. Lin, M.X. Lu, M. Mooney, L. Morgan, Y. Qian, S. Tran, L.R. Williams, Q.Y. Wu, J. Zhang, Y. Zou y V. Kalish Design and synthesis of poly ADP-ribose polymerase-1 inhibitors. 2. Biological evaluation of aza-5[H]-phenanthridin-6-ones as potent, aqueous-soluble compounds for the treatment of ischemic injuries, *J Med Chem* 46 (2003) 3138-3151.
- 45 [34] K.J. Dillon, G.C. Smith y N.M. Martin A FlashPlate assay for the identification of PARP-1 inhibitors, *J Biomol Screen* 8 (2003) 347-352.
- [35] A.J. Pierce, R.D. Johnson, L.H. Thompson y M. Jasin XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells, *Genes Dev* 13 (1999) 2633-2638.
- 50 [36] R.D. Johnson, N. Liu y M. Jasin Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination, *Nature* 401 (1999) 397-399.
- [37] G.M. Shah, D. Poirier, S. Desnoyers, S. Saint-Martin, J.C. Hoffack, P. Rong, M. ApSimon, J.B. Kirkland y G.G. Poirier Complete inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity prevents the recovery of C3H10T1/2 cells from oxidative stress, *Biochim Biophys Acta* 1312 (1996) 1-7.
- 55 [38] R.J. Griffin, S. Srinivasan, K. Bowman, A.H. Calvert, N.J. Curtin, D.R. Newell, L.C. Pemberton y B.T. Golding Resistance-modifying agents. 5. Synthesis and biological properties of quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), *J Med Chem* 41 (1998) 5247-5256.
- [39] S. Boulton, L.C. Pemberton, J.K. Porteous, N.J. Curtin, R.J. Griffin, B.T. Golding y B.W. Durkacz Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: a comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, *Br J Cancer* 72 (1995) 849-856.
- 60 [40] C.S. Griffin, P.J. Simpson, C.R. Wilson y J. Thacker Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation, *Nat Cell Biol* 2 (2000) 757-761.
- [41] R.S. Tebbs, Y. Zhao, J.D. Tucker, J.B. Scheerer, M.J. Siciliano, M. Hwang, N. Liu, R.J. Legerski y L.H.

Thompson Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 6354-6358.

[42] M. Kraakman-van der Zwet, W.J. Overkamp, R.E. van Lange, J. Essers, A. van Duijn-Goedhart, I. Wiggers, S. Swaminathan, P.P. van Buul, A. Errami, R.T. Tan, N.G. Jaspers, S.K. Sharan, R. Kanaar y M.Z. Zdzienicka Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions, *Mol Cell Biol* 22 (2002) 669-679.

[43] J. Nakamura, S. Asakura, S.D. Hester, G. de Murcia, K.W. Caldecott y J.A. Swenberg Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in real time, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) e104.

[44] H. Halldorsson, D.A. Gray y S. Shall Poly (ADP-ribose) polymerase activity in nucleotide permeable cells, *FEBS Lett* 85 (1978) 349-352.

[45] K. Grube, J.H. Kupper y A. Burkle Direct stimulation of poly(ADP ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers, *Anal Biochem* 193 (1991) 236-239.

[46] C. Lundin, N. Schultz, C. Arnaudeau, A. Mohindra, L.T. Hansen y T. Helleday RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells, *J Mol Biol* 328 (2003) 521-535.

[47] Schreider y col., *Journal of Biological Chemistry* 277: 23028-23036 (2002).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células cancerosas defectivas en la recombinación homóloga (RH);
5 en el que las células cancerosas tienen un defecto en un gen seleccionado entre el grupo constituido por XRCC1, CTPS, RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD52, RAD54, RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR, chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, RAD9, FEN-1, Mus81, Emel, DDS1 y BARD.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo constituido por inhibidores PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, tanquirasa 1 tanquirasa 2.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el inhibidor de la PARP es un inhibidor de la PARP-1.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo constituido por bencimidazol-carboxamidas, quinazolin-4-[3H]-onas y derivados de isoquinolona.
- 20 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo constituido por 2-(4-hidroxifenil) bencimidazol-4-carboxamida, 8-hidroxi-2-metilquinazolin-4-[3H]ona, 6(5H) fenantridinona, 3-amnobenzamida, bencimidazol-4-carboxamidas e indoles de lactama tricíclica.
- 25 6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el inhibidor de la PARP es una molécula de ARNi específica de un gen PARP.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la molécula de ARNi se deriva de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo constituido por:
30 a) una secuencia de ácido nucleico como la representada por la secuencia de la Figura 9, 10, 11, 12, 13 o 14, o uno de sus fragmentos;
b) una secuencia que se hibrida con las secuencias de ácido nucleico de la Figura 9, 10, 11, 12, 13 o 14, y que codifica un gen de PARP; o
c) una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencias que están degeneradas como resultado del código genético de las secuencias de ácido nucleico definidas en (a) y (b).
- 35 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en el que la molécula de ARNi comprende la secuencia de ácido nucleico aaa agc cau ggu gga gua uga.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en el que la molécula de ARNi está constituida por la secuencia de ácido nucleico aag acc aaU cuc ucc agu uca ac.
- 40 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en el que la molécula de ARNi está constituida por la secuencia de ácido nucleico aag acc aac auc gag aac aac.
- 45 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células cancerosas defectivas en la RH son parcialmente deficientes en la RH.
12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que las células cancerosas defectivas en la RH son totalmente deficientes en la RH.
- 50 13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el defecto es una mutación en el gen.
14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el defecto es la ausencia del gen.
- 55 15. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el defecto está en la expresión del gen.
16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células cancerosas que se van a tratar se seleccionan entre el grupo constituido por células de cáncer de pulmón, colon, páncreas, ovarios, cuello de útero, mama y próstata.
- 60

17. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células cancerosas están en un ser humano.
- 5 18. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células cancerosas que se van a tratar son células de cáncer hereditario vinculado a genes.
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18 en el que las células cancerosas que se van a tratar son células de cáncer de mama.
- 10 20. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células cancerosas que se van a tratar son defectivas en la expresión de BRCA1.
21. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células cancerosas que se van a tratar son defectivas en la expresión de BRCA2.
- 15 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 en el que las células cancerosas son parcialmente deficientes en la expresión de BRCA1 y/o BRCA2.
- 20 23. Uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 en el que las células cancerosas son totalmente deficientes en la expresión de BRCA1 y/o BRCA2.
24. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el gen que media en la RH es un gen supresor del tumor.
- 25 25. Uso de acuerdo con la reivindicación 24 en el que el gen supresor del tumor es BRCA1.
26. Uso de acuerdo con la reivindicación 24 en el que el gen supresor del tumor es BRCA2.
- 30 27. Un inhibidor de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) para uso en el tratamiento de células cancerosas defectivas en la recombinación homóloga (RH);
- en el que las células cancerosas tienen un defecto en un gen seleccionado entre el grupo constituido por XRCC1, CTPS, RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD52, RAD54, RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR, chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, RAD9, FEN-1, Mus81, Emel, DDS1 y BARD.
- 35 28. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo constituido por inhibidores de PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, tanquirasa 1 y tanquirasa 2.
- 40 29. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con la reivindicación 28 en el que el inhibidor de la PARP es un inhibidor de la PARP-1.
- 45 30. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo constituido por bencimidazol-carboxamidas, quinazolin-4-[3H]-onas y derivados de isoquinolona.
- 50 31. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con la reivindicación 30 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo constituido por 2-(4-hidroxifenil) bencimidazol-4-carboxamida, 8-hidroxi-2-metilquinazolin-4-[3H] ona, 6(5H) fenantridinona, 3-amnbenzamida, bencimidazol-4-carboxamidas e indoles de lactama tricíclica.
- 55 32. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 en el que las células cancerosas defectivas en la RH son parcialmente deficientes en la RH.
33. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 en el que las células cancerosas defectivas en la RH son totalmente deficientes en la RH.
- 60 34. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33 en el que las células cancerosas que se van a tratar se seleccionan entre el grupo constituido por células de cáncer de pulmón, colon, páncreas, gástrico, de ovarios, de cuello de matriz, mama y próstata.

35. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34 en el que las células cancerosas que se van a tratar son células de cáncer hereditario vinculadas a genes.

5 36. Un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con la reivindicación 35 en el que las células cancerosas que se van a tratar son células de cáncer de mama.

37. un inhibidor de la PARP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36 en el que las células cancerosas que se van a tratar son defectivas en la expresión de BRCA1 o BRCA2.

10

Figura 1.

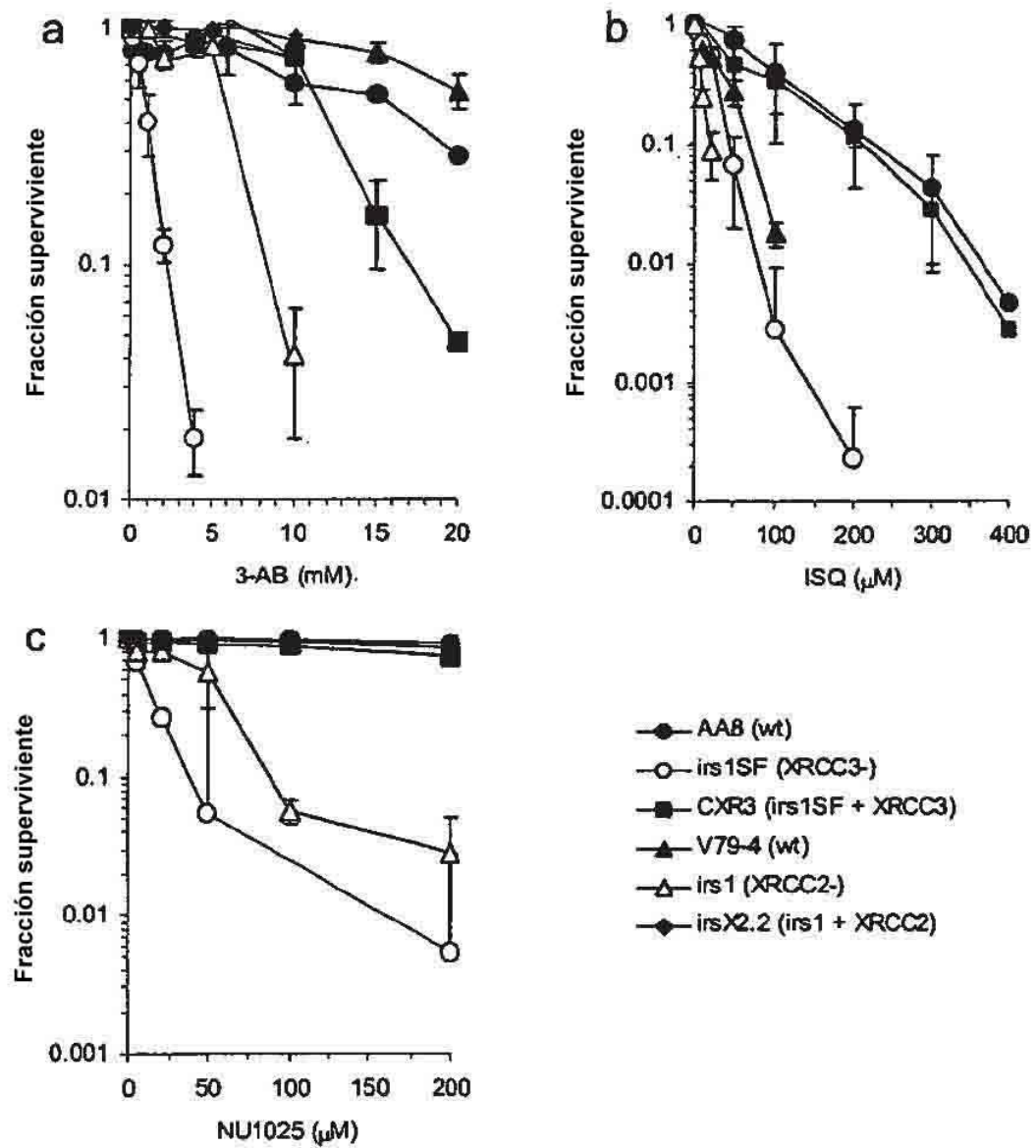


Figura 2.

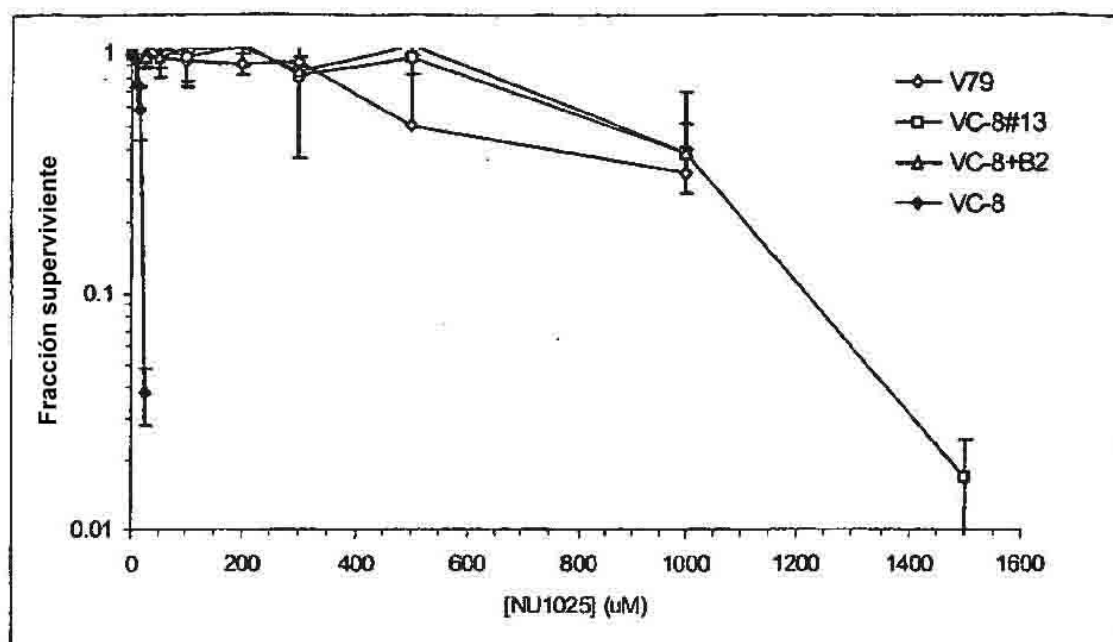


Figura 3

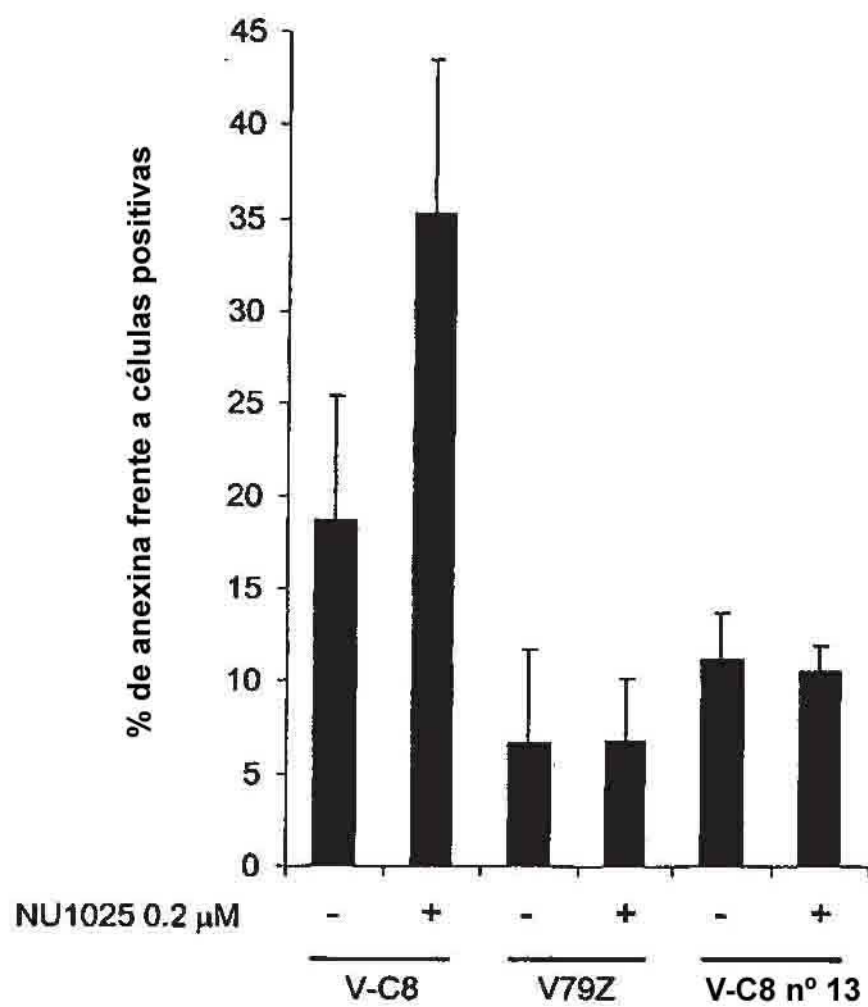


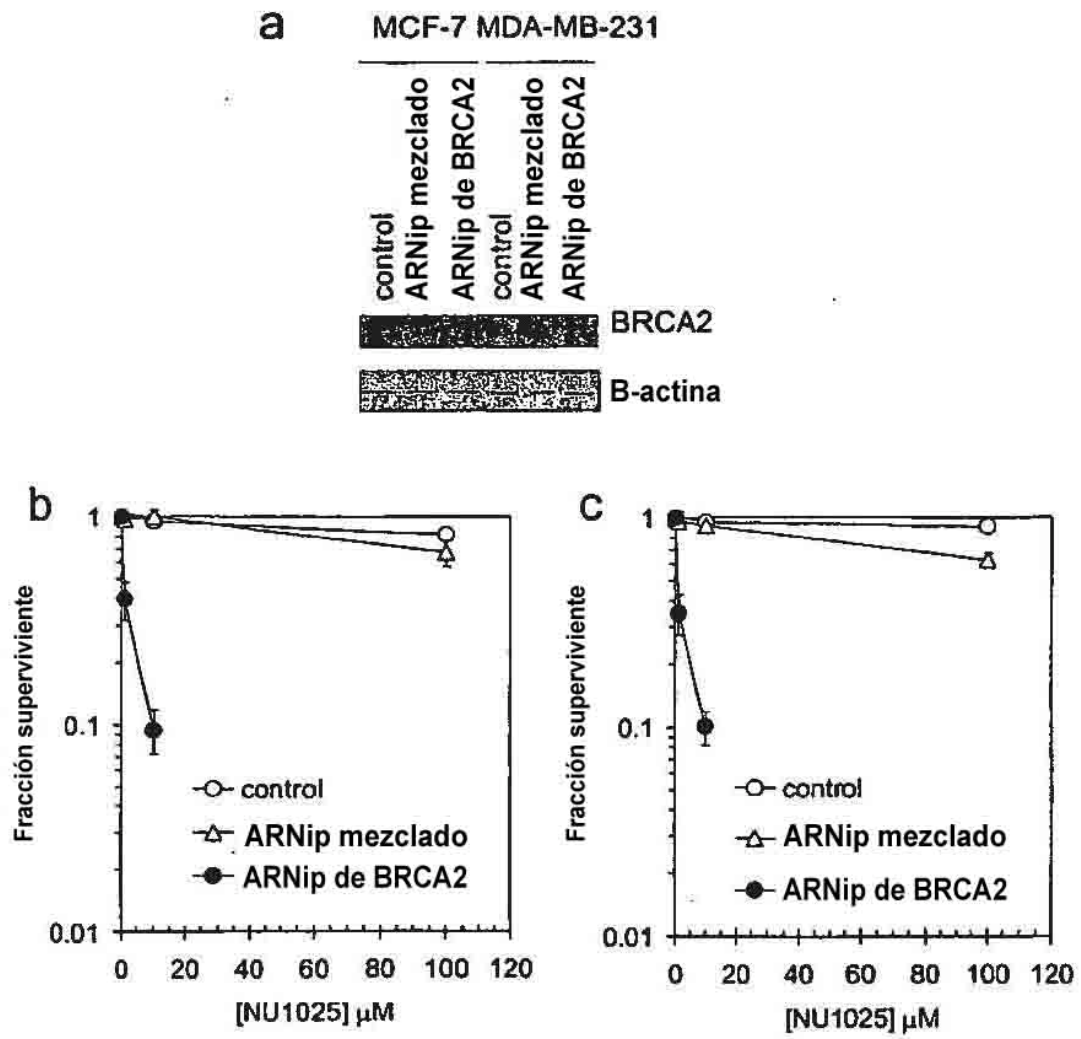
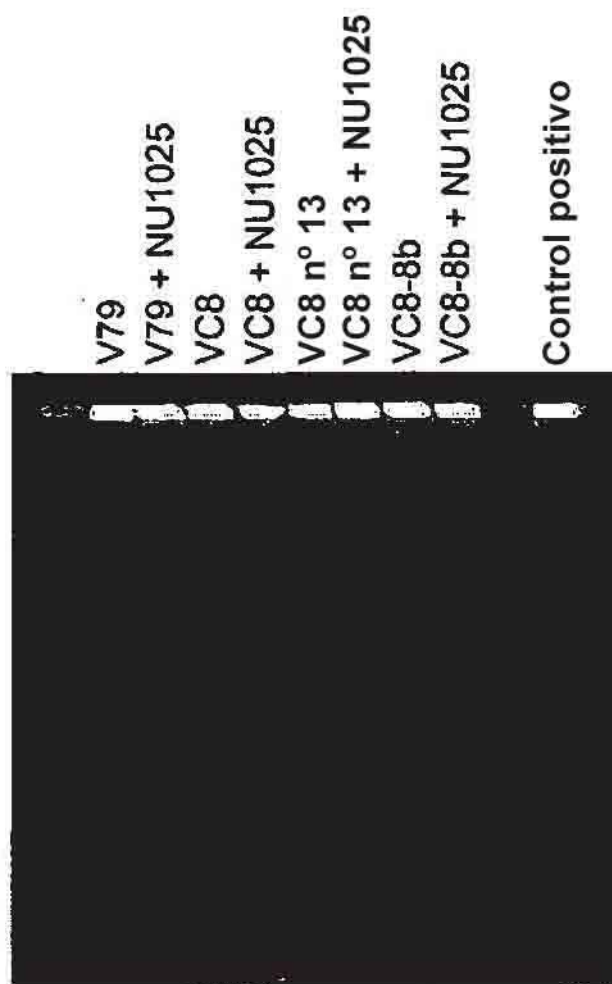
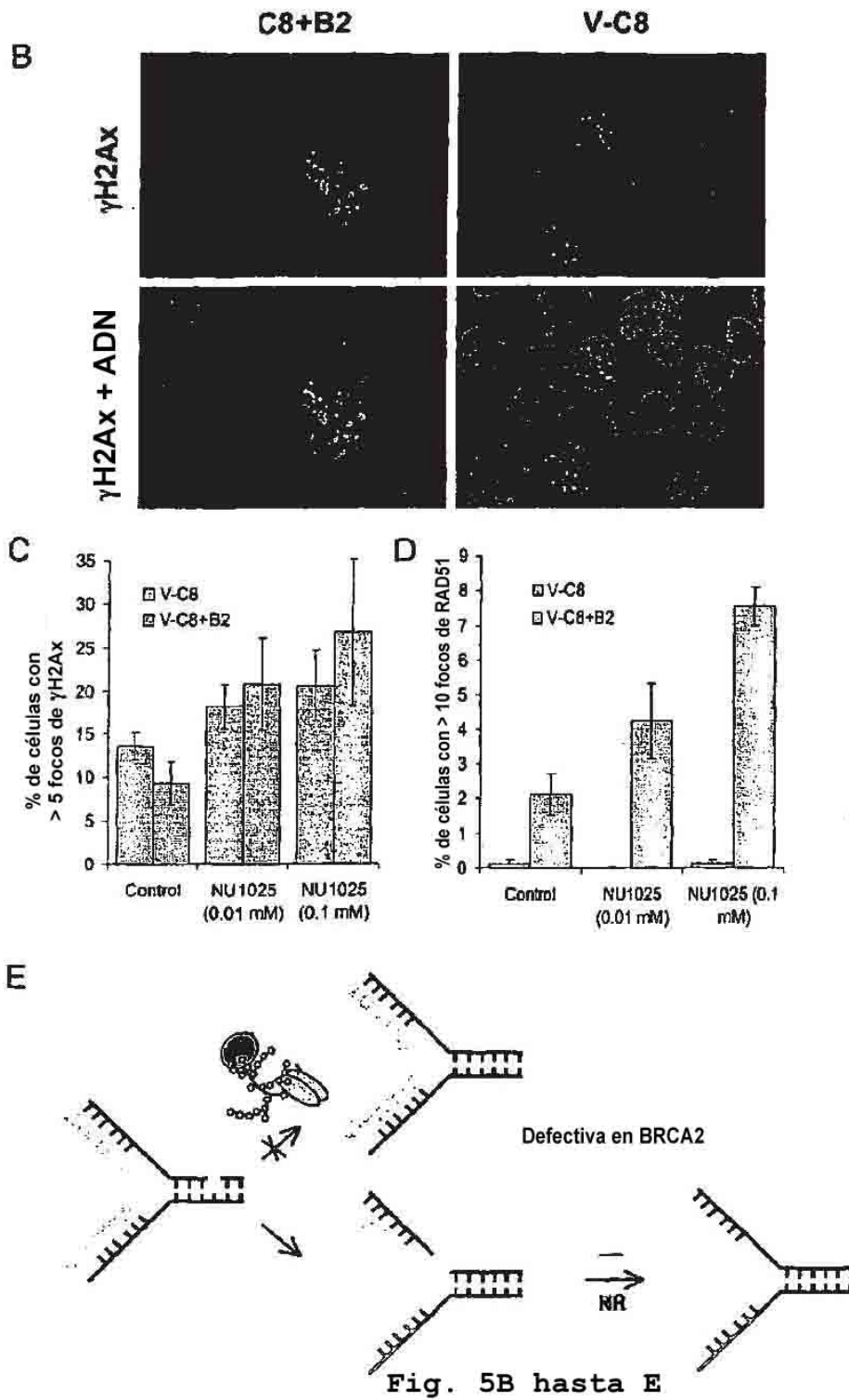
Figura 4

Figura 5A





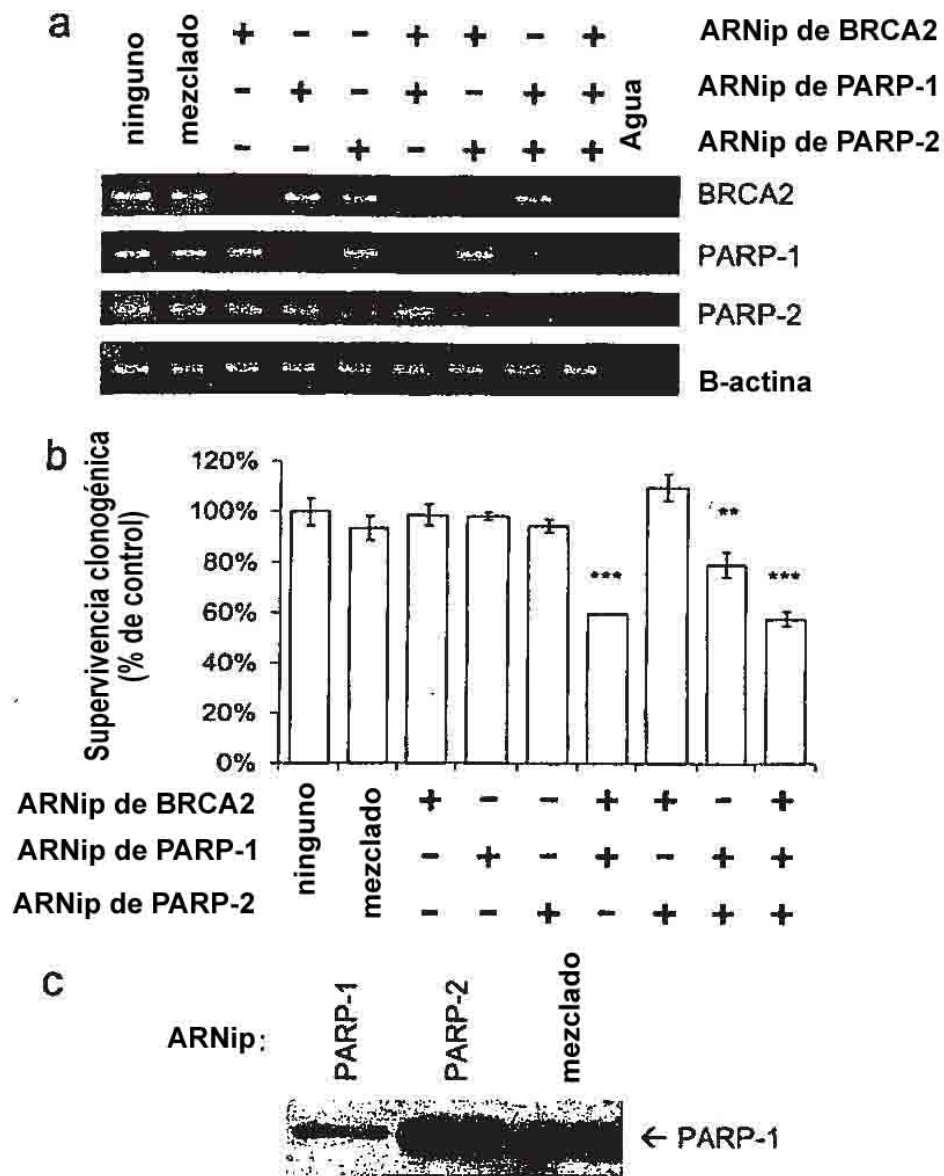


Fig. 6

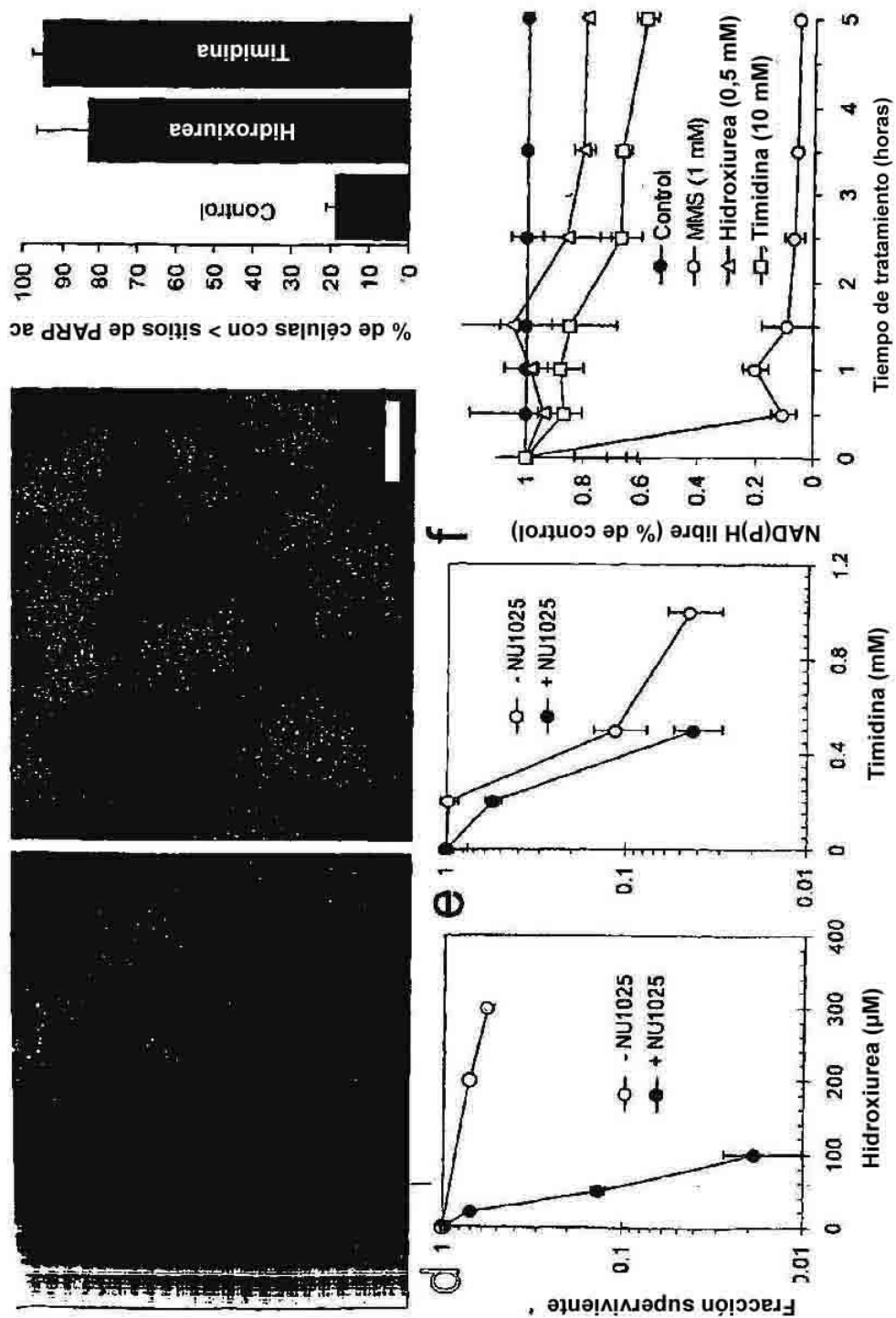


Fig. 7

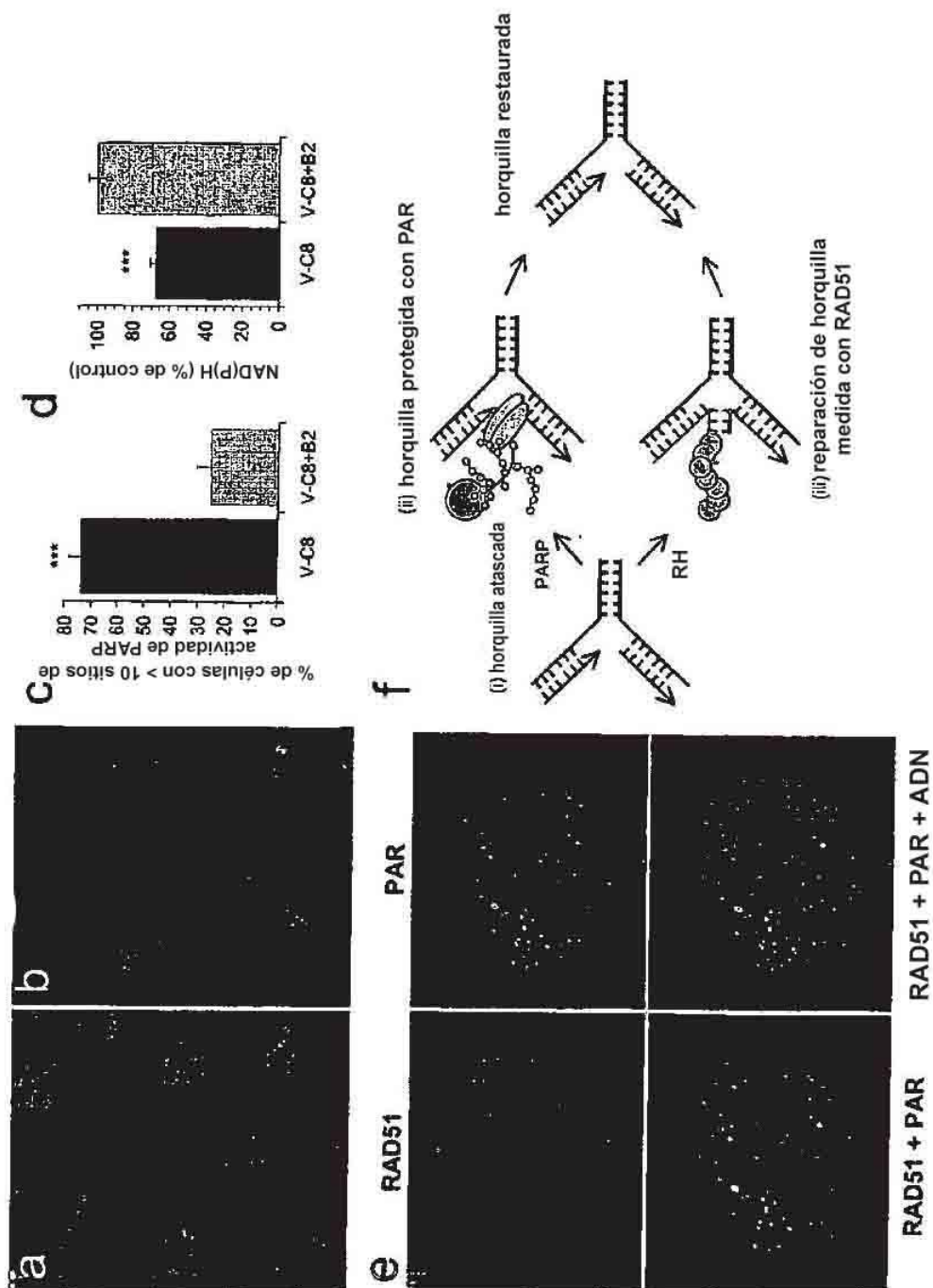


Fig. 8

FIGURA 9

1 cgccccccca gccccggggg cagggaagc ctaaattacg gaattaccgc gagcaaggag
 61 cgcggaatcg gggagcgtcc ggagctagct ggatcctcta ggcaggatgg tgaigggaat
 121 ctttgcaaat tgtatcttct gttgaaagt gaagtactta cctcagcagc agaagaaaa
 181 gctacaaact gacattaagg aaaatggcgg aaagtittcc tttcgttaa atcctcagtg
 241 cacacatata atcttagata atgctgatgt tctgagtcag taccaactga attctatcca
 301 aaagaaccac gttcatattg caaaccaga tttatatgg aaatctatca gagaaaagag
 361 actcttgat gtaaagaatt atgatccta taagcccctg gacatcacac caccctccta
 421 tcagaaggcg agcagttctg aagtgaaac agaaggctta tgcccggaca gtgccacaga
 481 ggaggagac actgtggaac tcaactgagtt tggatgagc aatgttgaaa ttctcatct
 541 tctcaagat ttgaagtgt caaatataa cacttgagc aaagtgggaa tggaggagag
 601 ccaggagact ggggtggg agcttcagtg ttcggggac tccaggagc gtccttctc
 661 gatctctca cactctccc tggatgatgg catggagact agaagacagt ttgtataaa
 721 gaaaacctct gaagatgcaa gtgaatactt tgaataatc attgaagaac tgaagaaca
 781 aggatctta ctaagagaac attcacacc tgaagcaacc caattagcat ctgaacaatt
 841 ccaagcattg cttttggagg aagtcatgaa ttcaagcact ctgagccaag aggtgagcga
 901 ttaagttag atgattggg cagaggccct gggccacctg gaacacatgc ttctcaagcc
 961 agtgaacagg attagcctca acgatgtgag caaggcagag gggattctcc ttctagtaaa
 1021 ggcagcactg aaaaatggag aaacagcaga gcaattgcaa aagatgatga cagagttaa
 1081 cagactgata cctcacaaag gcacaatgcc caaagaagtg aacctgggac tattggctaa
 1141 gaaagcagac ctctgccagc taataagaga catggtaaat gtctgtgaaa ctaattgtc
 1201 caaacccaac ccaccatccc tggccaaata ccgagcttig aggtgcaaaa ttgagcatgt
 1261 tgaacagaat actgaagaat ttctcagggt tagaaaagag gttttgcaga atcatcacag
 1321 taagagccca gtggatgtct tgcagatatt tagagttggc agagtgaatg aaaccacaga
 1381 gttttgagc aaacttggt aatgtaggcc cttgttcat ggttctcctg taaaaaat
 1441 cgtgggaatc ttgtgtcag ggttgctttt acccaaagta gtggaagatc gttgtgtga
 1501 aagaacagac gtcggaacc ttggaagtgg gatttatc agtgattcgc tcatacaag
 1561 taicaagtac tcacaccgg gagagacaga tggcaccaga ctctgtctca ttgtgacgt
 1621 agccctcgga aagtgtatgg acttcatga gaaggactt tcttaactg aagcaccac
 1681 aggcctagac agtgtgatg gatttcaca aacagcctct gtcaccacag acttgagga
 1741 tgaatgaatt gttgtctata aaaccaatca ggttaaatg aatatatta ttaattttc
 1801 catgcctgag tttaaaatt ttcaaaagt tgaagattc cagttaccag atgcaaaac
 1861 cagacctgag tttaaaatt ttcaaaagt tgaagattc cagttaccag atgcaaaac
 1921 ttccagcagc accaaggccg gcctccagga tgcctcggg aacttggttc ctctggagga
 1981 tgtccacatc aaaggagaa tcatagacac ttagcccg gtcattgttt tcagacata
 2041 cacaataaaa agtcacgtgc ccattgagc aaaaatatc ttccittgg atgacaaggc
 2101 cgctgtgtgt ggcttgaag ccttcatcaa tgggaagcac atagtggag agattaaga
 2161 gaaggagaa gccagcaag agtacctaga agccgtgacc cagggccatg gcgttacct
 2221 gatgagtcag gatgtcctcg acgttttac tgaagtgtt ggaacattc cccctaaggc
 2281 taaggttctt ataaaaata cctacatcac agaactcagc atcctgggca ctgttggtgt
 2341 cttttcatg cccgccaccg tagcaccctg gcaacaggac aaggtttga atgaaaacct
 2401 tcaggataca gtagagaaga ttgtataaa agaataagga acaaagcaa gcttcttt
 2461 gactatgtct attgagatgc cgtacgtgat tgaattcatt ttcagtata ctcatgaact
 2521 gaaacaaaag cgcacagact gcaaagctgt cattagcacc atggaaggca gtccttaga
 2581 cagcagtgga ttttctcc acatcgggtt gtcgtgtgcc tatctccaa gaalgtgggt
 2641 tgaaaaacat ccagaaaaag aaagcgagc ttgcatgct gcttttaac ccgatctga
 2701 tgtcgacctc cctgacctag ccaatgagag cgaagtgatt attgtcttg actgtccag
 2761 ttcatggag ggtgtgacat tcttgaagc caaggaaac gccttgcatg cgctgtctt

2821 ggtgggtgag aagcagaaa taaatattat ccagtcggc acagggtaca aggagctatt
 2881 ttcgtatcct aagcataca caagcaatac cgcggcagca gaggatca tgcctgccac
 2941 acctaccatg gggaacacag actctggaa aacactccga tatcttagct tatgtaccc
 3001 tgctcgaggg tcacggaaca tccctctggt gtctgatggg cacctccagg atgagagcct
 3061 gacattacag ctctggaaga ggagccgccc gcacaccagg ttattcgctt gcggtatcgg
 3121 ttctacagca aatcgtcacg tcttaaggat ttgtcccag tgggtgccg gagtattga
 3181 atattttaat gcaaaatcca agcatagttg gaaaaacag atagaagacc aaatgaccag
 3241 gctatgtctt ccgagttgcc actctgtctc cgtcaaatgg cagcaactca atccagatgc
 3301 gcccagggcc ctgcaggccc cagcccagggt gccatcctt ttctgcaatg atcgactcct
 3361 tgctatgga ttcattcttc actgcacaca ggcaactctg tgcactaa tcaagagaa
 3421 agaattttgt acaatgggtg cgactactga gcttcagaag acaactggaa ctatgatcca
 3481 caagctggca gcccagctc taatcagaga ttatgaagat ggcattcttc acgaaaatga
 3541 aaccagtcag gagatgaaaa acaaacctt gaaatctctg attattaaac tcagtaaaga
 3601 aaactctctc ataacacaa ttacaagctt tgggcaggt gaaaaaggg atgagaatga
 3661 gtcacctttt cctgatattc caaaagtct tgaactatt gccaaagaag atgtagactt
 3721 cctgcctac atgagctggc agggggaacc ccaagaagcc gtcaggaacc agtctctttt
 3781 agcatcctct gaggggccag aattacgttt atccaaacga aaacatagga aaattccatt
 3841 ttccaaaaga aaaatggaat tatctcagcc agaagttct gaagatttg aagaggatgc
 3901 cttaggtgta ctaccagctt tcacatcaa ttiggaacgt ggacgtgtgg aaaagctatt
 3961 ggatttaagt tggacagagt catgtaaac aacagcaact gaaccactat ttaagaaagt
 4021 cagtccatgg gaaacatcta ctctagctt ttctctatt ttggctccgg ccgttggtc
 4081 ctatcttacc ccgactaccc gcgtcacag tctgcttc ttgtctttg cctcatatcg
 4141 tcaggtagct agtttcggt cagctgctcc tccagacag ttgatgcat ctcaattcag
 4201 ccaaggccct gtgcctggca ctgtgctga ctggatccca cagtcggcgt ctgtccccc
 4261 aggacctccc cagaaccac ctctgcacc ctattgtggc attgttttt caggagctc
 4321 attagctct gcacagctc ctccactgca acatctgga gctttacta ccaggcttc
 4381 tgctggcacc ttccctgagc tggattctcc ccagcttcat ttctctctc ctacagacc
 4441 tgatcccatc agaggtttg ggtctatca tccctctgt tactctctt tcaatttca
 4501 acctccgca gcctcttga ctgccaacct taggctgcca atggcctctg cttacctga
 4561 ggctcttgc agtcagtcg ggactaccc agtagatct tgcctctag aagaatcagt
 4621 aggcagctc gaaggagtc gatgtcctgt cttgctttt caaagtctg acacagaaa
 4681 tgatgagcta tcagaagtc tcaagacag ctgctttta caataaaat gtgatacaa
 4741 agatgacagt atcccgtgct ttctggaagt aaaagaagag gatgaaatg tgtcacaca
 4801 aactggcag gatgctgtgc ctggacaga actctcagt ctacagacag aggatggctt
 4861 ctggaaactt acaccagaac tgggacttat attaaactt aatacaaatg gttgcacag
 4921 cttctttaa caaaaaggca tcaatctt aggtgtaaa ggaagagaat gtctctgga
 4981 cctaattgcc acaatgctgg tactacagtt tattcgacc aggttgaaa aagagggaa
 5041 agtgttcaa tcaatgatga aaatggatga cctctctt tccaggaata ttccctgggc
 5101 tttgaggca ataaagcaag caagtgaat ggtaagaaga actgaaggac agtaccatc
 5161 tatctgccc cggctgaac tggggaacga ctgggactt gccaccaagc agttgctggg
 5221 actccagccc ataagcactg tgcctctt ctatagagtc ctccattaca gtaaggcta
 5281 agtcaaatga aactgaattt taaactttt gcatgctt atgtagaaa taatcaaatg
 5341 ataatagata ctataatga aacttatta aggtttcatt cagttagca attactgtt
 5401 ttaaaaatta agtggagaa gaattactt aatcaactaa caagcaataa taaaatgaa
 5461 cttaaat

Figura 10

1 ctagaattca gggccgctg aattctaggc ggcgcgggcg cgacggagca ccggcgggcg
 61 cagggcgaga gcattaaatg aaagcaaaag agttaafaat ggcaacacgg ctccagaaga
 121 ctctccctt gccaaagaaa ctcttagatg ccagagacag gagtcgaaa agatgcctgt
 181 ggctggagga aaagctaata aggacaggac agaagacaag caagatggta tgccaggaag
 241 gtcattgggc agcaaaaggg tctctgaatc tgtgaaggcc ttgctgttaa agggcaaacg
 301 tcctgtggac ccagagtgtg cagccaaggt ggggaaggct catgtgtatt gtgaaggaaa
 361 tgatgtctat gatgtcatgc taaatcagac caatctccag ttcaacaaca acaagtacta
 421 tctgattcag ctattagaag atgatgccca gaggaacttc agtgtttgga tgagatgggg
 481 ccgagttggg aaaatgggac agcacagcct ggtggcttgt tcaggcaatc tcaacaaggc
 541 caaggaaatc ttccagaaga aattccttga caaacgaaa aacaattggg aagatcgaga
 601 aaagtgtgag aagggtcctg gaaaatatga tatgtctacag atggactatg ccaccaatac
 661 tcaggatgaa gaggaacaa aaaaagagga atctcttaa tctcccttga agccagagtc
 721 acagctagat cttcgggtac aggagttaat aaagttgac tgtaatgtc aggccatgga
 781 agaaatgatg atggaaatga agtataatc caagaaagcc ccacttggga agctgacagt
 841 ggcacaaatc aaggcaggtt accagtcctt taagaagatt gaggattgta ttcgggctgg
 901 ccagcatgga cgagctctca tggaaagcat caatgaatic tacaccagga ttccgcatga
 961 ctttgactc cgtactctc cactaatccg gacacagaag gaactgtcag aaaaaataca
 1021 attactagag gctttgggag acattgaaat tgctattaag ctggtgaaa cagagctaca
 1081 aagcccagaa caccattgg accaacacta tagaaacctt cattgtgcct tgcgccccct
 1141 tgaccatgaa agttacgagt tcaaaagtat ttccagtag ctacaatcta cccatgctcc
 1201 cacacacagc gactatacca tgacctgtc ggattgttt gaagtggaga aggatgggta
 1261 gaaagaagcc ttcagagagg acctcataa caggatgctt ctatggcatg gttccaggat
 1321 gagtaactgg gtgggaatct tgagccatgg gcttcgaatt gccaccctg aagctcccat
 1381 cacaggttac atgtttggga aaggaatcta ctttctgac atgtctcca agagtgccaa
 1441 ttactgctt gcctctcgcc taaagaatac aggactgcg ctcttatcag aggtagctct
 1501 aggtcagtg aatgaactac tagaggccaa tctaaggcc gaaggattgc tcaaggtaa
 1561 acatagcacc aaggggctgg gcaagatgg tccagttct gccacttcg tcacctgaa
 1621 tgggagtaca gtgccattag gaccagcaag tgacacagga attctgaatc cagatggta
 1681 taccctcaac tacaatgaat atattgtata taacccaac caggtccgta tgcggtacct
 1741 tttaaagggt cagtttaatt tcttcagct gttgtgaatg ttgatctaa ataaaccaga
 1801 gatctgatct tcaagcaaga aaataagcag tttgtactt gtgaattttg tgatatttta
 1861 tgaataaaaa actgtacagg tctaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

//

Figura 11

1 tgggactggt cgcctgactc ggccctgccc agcctctgct tcacccact ggtggccaaa
 61 tagccgatgt ctaatcccc acacaagctc atccccggcc tctgggattg ttgggaattc
 121 tctccetaat tcacgcctga ggctcatgga gagttgctag acctgggact gccctgggag
 181 gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atgtccctgc tttcttggc
 241 catggctcca aagccgaagc cctgggtaca gactgagggc cctgagaaga agaagggccg
 301 gcaggcagga agggaggagg accccttcg ctccaccgt gaggccctca aggccatacc
 361 cgcagagaag cgcataatcc gcgtggatcc aacatgtcca ctcagcagca accccgggac
 421 ccaggtgtat gaggactaca actgcacct gaaccagacc aacatcgaga acaacaacaa
 481 caagttctac atcaiccagc tgcctcaaga cagcaaccgc ttctcacct gctggaaccg
 541 ctggggccgt gtgggagagg tcggccagtc aaagatcaac cactcaca ggctagaaga
 601 tgcaagaag gacttgaga agaaattcg ggaaaagacc aagaacaact gggcagagcg
 661 ggaccacttt gtgtctacc cgggcaagta cacacitac gaagtacagg cagaggatga
 721 ggcccaggaa gctgtggtga aggtggacag aggccagtg aggactgtga ctaagcgggt
 781 gcagccctgc tcctggacc cagccacgca gaagctcact actaacatct tcagcaagga
 841 gatgtcaag aacaccatgg cctcatgga cctggatgtg aagaagatgc cctgggaaa
 901 gctgagcaag caacagattg cacggggttt cgaggccttg gaggcgctgg aggaggccct
 961 gaaaggcccc acggatggtg gccaaagcct ggaggagctg tcctcacact ttacaccgt
 1021 catcccgac aactcggcc acagccagcc cccgccatc aattccctg agcttctgca
 1081 ggccaagaag gacatgctgc tggctctggc ggacatcgag ctggcccagg ccctgcaggc
 1141 agtctctgag caggagaaga cgggtggagga ggtgccacac cccctggacc gagactacca
 1201 gcttctcaag tgccagctgc agctgctaga ctctggagca cctgagtaca aggtgataca
 1261 gacctactta gaacagactg gcagcaacca caggtgccct acacttaac acatctggaa
 1321 agtaaacc aa gaaggggagg aagacagatt ccaggccac tccaaactgg gtaatcggaa
 1381 gctgctgtgg catggacca acatggccgt ggtggccgc atcctacta gtgggtccg
 1441 catcatgcca cattctggtg ggcgtgttg caagggcatc tactttgcct cagagaacag
 1501 caagttagct ggatatgta ttggcatgaa gtgtggggcc caccatgtcg gctacatgtt
 1561 cctgggtgag gtggccctgg gcagagagca ccatacaac acggacaacc ccagctgaa
 1621 gagccacct cctggcttcg acagtgtcat tggcgaggc cacaccgagc ctgatccgac
 1681 ccaggacact gagtggagc tggatggcca gcaagtgggt gtgcccagg gccagcctgt
 1741 gccctgccc gagttcagca gctccacatt ctccagagc gactaccca tctaccagga
 1801 gagccagtgt cgcctgcgt acctgctgga ggtccacac tgagtggccg cctgtcccc
 1861 cgggtgctg caaggctgga ctgtgatct caatcatct gccatctct ggtacccta
 1921 tatcactcct ttttcaag aatacaatac gttgtgtta actatagtca ccatgctgta
 1981 caagatccct gaacttatgc ctctaactg aaattttgta ttcttgaca catctgccc
 2041 gtccctctcc tccagccca tggtaaccag catttgactc ttacttgta taagggcagc
 2101 tttataggt tccacatgta agtgagatca tgcagtgtt gctttctgt gcctggctta
 2161 ttactcag cataatgtgc accgggttca cccatgttt cataaatgac aagatttct
 2221 cctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

Figura 12

```

1  cgaagatggc  ggcgtcgcgt  cgctctcagc  atcatcacca  ccatcatcaa  caacagctcc
61  agcccgcccc  aggggcttca  gcgcgcgcgc  cggccacctc  tcccccaetc  agccctggcc
121  tggccccggg  gaccacccca  gcctctccca  cggccagcgg  cctggccccc  ttgcctccc
181  cgcggcacgg  cctagcgcgt  ccggaggggg  atggcagtcg  ggatccgccc  gacaggcccc
241  gatccccgga  cccggttgac  ggtaccagct  gttgcagtac  caccagcaca  atctgtaccg
301  tcgcgcgcgc  tcccgtggtc  ccagcgggtt  ctacttcate  tgccgctggg  gtcgctccca
361  acccagccgg  cagtggcagt  aacaattcac  cgtcgtccct  ttcttccccg  acttcttcc
421  catcttccct  tccatctccc  cctggatcga  gcttggcggg  gagccccgag  gcggccggag
481  ttagcagcac  agcaccactg  gggcctgggg  cagcaggacc  tgggacaggg  gtcccagcag
541  tgagcggggc  cctacgggaa  ctgctggagg  cctgtcgcaa  tggggacgtg  tcccgggtaa
601  agagcgtggt  ggacgcggca  aacgtaaatg  caaaggacat  ggccggccgg  aagtcttctc
661  cctgcacttt  cgctgcaggt  ttgggaagg  aggatgttgt  agaaccacta  ctacagatgg
721  gtgctaattg  ccacgctcgt  gatgatggag  gtctcatccc  gcttcataat  gcctgttctt
781  ttggccatgc  tgaggttgtg  agtctgttat  tgtgccaaag  agctgatcca  aatgcccagg
841  ataactggaa  ctatacacct  ctgcataaag  ctgctattaa  agggaaagac  gatgtgtgca
901  ttgtgttgt  gcagcacgga  gctgacccaa  acattcgga  cactgatggg  aaatcagccc
961  tggacctggc  agatccttca  gcaaaaagct  tccttacagg  tgaatacaag  aaagacgaac
1021  tcttagaagc  tgctaggagt  ggtaatgaag  aaaaactaat  ggctttactg  actcctctaa
1081  atgtgaattg  ccatgcaagt  gatggcgaa  agtcgactcc  ttacatctta  gcagcgggct
1141  acaacagagt  tcgaatagtt  cagcttcttc  ttacagcatg  tgctgatgtt  catgcaaaag
1201  acaaaagtgg  acttgtgcct  ctccataatg  catgttcata  tggacattat  gaagtccag
1261  aactgctact  aaagcatgga  gcttgtgtta  atgccatgga  tctctggcag  ttactccac
1321  tgacagaggc  tgcttccaa  aaccgtgtag  aagtctgtct  ttgttactt  agccatggcg
1381  ctgactctac  gttagtcaac  tgccatggca  aaagtgtgt  ggatatggct  ccaactccgg
1441  agcttaggga  gagattgact  tatgaattta  aaggctatcc  ttactacaa  gcagccagag
1501  aacgagactt  agctaaagt  aaaaaaacac  tcgctctgga  aatcattaat  ttcaaacac
1561  cgcagtctca  tgaacacgca  ctgcactgtg  ctgtggcctc  tctgcacccc  aaacgtaaac
1621  aagtgcacga  attgttactt  agaaaaggag  caaatgttaa  tgaaaaaat  aaagatttca
1681  tgactcccc  gcagtgtgca  gccgaagag  ccataatga  tgcatggaa  gttctgcata
1741  agatggcg  caagatgaat  gcactggaca  ccttggctca  gactgcttg  catagaccg
1801  ccttagcagg  ccactgcag  acctgccgc  tctgctgag  ttacggctct  gacccctcca
1861  tcacttccct  acaaggcttc  acagcagcac  agatgggcaa  tgaagcagtg  cagcagattc
1921  tgagtgtag  ttacggcttc  gacccctcca  tcacttccct  acaaggcttc  acagcagcac
1981  agatgggcaa  tgaagcagtg  cagcagattc  tgagtgtgca  ttctagata  gtgatcattc
2041  tacttcagcc  ttaattggtg  tcttgagag  ggaagattta  gaaggaaatc  tatccagcat
2101  gtcttccatg  tcaacatgaa  gagtacacct  atactgactt  ctgattgtga  ttatcgactc
2161  tttagggcat  cttaaagctg  agacttggaa  actgtgaagc  aactttgcag  ctctcaaat
2221  gtgaattgta  gagacttaga  gggccggcat  tccacgcccc  tacacttcgc  agcaggctac
2281  aacagagtac  acctatagct  acttctgatg  ttgattatcg  actcttagag  gcatctaaag
2341  ctggagactt  ggaactgtg  aagcaacttt  gcagctctca  aaatgtgaat  ttagagagct
2401  tagaggccg  gcattccacg  cctttacact  tcgcagcagg  ctacaaccgc  gtgtctgtg
2461  tagagtacct  gctacaccac  ggtgccgatg  tccatgccaa  agacaagggt  gcttgggtg
2521  ccttccataa  tgctgttca  tatggacact  atgaggtggc  tgagctttta  gtaaggcatg
2581  gggcttctgt  caatgtggcg  gacttatgga  aatttaccct  tctccatgaa  gcagcagcta
2641  aaggaaaagta  tgaattctgc  aagctccttt  taaaacatgg  agcagatcca  actaaaaaga
2701  acagagatgg  aaatacacct  ttggatttgg  taaaggaagg  agacacagat  attcaggact
2761  tactgaaagg  ggaatgctgt  ttgttggtg  ctgccaagaa  gggctgcctg  gcaagagtgc
2821  agaagctctg  taccacagag  aatatcaact  gcagagacac  ccagggcaga  aattcaaccc
2881  ctctgcacct  ggcagcaggc  tataataacc  tggaggtagc  tgaatatctt  ctgagcctg
2941  gagctgatgt  taatgcccag  gacaagggtg  gtttaattcc  tcttcataat  gcggcatctt
3001  atgggcatgt  tgacatagcg  gctttattga  taaaaataca  cagctgtgta  aatgcaacag
3061  ataagtgggc  gtttactccc  ctccatgaag  cagccagaa  aggaaggacg  cagctgtgcg
3121  ccttccctct  agcgcagtgt  gcagcccca  ccatgaagaa  ccagggaagg  cagacgcctc
3181  tggatctggc  aacagctgac  gatatcagag  ctttgcctgt  agatgccatg  cccccaggg
3241  ccttaccctac  ctgtttttaa  cctcaggcta  ctgtagttag  tgcttctctg  atctcaccag
3301  catccacccc  ctctgcctc  tggctgcca  gcagcataga  caactcact  ggcctttag
3361  cagagttggc  cgtaggagga  gcctccaatg  caggggatgg  cgccggggga  acagaaagga
3421  aggaaggaga  agttgctggt  cttagcatga  atatcagcca  attcttaaaa  agccttggcc
3481  ttgaacacct  tcgggataac  ttgaaacag  aacagattac  actagatgtg  ttggctgata
3541  tgggtcatga  agagtgaaa  gaaataggca  tcaatgcata  tgggcaccgc  cacaatttaa
3601  ccaaaggagt  agaaagactc  ttaggtggac  aacaaggcac  caatccttat  ttgacttttc
3661  actgtgttaa  tcagggaaac  attttgcctg  atcttgcctc  agaagataaa  gaatatcagt
3721  cagtggaaag  agagatgcaa  agtactattc  gagaacacag  agatggtggt  aatgctggcg
3781  gcatcttcaa  cagatgcaat  gtcattcgaa  ttcaaaaagt  tgtcaacaag  aagttgaggg
3841  agcgggtctg  ccaccgacag  aaggaggtgt  ctgaggagaa  tcacaacccat  cacaatgagc

```

```

3901 gcatgttggt tcatgggtct cctttcatta atgccattat tcataaaggg tttgatgagc
3961 gacatgcata cataggagga atgtttgggg ccgggattta ttttgetgaa aactcctcaa
4021 aaagcaacca atatgtttat ggaattggag gaggaacagg ctgccctaca cacaaggaca
4081 ggcatgcta tatatgtcac agacaaatgc tcttctgtag agtgaccctt gggaaatcct
4141 ttctgcagtt tagcaccatg aaaatggccc acgcgcctcc agggcaccac tcagtcattg
4201 gtagaccgag cgtcaatggg ctggcatatg ctgaatatgt catctacaga ggagaacagg
4261 cataccgaga gtatcttata acttaccaga tcatgaagcc agaagccctt tcccagaccg
4321 caacagccgc agagcagaag acctagttaa tgcctgctgg tgaaggccag atcagatttc
4381 aacctgggac tggattacag aggattgttt ctaataacaa catcaatatt ctagaagtcc
4441 ctgacagcct agaaataagc tgtttgtctt ctataaagca ttgctatagt g

```

Figura 13

1 cgcgcgcct cgtagccga aacctgccca gccggtgcc gccactgcg cagcgcggg
 61 acgacgtac gtgcgtccc ggggctggac ggagctggca ggaggggcct tgcagctc
 121 cggcgcgcg tcttcagg acccggacgg cggattcgc ctgctccgc cggcgcggg
 181 cagccggggg gcaggagcc cagcagggg cgcgcgtgg cgcggccatg ggactgcgc
 241 ggatccggtg acagcaggg gccaagcgg ccgggcccctg agcgcgtct ctcgggggg
 301 cctgcctc ctgctcgcg gccggggct cctgctccg ttgctggcg tttgctggc
 361 tttggcggc gccaggatca tctgggtcg ccgtgcgc gccggggggag cggcctgcg
 421 gagcgcgcg gccaggcgg tggagccgg cggcgagag ctgttcgagg cgtccgcaa
 481 cggggacgtg gaacgagtc agagctggt gacgcctgag aaggtgaaca gccgcgacac
 541 ggccggcagg aaatccacc cgtgcacti cggcgagggt ttggggcgg aagacgtagt
 601 tgaatatgt ctcagaaat gtgcaaatg ccaagcaggt gatgatggg gcctattcc
 661 tctcataat gcatgctct ttggtatgc tgaagtgc aatctctt tgcgcatgg
 721 tgcagacccc aatgctcag ataattgaa ttactctc tccatgaag ctgcaattaa
 781 aggaagatt gatgttgca ttgtctgt acagcatga gctgagcaa ccatccgaa
 841 tacagatga aggacagcat tggattagc agatcatct gccaaagcag tcttactgg
 901 tgaatataa aaagatgaac tcttagaaag tgcaggagt ggcaatgaag aaaaaatgat
 961 ggcttactc acaccataa atgtcaactg ccacgcaagt gatggcagaa agtcaactc
 1021 attacattg gcagcaggat ataacagat aaagattga cagctgtac tgaacatgg
 1081 agctgatgc catgctaaag ataaagtg tctgtacca ttacacaatg cctgtctta
 1141 tggctattat gaagtaactg aacttttgg caagcatggt gcctgtgtaa atgcaatga
 1201 ctgtggcaa ttactctc ttcatgagg agcttctaa aacagggtg aagtatgtc
 1261 tcttctta agttatggt cagacccaac actgctaat tgcacaata aaagtctat
 1321 agacttggc cccacaccac agttaaaga aagattagc tatgaattt aaggccactc
 1381 gttgctcaa gctgcagag aagctgatg tactgaatc aaaaaacat tctcttga
 1441 aatggtgat tcaagcatc ctaaacaca tgaacagca ttgcatgtg ctgctgcatc
 1501 tccatctcc aaaaagaaag aatatgtga actgttcta agaaaaggag caaacatcaa
 1561 tgaagagct aaagaattct tgaactct gcacgtggc tctgagaaag ctcataatga
 1621 tttgttgaa gtatgtgtg aacatgaagc aaaggttat gctctggata atctgtgca
 1681 gacttctca cacagagctg catattgtg tcatctaca acctgccgc tactctgag
 1741 ctatgggtg gatcctaaca ttatccct tcagggtct actgcttac agatgggaa
 1801 tgaagatga cagcaactc tcaagaggg tatctatta gtaattcag aggcagacag
 1861 acaattgct gaagctgca aggttgaga tctgaaact gtaaaaaac tgtgtactgt
 1921 tcagagtgc aactgcagag acattgaag gcgtcagct acaccactc atttgacg
 1981 tgggtataa agagtgtcg tgggtgaata tctgtacag catggagctg atgtgcatg
 2041 taaagataa ggaggcctt tacccttga caatgcatg tctatggac ataatgaat
 2101 tgcagaacti ctgttaaac atggagcag agttaatga gctgattat ggaaattac
 2161 acctttacat gaagcagcag caaaaggaaa atatgaaat tgcacactc tgcicagca
 2221 tgggtcagac cctacaaaa aaacaggga tggaaatac ccttggatc ttgttaaga
 2281 tggagatac gatattcaa atctgttag gggagatga gctttgctg atgctgcaa
 2341 gaagggtgt ttagccagag tgaagaagt gtctctct gataatgtaa atgcccga
 2401 taccacaggc agacattcaa cactttaca tttagcagc gttataata attagaagt
 2461 tgcagatgt ttgtacaac acggagctg tgtgaatgc caagacaaag gaggactat
 2521 tctttacat aatgcagcat ctacgggca ttagatgta gcagctctac taataagta
 2581 taatgcatgt gcaatgcca cggacaaat ggcttcaca ctttgcacg aagcagcca
 2641 aaaggacga acacagctt gtgttgtt gctagccat ggagctgacc cgaacttaa
 2701 aaatcaggaa ggacaaacac ctttagatt agttcagca gatgatgta gcgtctct
 2761 gacagcagg atgccccat ctgctgccc cttgtttac aagcctcaag tgcctaatg

2821 tgtgagaagc ccaggagcca ctgcagaigc tctctcttca ggtccatcta gcccatcaag
 2881 cctttctgca gccagcagtc ttgacaactt atctgggagt tticagaac tgtcttcagt
 2941 agttaagtca agtggaaacag aggggtgcttc cagtttggag aaaaaggagg ttccaggagt
 3001 agattttagc ataactcaat tctgaaggaa tcttggactt gagcacctaa tggatatatt
 3061 tgagagagaa cagatcactt tggatgtatt agttgagatg gggcacaagg agctgaagga
 3121 gattggaatc aatgcttatg gacataggca caaactaatt aaaggagtcg agagacttat
 3181 ctccggacaa caaggcttta acccatattt aacttgaac acctctgga gtggaacaat
 3241 tcttatagat ctgtctcctg atgataaaga gtttcagtct gtggaggaag agatgcaaa
 3301 tacagttcga gagcacagag atggaggta tgcagggtga atcttcaaca gatacaatat
 3361 tctcaagatt cagaagggtt gtaacaagaa actatgggaa agatacactc accggagaaa
 3421 agaagtttct gaagaaaacc acaaccatgc caatgaacga atgctatttc atgggtctcc
 3481 ttttggat gcaattatcc acaaaggcct tcatgaaagg catgcgtaca taggttggtat
 3541 gtttggagct ggcatattt ttgctgaaaa ctcttccaaa agcaatcaat atgtatatgg
 3601 aattggagga ggtactgggt gtccagtcca caaagacaga tcttgttaca ttgcccacag
 3661 gcagctgctc ttgtccggg taaccttggg aaagtcttc ctgcagtcca gtgcaatgaa
 3721 aatggcacat tctctccag gtcacactc agtcactggt aggccagtg taaatggcct
 3781 agcattagct gaatatgta ttacagagg agaacaggct taltctgagt atttaattac
 3841 ttaccagatt atgaggcctg aaggatggt cgtatggata atagtattt taagaaacta
 3901 attccactga acctaaaac atcaaaagcag cagtggcctc tacgtttac tctttgtctg
 3961 aaaaaaaatc atcttgcoca caggcctgtg gcaaaaggat aaaaatgtga acgaagtta
 4021 acattctgac ttgataaagc ttaataatg lacagtgtt tctaaatatt tctgtttt
 4081 tcagcacttt aacagatgcc attccagggt aaactgggtt gctgtacta aattataaac
 4141 agagttaact tgaacctttt atatgttatg catgtattct aacaaactgt aatgccctca
 4201 acagaactaa tttaactaat acaataactgt gttctttaa acacagcatt tacactgaat
 4261 acaatticat ttgtaaaact gtaataaaga gctttgtac tagccagta ttatttaca
 4321 ttgctttgta atataaatct gttttagaac tgcagcgggt taaaaattt ttcatatgt
 4381 attgttcatc tatacttcat cttacatct catgatggag tgatcttac attgatcc
 4441 agaggctatg ttcagttgtt agttgggaaa gatggagta tcagatttaa ttgcccag
 4501 ggagccttta tctgtcatta gaaatcttc tcaattaaga acttatgaat atgctgaaga
 4561 tttaattgt galaccttg tatgtatgag acacattcca aagagctcta actatgatag
 4621 gtcttgatta cttaaagaagc tctttactg gcctcaatt ctactttca tgttgaaaa
 4681 ttcttgagc tcttctgtg aaaattagag caaagtgtc ctgttttta gagaaactaa
 4741 atctgtctg tgaacaatta tigtgtctt tcatggaac ataagtagga tgttaacatt
 4801 tccagggtgg gaagggtaat cctaaatcat ttcccaatct attctaatta ccttaaatct
 4861 aaaggggaaa aaaaaatca caaacaggac tgggtagtgt ttatcctaa gtatatttt
 4921 tctgttctt ttacttgggt ttattgtctg tatttatagc caatctatac atcatgggt
 4981 aacttaacc agaactataa aatgtagtgt tticagtcct cttcaggcct cctgaatggg
 5041 caagtgcagt gaaacagggt cttctgtctc ctgggttttc tctccatgat gttatgccca
 5101 attggaaata tgcgtcagt ttgtgcacca tatggtagcc acgctgtgc tcagtttggc
 5161 agctatagaa ggaatgctg tccataaaa tgcctccct atttctaata taacactctt
 5221 ttccaggaag catgcttaag catcttgta cagagacata catccattat ggcttgcaa
 5281 tctctttat ttgtgactc tagtccctt caaagtcag gaaagattt tactcactta
 5341 atgaggacat tccccatcac tgtctgtacc agttacatt tatttacgt ttattcagt
 5401 ctgtaaatca actggcctt tgcagtaact tgtacataaa gtgctagaaa atcatgttc
 5461 ttgtcctgag taagagtaa tcagagtaag tgcattctg gatgtgttc tgtgatgaa
 5521 attatgata ttatttaaga agtcaaatcc tgatctgaa gtgctttta lacagctctc
 5581 taataattac aaatatccga aagtcatttc ttggaacaca agtgagatg gccaaattt
 5641 atatgaatt ttacagatt cttaagcttc aggtttata attagaagat aatgagagaa
 5701 ttaatgggt ttatattac attatctct aactatgtag ccatattac tcaccctatg
 5761 agtgaatctg gaattgctt tcatgtgaaa tcatgtgtg ctatgagtt acaatactgc

5821 aaacigtgtt attttaicta aaccattgct taatgagtgt gttttccat gaatgaatat
 5881 accgtgggtc atatgttagc atggcagcat ttcagatag ctttttgttt gtggggaagt
 5941 tgggggtttg gggggagggg gagtattagt acgtgcatg gaatagccta cttataatg
 6001 atgggaatgc ttttctttt gtttgggat tttttttt gaagtgaaat ttaactttt
 6061 gtgccagtag tactattata cccatcttca gtgtcttact tgtactgtat caaattccat
 6121 accctcattt aattcttaat aaaacgttc acttgtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 6181 aaaaaaaaaa

Figura 14

1 cgcccgccca gccccggggg cagggaaagc ctaaattacg gaattaccgc gagcaaggag
 61 cgcgggaatcg gggagcgtcc ggagctagct ggatcctcta ggcaggatgg tgatgggaat
 121 ctttgcaaat tgtatcttct gtttgaaagt gaagtactta cctcagcagc agaagaaaaa
 181 gctacaaact gacattaagg aaaatggcgg aaagtttcc ttttcgttaa atcctcagtg
 241 cacacatata atcttagata atgctgatgt tctgagtcag taccaactga attctatcca
 301 aaagaaccac gticatatgg caaaccacaga ttatatatgg aaatctatca gaaaaagag
 361 actcttggat gtaagaatt atgacctta taagccctcg gacatcacac caccctctga
 421 tcagaaggcg agcagttctg aagtgaanaa agaaggctta tgcgggaca gtgccacaga
 481 ggagggaagac actgtggaac tcactgaggt tggatgcag aatgttgaaa ttcctcaict
 541 tctcaagat tttgaagtg caaaatataa caccctggag aaagtgggaa tggaggaggg
 601 ccagggaagct gtggtgggg agcttcagtg ttgcggggac tccagggaact gtccttct
 661 gatatactca cacttctcc tggatgatgg catggagact agaagacagt ttgtataaa
 721 gaaaacctct gaagatgcaa gtgaatact tgaanaatc attgaagaac tgaagaaaca
 781 aggatttcta ctaagagaac attcacacc tgaagcaacc caattagcat ctgaacaatt
 841 gcaagcattg ctttggagg aagtcatgaa tcaagcact ctgagccaag aggtgagcga
 901 tttagtagag atgatttggg cagaggccct gggccacctg gaacacatgc tictcaagcc
 961 agtgaacagg attagcctca acgatgtgag caaggcagag gggattctcc ttctagtaaa
 1021 ggcagcactg aaaaatggag aaacagcaga gcaattgcaa aagatgatga cagagttta
 1081 cagactgata cctcacaaa gcaaatgcc caaagaagt aacctgggac tattggctaa
 1141 gaaagcagac cctgccagc taataagaga calggtaat gtctgtgaaa ctaattgtc
 1201 caaaccacac ccaccatccc tggccaaata ccgagcttg aggtgcaaaa ttgagcatg
 1261 tgaacagaat acigaagaat tctcagggt tagaaaagag gttttgcaga atcatcacag
 1321 taagagccca gtggatgct tgcagatatt tagagttgac agagtgaatg aaaccacaga
 1381 gttttgagc aaacttgta atgtgaggcc ctgttgcac ggttctcctg tacaanaaat
 1441 cgtgggaatc ttgtgctgag ggttgccttt acccaagta gtggaagatc gtggtgtgca
 1501 aagaacagac gtcggaaacc ttggaagtgg gatttattc agtgattcgc tcagtacaag
 1561 tatcaagtac tcacacccgg gagagacaga tggcaccaga ctctgtctca ttgtgacgt
 1621 agccctcgga aagtgtatgg acttacatga gaaggactt ccttaactg aagcaccacc
 1681 aggtctagac agtgtgcatg gatttcaca aacagcctct gtcaccacag actttgagga
 1741 tgatgaattt gttgtctata aaaccaatca ggttaaaatg aaatatata taaatttc
 1801 catgcctgga gatcagataa aggacttca tctagtgtat calactgaat tagaggaata
 1861 cagacctgag ttttcaaat tticaaagg tgaagattac cagttaccag atgccaanaa
 1921 ttccagcagc accaaggccg gcctccagga tgcctctggg aacttggttc ctctggagga
 1981 tgtccacatc aaaggagaa tcatagacac ttagccagc gtcattgttt ttacagata
 2041 cacaataaaa agtcacgtgc ccattgagc aaaaatatac ttcccttgg atgacaaggc
 2101 cgctgtgtgt ggcttcgaag ccttcacaa tgggaagcac atagtggag agattaaaga
 2161 gaaggaagaa gccagcaag agtacctaga agccgtgacc cagggccatg gcgcttacct
 2221 gatgagtcag gatgtccgg acgttttac tgaagtgtt ggaaacttac ccctaaggc
 2281 taagggttct ataaaaata cctacatcac agaactcagc atctgggca ctgttggtgt
 2341 cttttcatg cccgccacc tagcacctg gcaacaggac aaggcttga atgaaaacct
 2401 tcaggataca gtagagaaga ttgtataaa agaaatagga acaaagcaaa gcttcttct
 2461 gactatgtct attgagatgc cgtatgtgat tgaattcatt ttactgata cacatgaact
 2521 gaaacaaaag cgcacagact gcaagctgt cattagcacc atggaaggca gctccttaga
 2581 cagcagtggg tttctctcc acatcggtt gtctgtgcc tatctccaa gaatgtgggt
 2641 tgaanaaat ccagaaaaa aaagcgagc ttgcatgct gtcttcaac ccgactcga
 2701 tctgacctic cctgacctag ccagtggag cgaagtatt attgtcttg actgtccag

2761 ttccatggag ggtgtgacat tcttgaagc caagcaaac accitgcatg cgctgtcctt
 2821 ggtgggtgag aagcagaag taaatattat ccagttcggc acaggttaca aggagctatt
 2881 ttctatcct aagcataca caagcaatac cacggcagca gatttcatca tgtctgccac
 2941 acctaccatg gggaacacag acttctggaa aacactccga tatcttagct taltgtacc
 3001 tgctcgaggg tcacggaaca tccctcgggt gctgatggg cacctccagg atgagagcct
 3061 gacattacag ctcgtgaaga ggagccgcc gcacaccagg ttatcgcct gcggtatcgg
 3121 ttctacagca aatcgtcacg tcctaaggat ttgtcccag tgtggcgcc gagtattga
 3181 atatttaat gcaaaatcca agcatagtig gagaaaacag atagaagacc aatgaccag
 3241 gctatgtct ccgagttgcc actctgtctc cgtcaaatgg cagcaactca atccagatgc
 3301 gcccgaggcc ctgcaggccc cagcccagggt gccatccttg ttgcgaatg atcgactcct
 3361 tgtctatgga ttcatcttc actgcacaca agcaactctg tgtgactaa tcaagagaa
 3421 agaatttgt acaatgggtg cgactactga gcttcagaag acaactggaa ctatgatcca
 3481 caagctggca gcccgagctc taatcagaga ttatgaagat ggcatcttc acgaaaatga
 3541 aaccagtcag gatatgaaa acaaacctt gaaatctctg attattaac tcaglaaaga
 3601 aaactcttc ataacacaat ttacaagctt tgtggcagtt gagaaaagg atgagaatga
 3661 gtcgccttt cctgatatt caaaagtgc tgaactatt gccaaagaag atgtagactt
 3721 cctgccctac atgagctggc aggggggagcc ccaagaagcc gtcaggaacc agtctcttt
 3781 agcatcctct gagtggccag aattacgtt atccaaacga aaacatagga aattccatt
 3841 ttccaaaaga aaatggaat tatctcagcc agaagttct gaagatttg aagaggatgg
 3901 cttaggtgta ctaccagct tcacatcaaa ttggaacgt ggaggtgtgg aaaagclatt
 3961 ggatttaagt tggacagagt catgtaaac aacagcaact gaaccactat ttaagaaagt
 4021 cagtcctgg gaaacatcia ctctagctt ttctctatt ttggctccgg ccgttggttc
 4081 ctatcttacc ccgactacc gcgtcacag tctgtctcc tigtcttg cctcatatcg
 4141 tcaggtagct agtttcggti cagctgtcc tccagacag ttgatgcat ctcaattcag
 4201 ccaaggccct gtgcctggca ctgtgtga ctggatcca cagtcggcgt ctgtccac
 4261 aggacctccc cagaaccac ctctgcacc ctattgtgc attgtttt caggagctc
 4321 attagctct gcacagtct ctccactga acatctgga ggctttacta ccaggccttc
 4381 tgctggcacc ttccctgagc tggattccc ccagcttcat ttctcttc ctacagacc
 4441 tgatcccat agaggtttg ggtcttaca tccctctgt tactctct ttcatttca
 4501 accttcgca gctctttga ctgccaacct taggtgcca atggcctct ctttacctga
 4561 ggctctttgc agtcagtcac ggactacccc agtagatctc tgtctctag aagaatcagt
 4621 aggcagctc gaaggaaagc gatgtcctgt cttgtcttt caaagttctg acacagaaag
 4681 tgatgagcta tcagaagtac ttcaagacag ctgctttta caataaagt gtgatacaa
 4741 agatgacagt atcccgtgt tcttggaaat aaaagaagag gatgaaatag tgtgcacaca
 4801 aactggcag gatgtgtgc ctggacaga actctcagt ctacagacag aggatggctt
 4861 ctggaaactt acaccagaac tgggacttat attaaactt aatacaaatg gttgcacag
 4921 cttctttaa caaaaaggca ttcaatctt aggtgtaaaa ggaagagaat gtcctctgga
 4981 cctaattgcc acaatgctgg tactacagtt taticgcacc aggttggaaa aagagggaat
 5041 agtgttcaa tcaatgatga aaatggatga ccttctatt tccaggaata ttccctggc
 5101 tttagggca ataaagcaag caagtgaatg ggtaagaaga actgaaggac agtaccatc
 5161 tatctgcca cggcttgaac tggggaacga ctgggactct gccaccaagc agttgtcggg
 5221 actccagccc ataagcactg tgtccctct tcatagagtc ctccattaca gtcaaggcta
 5281 agtcaaatga aactgaattt taaactttt gcatgctct atgtagaaa taatcaaatg
 5341 ataatagata attataatga aacttatta aggttcatt cagttagca attactgtct
 5401 taaaaatta agtggaaaga gaattactt aatcaactaa caagcaataa taaaatgaa
 5461 cttaaaataa aaaaaaaaa aaaaaaaaa