

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 684**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 45/00** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**C07K 14/72** (2006.01)

**C12N 15/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2008 E 08838509 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2217730**

54 Título: **Procedimiento para someter a ensayo variantes del MC1R y marcadores mitocondriales en muestras de piel**

30 Prioridad:

**11.10.2007 WO PCT/CA2007/001790**

**15.10.2007 US 999074 P**

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

**28.11.2014**

73 Titular/es:

**MITOMICS INC. (100.0%)  
SUITE 1000 290 MUNRO STREET  
THUNDER BAY, ON P7A 7T1, CA**

72 Inventor/es:

**PARR, RYAN;  
BIRCH-MACHIN, MARK;  
HARBOTTLE, ANDREW;  
THAYER, ROBERT;  
CREED, JENNIFER;  
MAGGRAH, ANDREA;  
ROBINSON, KERRY;  
DAKUBO, GABRIEL;  
REGULY, BRIAN y  
MAKI, KATRINA**

74 Agente/Representante:

**CAPITAN GARCÍA, Nuria**

**ES 2 523 684 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para someter a ensayo variantes del MC1R y marcadores mitocondriales en muestras de piel

5 **Objeto de la Invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para predecir, diagnosticar y supervisar estados de la piel y enfermedades de la piel. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos que vinculan técnicas de muestreo de piel no invasivas con ensayos para determinar mutaciones mitocondriales y variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R) para su uso como herramienta integral para predecir y supervisar enfermedad, fotoenvejecimiento y daño por radiación ultravioleta (RUV). Los procedimientos también son útiles para evaluar la eficacia y la respuesta ante agentes terapéuticos, productos para el cuidado de la piel y regímenes de tratamiento.

15 **Antecedentes de la Invención**

La enfermedad de la piel representa uno de los principales retos de la atención sanitaria en el mundo actual. Con más de un millón de casos nuevos de cáncer de piel diagnosticados cada año en Estados Unidos (National Cancer Institute, www.cancer.gov), la predicción y el diagnóstico de la enfermedad de la piel son aspectos importantes de su abordaje. Los procedimientos de diagnóstico actuales se basan principalmente en observaciones visibles y biopsias. Sin embargo, los procedimientos de detección que se basan en observaciones visibles, no son necesariamente eficaces para diagnosticar estados o enfermedades de la piel y no detectan el riesgo de enfermedad hasta que se hayan producido manifestaciones clínicas. Además, los procedimientos invasivos tales como las biopsias, no sólo son traumáticos para un sujeto que se somete a la prueba, sino que también aumentan la probabilidad de infección. Estos procedimientos también los debe realizar un médico para que se desarrollen con seguridad y, típicamente, no proporcionan una muestra enriquecida de células de la superficie de la piel, que son las células que, por lo general, participan en una reacción.

Por lo tanto, los procedimientos no invasivos de diagnóstico y supervisión de estados y enfermedades de la piel, representan herramientas importantes para la atención de los pacientes y para evaluar la eficacia de agentes terapéuticos existentes y nuevos, productos para el cuidado de la piel y regímenes de cuidado de la piel. Además, estos procedimientos pueden proporcionar información importante en relación con los cambios genéticos específicos subyacentes al estado de la piel de un sujeto, así como su predisposición genética a desarrollar una enfermedad de la piel. La identificación de estos cambios genéticos identifica posibles objetivos farmacológicos y medidas preventivas y puede ser esencial para determinar si una persona responderá realmente a un agente terapéutico, un producto para el cuidado de la piel o un tratamiento en particular. Asimismo, los procedimientos de detección y diagnóstico son importantes para evaluar la seguridad de estos tratamientos, productos y medidas.

*Daño por radiación ultravioleta (RUV)*

Con frecuencia, factores desconocidos o poco cuantificables contribuyen al daño de la piel como consecuencia de la radiación ultravioleta (RUV). Los factores conocidos incluyen color de la piel, frecuencia e intensidad de la exposición a RUV, producción de melanina, ratio de eumelanina y feomelanina y uso de protectores solares, entre otros. Los factores conductuales desempeñan un papel importante en la gravedad y el nivel de daño de la piel por RUV, pero es extremadamente difícil evaluarlos clínicamente, ya que dependen de la precisión de la información aportada por el paciente y, con frecuencia, de una conciencia errónea de los hábitos de exposición al sol del paciente. Muchos individuos que usan bloqueadores solares regularmente también los usan de forma incorrecta, al aplicarlos en cantidad insuficiente o no aplicarlos de nuevo a los intervalos recomendados, lo que crea una falsa sensación de protección que puede dar lugar a un aumento de la exposición a la RUV.

Estos factores, entre otros, hacen necesaria la disponibilidad de una herramienta para supervisar de cerca del éxito y la idoneidad de las medidas preventivas y los tratamientos aconsejados para evitar el daño por RUV en la piel, con consecuencias en el espectro desde el envejecimiento prematuro hasta el aumento del riesgo de cáncer de piel. En un esfuerzo para valorar por completo el estado de la piel de un individuo, y como consecuencia su riesgo de fotoenvejecimiento y cáncer de piel, es indispensable que se proporcione a los profesionales sanitarios tanta información como sea posible para que conozcan y comuniquen los factores de riesgo de su paciente. Por lo tanto, sería deseable contar con un procedimiento de diagnóstico para evaluar la predisposición genética de un individuo a los efectos dañinos de la RUV, así como para identificar factores de riesgo asociados con los hábitos de exposición al sol particulares del individuo. Un procedimiento de este tipo puede incluir la recogida de una muestra de ADN de la epidermis o la dermis de la piel de un individuo para cuantificar los biomarcadores mitocondriales indicativos de daño por RUV, así como el genotipado del receptor de melanocortina 1 (MC1R), para identificar variantes implicadas en el control de la melanogénia. El uso combinado de ambas pruebas en tándem proporciona una herramienta integral para que los profesionales sanitarios supervisen, aconsejen y traten a pacientes, al tener en cuenta tanto la predisposición genética del paciente al fotoenvejecimiento o el cáncer como las consecuencias de la exposición continuada del paciente a radiación ultravioleta.

*Deleciones mitocondriales asociadas con la RUV*

El tejido epitelial humano es muy complejo y comprende numerosos tipos de células. En consecuencia, la identificación de biomarcadores de células epiteliales humanas es de especial importancia. Para determinar un marcador fiable de exposición acumulada a RUV en la piel humana, los inventores y otros han estudiado la idea novedosa de usar ADN mitocondrial (ADNmt), en lugar de ADN nuclear, como biomarcador de daño en el ADN inducido por UV (Pang et ál., 1994; Berneburg et ál., 1997; Birch-Machin et ál., 1998; Birch-Machin, 2000).

El uso del daño en el ADNmt como biomarcador para la exposición al sol acumulada en la piel humana es un campo de investigación relativamente nuevo y el trabajo anterior simplemente ha comparado el daño en el ADNmt para distinguir entre la piel protegida frente al sol y la expuesta al sol (Pang et ál., 1994; Berneburg et ál., 1997; Birch-Machin et ál., 1998). Este planteamiento es limitado porque el cáncer de piel no melanómico (CPNM) se forma predominantemente en sitios del cuerpo que están expuestos al sol "habitualmente" al estar al aire libre en oposición con los sitios que están expuestos al sol "ocasionalmente" (Armstrong, 2004).

En la solicitud PCT del presente solicitante en trámite en relación con la publicación n.º WO/06/111029, se identificó una deleción de 3895 pb en el ADN mitocondrial humano (ADNmt) como biomarcador del daño en el ADN inducido por UV. Esta deleción se identificó en el arco menor que se extiende de los nucleótidos 547 a 4443. Esta deleción se había asociado anteriormente con el síndrome de Kearns-Sayre y la oftalmoplejía externa progresiva crónica (Moraes et ál., 1995).

Los ejemplos de la publicación PCT n.º WO/06/111029 demuestran que la frecuencia de aparición de la deleción de 3895 pb en el ADNmt es significativamente diferente entre sitios del cuerpo que expuestos al sol "habitualmente" frente a "ocasionalmente". Además, los ejemplos demostraron la relación entre la etiología de la deleción de 3895 pb y el componente de RUV de la luz solar al inducir la deleción de 3895 pb in vitro con dosis subletales repetitivas de una fuente de luz UVA+UVB.

Es importante el hecho de que las muestras de piel analizadas en el documento WO/06/111029 no se evaluaron con respecto a la predisposición genética del individuo al daño solar y el riesgo de cáncer de piel. Además, estas muestras se obtuvieron por procedimientos dolorosos de toma de piel conocidos anteriormente en la técnica.

*Genotipado del receptor de melanocortina 1 (MC1R)*

El gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R) codifica una proteína receptora unida a la membrana que es esencial para la síntesis de melanina. La región codificante del MC1R es muy polimórfica y se ha informado de asociaciones de variantes con fenotipos de pigmentación y riesgo de melanoma y cáncer de piel no melanómico (Rees, Pigment Cell Research, vol. 13(3), 135-140(6), junio de 2000; Kanetsky et ál. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention vol. 13, 808-819, mayo de 2004). La tasa de incidencia del melanoma es mayor en los individuos de piel clara sensibles al sol, lo que sugiere que la capacidad de respuesta ante la exposición UV mediante el aumento de la síntesis de melanina es un factor importante en la defensa frente al melanoma. En estudios de familias se ha demostrado que los individuos de piel clara y cabello pelirrojo albergan cambios funcionalmente significativos en ambos alelos del MC1R. Los alelos D84E, R142H, R151C, R160H y D294H tienen una penetrancia alta para cabello pelirrojo y piel clara. También son factores comunes en el riesgo de melanoma dos alelos de penetrancia reducida (V60L, V92M).

Por lo tanto, el MC1R es un determinante principal de la sensibilidad al sol y un factor de riesgo genético para el cáncer de piel. La evaluación del ADN o la secuencia de aminoácidos del gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R) para identificar si determinadas variantes que se asocian con el aumento de la sensibilidad al sol, la propensión al daño en el ADN y el aumento del riesgo de cáncer de piel están presentes, proporciona una herramienta valiosa para identificar pacientes con un riesgo mayor que necesitan medidas de supervisión y tratamientos más agresivos. La valoración de las características fenotípicas asociadas con la sensibilidad al sol por sí solas no podría aclarar este riesgo aumentado.

*Muestreo de piel*

Los procedimientos actuales para la toma de muestras de piel para su uso en el diagnóstico o la caracterización de enfermedades, tales como el cáncer de piel, incluyen procedimientos invasivos o dolorosos que pueden provocar molestias sustanciales al individuo sometido a las pruebas. Los ejemplos de procedimientos actuales para la toma de muestras de piel incluyen la biopsia en sacabocados, la retirada de cinta adhesiva (*tapelift*) y la escisión quirúrgica. Además de las molestias provocadas por los procedimientos actuales de toma de piel, estos procedimientos también los debe realizar un médico para que se desarrollen con seguridad.

Estas técnicas invasivas tienen otras desventajas, que incluyen el riesgo de infección, la incomodidad de la toma de la muestra y la posibilidad de que se pierdan o se identifiquen erróneamente las muestras tomadas. La infección y la incomodidad se magnifican en situaciones en las que es necesaria una toma de muestras frecuente o regular, tal como con los regímenes de supervisión de la exposición a RUV y la evaluación de tratamientos de larga duración. Además, el tiempo y el coste asociados con estos procedimientos de prueba invasivos dificultan la realización de un genotipado con rapidez y la evaluación del daño en el ADN para grandes poblaciones de

individuos. Por lo tanto, sería deseable proporcionar una metodología de toma de piel no invasiva o mínimamente invasiva que se pueda desarrollar con facilidad y rapidez en un entorno doméstico, clínico o cosmético.

5 Estos antecedentes se proporcionan con el propósito de dar a conocer información que el solicitante cree que puede ser de importancia para la presente invención. No se pretende necesariamente, ni se debe interpretar así, que la información anterior constituya la técnica anterior frente a la presente invención.

### Descripción de la Invención

10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos para someter a ensayo variantes del MC1R y marcadores mitocondriales en muestras de piel. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de diagnóstico para determinar el estado de la piel y la predisposición genética de un sujeto al daño por RUV, que comprende:

15 (a) someter a ensayo una muestra de piel del sujeto para una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt), en el que la anomalía es una deleción de 3895 pb en el ADNmt entre los ácidos nucleicos 546 a 4444 del genoma del ADNmt;

20 (b) someter a ensayo una muestra de tejido del sujeto para una o más variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R), en el que las una o más variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M; y

25 (c) determinar el estado de la piel y la predisposición genética del sujeto al daño por RUV basándose en la detección de la anomalía en el ADNmt y la(s) variante(s) del MC1R en las muestras de piel y tejido, respectivamente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del procedimiento de la invención para predecir el fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel o para determinar un tratamiento profiláctico o terapéutico para evitar o mejorar el fotoenvejecimiento, daño por RUV o cáncer de piel.

30 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para supervisar la respuesta de un sujeto a un tratamiento preventivo o terapéutico para el fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel, que comprende:

35 (a) someter a ensayo una primera muestra de piel del sujeto para una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt), en el que la anomalía es una deleción de 3895 pb en el ADNmt entre los ácidos nucleicos 546 a 4444 del genoma del ADNmt;

40 (b) someter a ensayo una muestra de tejido del sujeto para una o más variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R), en el que las una o más variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M;

45 (c) determinar el estado de la piel y la predisposición genética del sujeto al daño por RUV basándose en la detección de la anomalía en el ADNmt en la primera muestra de piel y las una o más variantes del MC1R en la muestra de tejido;

(d) someter a ensayo una segunda muestra de piel del sujeto para la anomalía en el ADNmt transcurrido un periodo de tiempo prescrito después del tratamiento preventivo o terapéutico para el fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel;

50 repetir la etapa (d) en intervalos regulares a lo largo de un periodo de tiempo prescrito; y

55 comparar el nivel de anomalía en el ADNmt entre la primera muestra de piel y las muestras de piel adquiridas en intervalos regulares para detectar cambios en la anomalía en el ADNmt, supervisando así la eficacia del tratamiento.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de cribado para un agente terapéutico o cosmético eficaz para el tratamiento del fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel, que comprende:

60 (a) someter a ensayo una primera muestra de piel de un sujeto para una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt), en el que la anomalía es una deleción de 3895 pb en el ADNmt entre los ácidos nucleicos 546 a 4444 del genoma del ADNmt;

(b) someter a ensayo una muestra de tejido del sujeto para una o más variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R), en el que las una o más variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M;

5 (c) determinar el estado de la piel y la predisposición genética del sujeto al daño por RUV basándose en la detección de la anomalía en el ADNmt en la primera muestra de piel y las una o más variantes del MC1R en la muestra de tejido;

10 (d) someter a ensayo una segunda muestra de piel del sujeto para la anomalía en el ADNmt transcurrido un periodo de tiempo prescrito después del tratamiento con el agente terapéutico o cosmético; y

(e) comparar el nivel de anomalía en el ADNmt en la primera muestra de piel y la segunda muestra de piel frente a un control para determinar la eficacia del agente terapéutico o cosmético.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit de diagnóstico para determinar el estado de la piel y la predisposición genética de un sujeto al daño por RUV, que comprende:

(a) material para tomar muestras de tejido; y

20 (b) cebadores, sondas y reactivos adecuados para llevar a cabo el genotipado del receptor de melanocortina 1 (MC1R) y la detección de una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt);

25 en el que la anomalía en el ADNmt es una deleción de 3895 pb en el ADNmt entre los ácidos nucleicos 546 a 4444 del genoma del ADNmt y en el que el genotipado del MC1R comprende someter a ensayo una o más variantes del MC1R seleccionadas del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M.

### Descripción de las Figuras

30 Estas y otras características de la invención resultarán más evidentes en la siguiente descripción detallada en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 muestra datos de PCR en tiempo real relativos a los niveles de deleción de 3895 pb del ADNmt en muestras de piel tomadas de la nariz y el talón usando el procedimiento de la presente invención.

35 La figura 2 muestra datos de PCR en tiempo real relativos a los niveles de deleción de 3895 pb del ADNmt en células epiteliales tomadas de diversos sitios del cuerpo usando el procedimiento de la presente invención.

40 La figura 3 muestra datos de PCR en tiempo real relativos a los niveles de deleción de 3895 pb del ADNmt en células epiteliales tomadas de diversos sitios del cuerpo usando el procedimiento de la presente invención.

La figura 4 es un gel que muestra la presencia de productos de amplificación presentes en muestras tomadas a partir de diversos procedimientos de toma de piel no invasivos.

45 La figura 5 es un gel que muestra la presencia de productos de amplificación presentes en muestras tomadas a partir de diversos procedimientos de toma de piel no invasivos.

Las figuras 6 a 11 muestran los resultados de genotipado para sujetos sometidos a pruebas de variantes alélicas.

50 La figura 12 muestra un gel que proporciona resultados de una prueba de ensayo para la variante alélica R160H.

La figura 13 muestra una gráfica que representa el nivel de deleción de 3895 pb del ADNmt de una población clasificada en cohortes de edad.

### 55 Exposición Detallada de la Invención

La presente invención proporciona procedimientos de predicción, diagnóstico y supervisión de estados de la piel y enfermedades de la piel. Los procedimientos comprenden vincular técnicas de muestreo de piel no invasivas con ensayos que determinan mutaciones mitocondriales y variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R). A este respecto, los procedimientos proporcionan una herramienta integral para evaluar la predisposición genética y los factores de riesgo asociados con enfermedad, envejecimiento daño por radiación ultravioleta (RUV). Los procedimientos también permiten la evaluación de respuesta de un paciente ante agentes terapéuticos, productos para el cuidado de la piel y regímenes de tratamiento.

65 *Definiciones*

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de aproximadamente +/-10 % del valor indicado. Se ha de entender que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado que se proporcione en el presente documento, se haga o no referencia a ella de forma específica.

10 Tal como se usa en el presente documento, "alelos" significa una de varias formas alternativas de una secuencia de ADN dada que ocupa un lugar específico en un cromosoma.

15 Tal como se usa en el presente documento, "umbral del ciclo" ( $C_T$ ) es el punto en el que la amplificación objetivo de una secuencia de ácido nucleico se eleva por encima del fondo, según indica una señal como una señal de fluorescencia. El  $C_T$  está relacionado inversamente con la cantidad de la secuencia que se estudia.

20 Tal como se usa en el presente documento, "diagnóstico" o "diagnosticar" significa usar la presencia o ausencia de una mutación o combinación de mutaciones como un factor en el diagnóstico o el abordaje de una enfermedad. La detección de la(s) mutación/mutaciones puede ser una etapa del diagnóstico de una enfermedad.

25 Tal como se usa en el presente documento, "deleciones" significa la eliminación de una región de ADN o ADNmt de una secuencia contigua de un ácido nucleico. Las deleciones pueden variar en tamaño de una base hasta miles de bases o más grande.

30 Tal como se usa en el presente documento, "ADN mitocondrial" o "ADNmt" es ADN presente en mitocondrias.

35 Tal como se usa en el presente documento, "mutación" engloba cualquier modificación o cambio en el ADN nucleico o mitocondrial con respecto a la secuencia natural, incluidas, sin limitación, mutaciones puntuales, transiciones, inserciones, transversiones, traslocaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones, recombinaciones o combinaciones de las mismas. La modificación o el cambio de la secuencia se pueden extender desde el cambio de una sola base a la adición o eliminación de un fragmento de ADN completo.

40 El término "muestra" se refiere a cualquier preparación procedente de la piel de un sujeto. Por ejemplo, se puede usar una muestra de células obtenida con el uso del procedimiento no invasivo descrito en el presente documento para aislar polinucleótidos, polipéptidos o ADN mitocondrial para los procedimientos de la presente invención. Típicamente, las muestras para la presente invención se adquieren de la dermis o la epidermis de la piel. Preferentemente, las muestras se adquieren de la superficie de la piel usando procedimientos de muestreo de piel no invasivos o mínimamente invasivos analizados en el presente documento.

45 El término "piel" se refiere al recubrimiento externo protector del cuerpo, que consiste en la dermis y la epidermis, y se entiende que incluye glándulas sudoríparas y sebáceas, así como estructuras de folículos pilosos. En un modo de realización, la piel es piel de mamífero, preferentemente humana.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "estado de la piel" se refiere a las condiciones de la piel con respecto a la cantidad de daño por RUV acumulado debido a la exposición al sol, cabinas de bronceado o enfermedades relacionadas con la RUV y similares.

55 Los términos "terapia" y "tratamiento," que se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a una intervención realizada con la intención de mejorar el estado de un sujeto. La mejora puede ser subjetiva u objetiva y se refiere a mejorar los síntomas asociados con, evitar el desarrollo de, o modificar la patogenia de una enfermedad, un trastorno o un estado de la piel. Por tanto, los términos terapia y tratamiento se usan en su sentido más amplio e incluyen la prevención (profilaxis), moderación, reducción y cura de una enfermedad, un trastorno o un estado en diversas fases. También se engloba en ellos la prevención del deterioro del estado de un sujeto. Por tanto, los sujetos que necesitan terapia/tratamiento incluyen los que ya tienen la enfermedad, el trastorno o el estado, así como aquellos propensos o con riesgo de desarrollar la enfermedad, el trastorno o el estado y aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad.

#### Ensayos para determinar el estado de la piel y evaluar la predisposición genética a enfermedad de la piel

60 Los procedimientos de la presente invención comprenden vincular técnicas de muestreo de piel no invasivas con ensayos eficaces para identificar la predisposición genética de un individuo a la enfermedad de la piel y los factores de riesgo asociados con la exposición a RUV. Los ensayos se pueden realizar solos o combinados entre sí. El uso combinado de estos ensayos proporciona una habilidad única para evaluar simultáneamente factores de riesgo genéticos y hábitos de exposición al sol, proporcionando así una herramienta de diagnóstico para los profesionales sanitarios para supervisar, asesorar y tratar mejor a pacientes que son propensos a o que padecen

65 fotoenvejecimiento, daño por RUV o una enfermedad de la piel.

*Ensayo para detectar mutaciones mitocondriales*

La dinámica del ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta de diagnóstico importante. Con frecuencia, las mutaciones en el ADNmt son indicadores preliminares de enfermedades en desarrollo y pueden actuar como biomarcadores indicativos de factores de riesgos asociados con la aparición de enfermedades. Asimismo, como consecuencia del mayor número de copias por célula de ADN mitocondrial en comparación con el ADN nuclear, es un objetivo más sólido para ensayos basados en cantidades extremadamente diminutas de ácido nucleico. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención vinculan técnicas no invasivas para tomar muestras de piel con un ensayo para detectar mutaciones en el genoma mitocondrial humano.

Tal como se analiza en el presente documento, la medida del nivel de anomalía en el ADN mitocondrial en una muestra de piel puede identificar el estado de la piel de un paciente con respecto a la exposición acumulada al sol y el daño por RUV. Además, la medida del ADNmt en intervalos regulares, tales como bisemanales o mensuales, puede proporcionar a los profesionales sanitarios una herramienta de supervisión cuantitativa en tiempo real para la comparación frente a recomendaciones de tratamiento con el fin de determinar su eficacia para evitar el daño de la piel provocadas por la RUV.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar el estado de la piel de un paciente con respecto al daño por RUV acumulado, que comprende combinar una técnica de toma de piel no invasiva con un ensayo para detectar una anomalía mitocondrial que es la delección de 3895 pb del ADNmt identificada en la solicitud PCT n.º WO/06/111029. De acuerdo con un modo de realización de la invención, la mutación es la delección de 3895 pb descrita en la SEQ ID NO:1. De acuerdo con otro modo de realización de la invención, la mutación del ADNmt corresponde a la secuencia descrita en la SEQ ID NO:2.

En la sección de ejemplos se proporcionan procedimientos ejemplares para tomar muestras de piel de forma no invasiva y someter a ensayo la mutación mitocondrial. La extracción de ADNmt de una muestra se puede llevar a cabo usando cualquier procedimiento conocido adecuado. La extracción de ADNmt va seguida de la amplificación de la totalidad o de una región del genoma mitocondrial y puede incluir la secuenciación del genoma mitocondrial, como se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et ál., John Wiley & Sons, Nueva York, 2007). Del mismo modo, se pueden seleccionar procedimientos para detectar la presencia de mutaciones en el ADNmt entre las técnicas adecuadas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el análisis del ADNmt puede comprender la secuenciación del ADNmt, amplificación del ADNmt por PCR, hibridaciones de bandas de Southern, Northern, Western South-Western, HPLC desnaturizante, hibridación con micromatrices, biochips o chips génicos, análisis de marcadores moleculares, biosensores, perfiles de temperatura de fusión o una combinación de cualquiera de las anteriores.

Se puede usar cualquier medio adecuado para secuenciar ADN mitocondrial. Preferentemente, el ADNmt se amplifica por PCR antes de la secuenciación. El procedimiento de PCR es bien conocido en la técnica y se puede realizar como se describe en Mullis y Faloona, 1987, *Methods Enzymol.*, 155: 335. Se pueden secuenciar directamente los productos de PCR o clonarlos en un vector que después se dispone en un huésped bacteriano. Se encuentran ejemplos 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.* 19:4121-4126 y en Luckey, J.A., et ál., 1993, *High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis*, *Methods Enzymol.* 218: 154-172. Se describe el uso combinado de PCR y secuenciación del ADNmt en Hopgood, R., et ál., 1992, *Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products*, *Biotechniques* 13:82-92 y en Tanaka, M. et ál., 1996, *Automated sequencing of mtDNA*, *Methods Enzymol.* 264: 407-421.

*Genotipado del receptor de melanocortina 1 (MC1R)*

El receptor de melanocortina 1 es un punto de control clave en la melanogenia y determina la cantidad de acumulación de pigmento en la piel. Dado que el pigmento de la piel determina el nivel de protección natural de un individuo frente a la RUV carcinógena, el genotipado del MC1R puede determinar la propensión al daño en el ADN provocado por exposición al RUV y evaluar factores de riesgo asociados con el cáncer de piel. Como tal, la valoración del ADN o la secuencia de aminoácidos del gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R) para identificar si determinadas variantes que se asocian con el aumento de la sensibilidad al sol y la propensión al daño por RUV, proporciona una herramienta valiosa para identificar individuos con un riesgo mayor y que puede que necesiten medidas de supervisión y de tratamiento más agresivas.

Los procedimientos de la presente invención vinculan técnicas de toma de piel no invasivas con un ensayo para el genotipado del MC1R. Se puede usar ADN o ARN extraído de muestras de piel para identificar una o más variantes alélicas del MC1R. Por ejemplo, se pueden someter a prueba simultáneamente las siete variantes alélicas D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M asociadas con un riesgo aumentado de melanoma. De forma alternativa, se puede llevar a cabo el genotipado del MC1R para las cinco variantes alélicas que se asocian más comúnmente con el riesgo aumentado de cáncer de piel, es decir, D84E, R151C, D294H, V60L y

V92M. El gen MC1R, incluidas sus variantes, se describe en la SEQ ID NO: 3. Además, se describe la secuencia de ARN del MC1R en la SEQ ID NO: 4.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la predisposición genética de un individuo a enfermedades o al cáncer de piel que comprende combinar una técnica de toma de piel no invasiva con un ensayo para identificar la presencia de una o más variantes del MC1R en una muestra de piel, en el que las variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en las variantes alélicas D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M.

10 En la sección de ejemplos se proporcionan procedimientos ejemplares para tomar muestras de piel de forma no invasiva y realizar genotipado del MC1R. Un experto en la técnica apreciará que, a diferencia de la detección de mutaciones en el ADNmt, que pueden fluctuar a lo largo de la vida de un individuo como consecuencia de los patrones de exposición a RUV, los resultados del genotipado del MC1R no cambiarán a lo largo de la vida de un individuo. En consecuencia, se puede someter a prueba el MC1R una sola vez durante la vida del paciente.

15 Los ensayos de genotipado tales como los usados para valorar las variantes del MC1R producirán resultados idénticos en un individuo, independientemente del tejido corporal del que se tomen las muestras, ya que la secuencia del gen MC1R se hereda y no cambia a lo largo de la vida. Un experto en la técnica reconocerá que, aunque se puede obtener la muestra por el procedimiento de toma no invasivo para la piel, también se puede tomar de cualquier otro tejido corporal para obtener el mismo genotipo. La toma de tejidos adecuados para su uso en los procedimientos de la invención es bien conocida en la técnica y puede incluir ejemplos no limitantes tales como tejido bucal, tejido muscular, tejido nervioso y similares. No ocurre lo mismo con los ensayos mitocondriales, que son mutaciones somáticas específicas de tejido.

25 La extracción de ADN o ARN de una muestra se puede llevar a cabo usando cualquier procedimiento conocido adecuado. Se puede determinar la detección de alelos específicos con el uso de técnicas reconocidas en la técnica tales como ABI, un ensayo de genotipado de SNP por qPCR Taqman (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/direct/>). Del mismo modo, los procedimientos de preparación de cebadores y sondas a medida son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, et ál., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY).

30 De forma alternativa, se puede basar la valoración de variantes alélicas en el estudio de la secuencia de aminoácidos del gen MC1R. Las técnicas para llevar a cabo el análisis de aminoácidos son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

### 35 *Determinar tipo de piel y riesgo de cáncer de piel*

Los procedimientos de la invención no sólo se pueden usar para evaluar la presencia de variantes alélicas en un individuo, sino que también se pueden utilizar para determinar un tipo de piel que se aproxima al fototipo de Fitzpatrick del individuo. A este respecto, adicionalmente, los resultados del genotipado del MC1R permiten agrupar individuos en tipos de piel específicos caracterizados por el riesgo de cáncer asociado.

Estos tipos de piel se definen a continuación:

45 El tipo de piel 1 se caracteriza por que el individuo tiene dos o más de las cuatro variantes alélicas que más se asocian con el riesgo de cáncer de piel.

El tipo de piel 2 se caracteriza por que el individuo tiene una de las cuatro variantes alélicas que más se asocian con el riesgo de cáncer de piel.

50 El tipo de piel 3 o más se caracteriza por que el individuo no tiene ninguna de las cuatro variantes alélicas que más se asocian con el riesgo de cáncer de piel.

Por tanto, de acuerdo con un modo de realización, se proporciona un procedimiento de identificación del tipo de piel de un individuo y factor de riesgo de cáncer de piel con base en el genotipado del MC1R.

### 55 *Procedimientos no invasivos de toma de tejidos epiteliales*

La presente invención hace uso de técnicas no invasivas o mínimamente invasivas de toma de muestras de piel para pruebas de genotipado o de diagnóstico. En el contexto de la presente invención, "mínimamente invasivas" se refiere a las técnicas que dan lugar a la penetración en una o más capas de la piel, pero con una extracción de sangre pequeña o nula. Los ejemplos no limitantes de técnicas no invasivas o mínimamente invasivas usadas para tomar muestras de piel incluyen, pero sin limitación, la retirada de cinta adhesiva usando cinta adhesiva quirúrgica, un hisopo estéril humedecido con ácido mandélico al 8 %, un hisopo estéril humedecido con agua destilada, una banda de cera, un bastoncillo de algodón; el raspado de la piel usando un bisturí estéril; el raspado de la piel usando un raspador de madera, la superficie pegajosa de una almohadilla adhesiva (almohadilla de limpieza CapSure™, Arcturus), una película de LCM MacroCap™ (Arcturus), una película

caliente de LCM MacroCap™ (Arcturus); y emplear una aguja de calibre pequeño (por ejemplo, de calibre 28), para tomar micronúcleos de tejido epitelial.

5 Se puede tomar la muestra de la capa dérmica o epidérmica de la piel y puede proceder de zonas del cuerpo tales como, por ejemplo, talón, nariz, parte interna del brazo, oreja, boca, cuero cabelludo, pecho, hombro, nalga, espalda, cara, nuca, mano, cabeza. Se puede usar la muestra directamente, tal como se obtiene de la fuente, o después de un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por tanto, se puede pretratar la muestra de piel antes de su uso, por ejemplo, con conservantes, reactivos y similares.

10 Un experto en la técnica entenderá que se puede emplear más una técnica de toma de muestras a la vez. Además, cuando son necesarias una serie de tomas, por ejemplo, para la supervisión de un estado de la piel en el tiempo, se pueden usar técnicas iguales o diferentes solas o juntas a lo largo del periodo de prueba. A este respecto, se pueden adquirir muestras de piel una sola vez o en intervalos regulares, tales como bisemanales o mensuales.

15 Un experto también apreciará que determinados procedimientos de toma dan concentraciones de ácidos nucleicos extremadamente bajas (aproximadamente 0,1 ng) que no resultarían útiles para un ensayo dirigido al ADN nuclear; sin embargo, los objetivos de ADN mitocondrial, que son mucho más abundantes (aproximadamente 1000 veces más) serían especialmente adecuados para un procedimiento de toma con rendimientos tan extremadamente bajos. Los ejemplos que figuran a continuación demuestran que las células epiteliales tomadas por medio de los procedimientos no invasivos proporcionan ADNmt suficiente para obtener resultados comparables con el ADNmt obtenido por medio de metodologías de toma de piel usadas anteriormente.

25 Una técnica de toma no invasiva puede implicar el uso de un hisopo estéril, tales como los que se usan en la toma de células bucales o bastoncillos de algodón. Se saca el hisopo estéril de su envase y se frota sobre un sitio de interés de la piel. Preferentemente, se hisopa el sitio aproximadamente 15 veces con el fin de garantizar que se toma una cantidad de células epiteliales suficiente para fines de genotipado o de diagnóstico. Aunque la presente invención se describe a continuación con referencia a un ejemplo específico, el procedimiento también se puede usar para tomar muestras de piel para el diagnóstico o la caracterización de enfermedades, el envejecimiento o la exposición a radiación ultravioleta y para la identificación de mutaciones asociadas con los mismos.

35 Después del hisopado de la piel, se deposita el hisopo en un tubo estéril. Se puede añadir tampón al tubo según sea necesario con el fin de mantener la integridad del material genético (es decir, el ADN) contenido en el mismo. Después, se extrae el ADN utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

40 De forma alternativa, en una técnica mínimamente invasiva se puede emplear una aguja de calibre muy pequeño (calibre 28 o 29) que se usa para tomar células epiteliales con fines de investigación genética. Aquí, se toman células epiteliales de la dermis y la epidermis de un sujeto por perforación a través de una capa tirante de la piel, de modo que se extraiga muy poco o nada de sangre, pero que se adhiera una cantidad microscópica de tejido dérmico y epidérmico al núcleo interno de la aguja. Se pueden tensar la piel elevando la piel mediante el uso de, por ejemplo, los dedos, unas pinzas u otras formas de sujeción. El material epitelial queda contenido en la aguja hasta que se extrae para su procesamiento adicional (es decir, la extracción del ADN). Para expulsar la muestra de piel de la aguja, se deposita solución salina tamponada con fosfato en la columna de la aguja y después se hace pasar a su través con el émbolo hacia un tubo estéril. El ADN se extrae utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se ilustra con el ejemplo siguiente, este procedimiento mínimamente invasivo para la toma de una muestra de piel da suficiente ADN o ADNmt para la evaluación de los daños en el ADN o el ADNmt, por ejemplo, provocados por la radiación UV. Este procedimiento de obtención de muestras de piel es seguro e indoloro. Además, como se ilustra a continuación, permite la toma de ADN o ADNmt suficiente para desarrollar ensayos precisos.

#### Diagnosticar y supervisar estados de la piel y detectar factores de riesgo genéticos asociados con enfermedad

55 Como se describe en el presente documento, los ensayos de la invención se pueden usar solos, por ejemplo, para evaluar el estado de la piel o el riesgo genético, o en combinación para valorar tanto la predisposición genética a la enfermedad de la piel como la identificación de factores de riesgo asociados con el estilo de vida de un individuo en particular. Como se analiza a continuación, la identificación y supervisión de estos factores son importantes en la determinación de medidas preventivas y de tratamiento eficaces frente al daño por RUV, fotoenvejecimiento y enfermedad de la piel.

#### *Diagnosticar y supervisar estados de la piel*

65 Muchos individuos que usan regularmente productos para el cuidado de la piel, tales como bloqueadores solares y pantallas solares, los usan de forma incorrecta, al aplicarlos en cantidad insuficiente o no aplicarlos de nuevo a los intervalos recomendados, lo que crea una falsa sensación de protección que puede dar lugar a un aumento

de la exposición a la RUV. Además, hasta hace poco, por lo general, los bloqueadores solares y las pantallas solares aplicados regularmente por individuos durante la exposición al sol protegían frente a los efectos mutágenos del UVB, pero no conseguían contener agentes dirigidos a los efectos dañinos de la radiación UVA.

5 Estos factores, entre otros, hacen necesaria la disponibilidad de una herramienta tanto para determinar el estado inicial de la piel con respecto al daño por RUV como para, a lo largo de una serie de estudios, supervisar el éxito y la idoneidad de las medidas preventivas y tratamientos aconsejados para evitar más daño por RUV en la piel. La medida del nivel de delección del ADN de la piel de un paciente mediante la toma de muestras de piel de forma no invasiva en intervalos regulares, tales como bisemanales o mensuales (o a cualquier otro intervalo adecuado),  
10 puede proporcionar a los profesionales sanitarios una herramienta de supervisión cuantitativa en tiempo real para comparar con las recomendaciones de tratamiento para determinar su eficacia determine en la prevención del daño de la piel provocado por la RUV. Esta metodología de toma permite muestreo regular sin efectos secundarios o molestias y se puede realizar en casa, si se desea. Sorprendentemente, las técnicas para tomar muestras de piel tales como la utilización de hisopos son especialmente adecuadas para la detección de mutaciones en el ADNmt, ya que los rendimientos de ADN extremadamente bajos que proporcionan los hisopos son suficientes para llevar a cabo este tipo de análisis.

Volviendo ahora a los ejemplos, en un modo de realización de la invención, se usa el procedimiento para tomar células epiteliales para la cuantificación de biomarcadores asociados con el daño provocado por la radiación UV (véase el ejemplo 1). Específicamente, el procedimiento de la presente invención se usó para tomar muestras de piel para realizar pruebas para detectar delecciones en el genoma mitocondrial humano, a saber, la delección de 3895 pb del ADNmt descrita anteriormente. El ejemplo demuestra que las células epiteliales tomadas por medio del procedimiento no invasivo de la presente invención proporciona ADNmt suficiente para obtener resultados comparables con el ADNmt obtenido por medio de metodologías de toma de piel anteriores.

25 Un experto en la técnica entenderá que la toma no invasiva de muestras de ADN de las capas epidérmica o dérmica de la piel humana para la cuantificación de un objetivo de ADN mitocondrial proporciona un medio para que un profesional sanitario supervise de la eficacia de las recomendaciones sobre regímenes de tratamiento y estilo de vida para la prevención del daño provocado por la RUV en la piel y el ADN con la intención de evitar consecuencias tales como el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel.

30 Un experto en la técnica también apreciará la utilidad del análisis de ADNmt para uso de los profesionales sanitarios en la identificación de malos hábitos relacionados con el sol o de procedimientos de protección ineficaces. Esta utilidad se demuestra en el ejemplo 6, donde, de acuerdo con un modo de realización de la invención, se analizaron los resultados de uso bloqueadores solares para dos individuos de edad y tono de piel similares para evaluar la eficacia de los regímenes de protección del sol.

#### *Determinación de fotoedad*

40 Un procedimiento de diagnóstico adicional de la invención que hace uso de un procedimiento de muestreo mínimamente invasivo vinculado con la identificación de un marcador mitocondrial es la determinación de la fotoedad. Como se describe en la sección de ejemplos, el fin de este procedimiento es valorar la exposición a la RUV de un individuo mediante el muestreo de tejido epitelial del individuo de la cara o la cabeza con una técnica mínimamente invasiva de toma de piel y la medida de la cantidad de un objetivo mitocondrial asociado con el daño por RUV, tal como la delección del ADNmt. Después, se compara este resultado con una base de datos de resultados obtenidos por el mismo procedimiento y se clasifica al individuo en una cohorte de edad basándose en el nivel de delección del ADNmt detectado. Para asignar una fotoedad, se comparan los resultados del análisis del ADNmt de un individuo con su edad cronológica para determinar si tienen un fotodaño mayor o menor que otros individuos de su grupo de edad.

50 Por tanto, al utilizar técnicas mínimamente invasivas para tomar micronúcleos de tejido epitelial para analizar marcadores de ADN mitocondrial, los profesionales sanitarios pueden identificar la fotoedad de un individuo y determinar si su fotoedad está en consonancia o no con su edad cronológica. De este modo, la determinación de la fotoedad proporciona un medio para que los profesionales sanitarios prescriban de manera más apropiada medidas preventivas y de tratamiento para combatir el fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel.

#### *Determinar predisposición genética a enfermedad*

60 Con el fin de valorar por completo el riesgo de fotoenvejecimiento de un individuo y su riesgo de cáncer de piel, es indispensable que se proporcione a los profesionales sanitarios tanta información como sea posible para que conozcan y comuniquen los factores de riesgo de su paciente. La utilización del genotipado del MC1R no sólo contribuye a la propensión de un individuo al daño del ADN provocado por la exposición a RUV y el riesgo de que desarrolle cáncer de piel, proporciona una herramienta valiosa para identificar pacientes con riesgo mayor que puede que necesiten medidas de supervisión y tratamiento más agresivas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento no invasivo para la toma de muestras de ADN para el genotipado del MC1R. De acuerdo con un modo de realización de la invención, se puede usar el ADN extraído de células tomadas por el procedimiento de la presente invención para identificar una o más variantes alélicas asociadas con un riesgo aumentado de melanoma. Se puede usar el procedimiento para evaluar la presencia de estas variantes en un individuo y, adicionalmente, para determinar un tipo de piel del individuo. Por lo tanto, los resultados del genotipado del MC1R permiten agrupar individuos en tipos de piel específicos caracterizados por el riesgo de cáncer asociado.

#### *Análisis vinculado*

El uso combinado del genotipado del MC1R y el análisis del ADNmt proporciona una herramienta para que los profesionales sanitarios supervisen, aconsejen y traten mejor a los pacientes al tener en cuenta tanto la predisposición genética como los resultados finales de sus hábitos de exposición al sol. Este uso combinado de ensayos proporciona una habilidad única para evaluar simultáneamente los factores de riesgo y las consecuencias. Es importante el hecho de que se puede retirar temporalmente la prueba del MC1R de las repeticiones de pruebas con la toma no invasiva para realizar pruebas de ADNmt y, aun así, usarla en tándem. Como se analiza anteriormente, esto es posible porque la información obtenida de la prueba del MC1R no cambiará a lo largo de la vida de un individuo, aunque los niveles de daño en el ADN dilucidados al medir la delección del ADN mitocondrial fluctuarán como consecuencia de los patrones de exposición a RUV.

Cabe señalar el hecho de que el daño en la piel provocado por la RUV es un proceso multifactorial. En consecuencia, no se puede suponer que un individuo con variantes del MC1R tenga siempre mayores daños que un individuo sin ellas, como tampoco es el caso de que un individuo que refiera un uso regular de bloqueadores solares tenga necesariamente menor daño que uno que refiera que no usa bloqueadores solares. Por tanto, el vínculo del genotipado del MC1R con el análisis del ADNmt proporciona a los profesionales sanitarios la información única que necesitan para dar recomendaciones mejor fundamentadas a aquellos bajo su cuidado.

#### *Valoración de agentes terapéuticos y productos para el cuidado de la piel*

El procedimiento de la presente invención también se puede usar para un cribado generalizado de la piel con fines tanto médicos como cosméticos. El procedimiento de la presente invención se puede usar para realizar un genotipado y/o para medir diversos biomarcadores asociados con el cáncer de piel (tanto el melanoma como el cáncer de piel no melanómico). La habilidad para evaluar el nivel de daño en el ADN en la piel de un individuo debido a la radiación UV en cualquier punto temporal y a partir de cualquier localización anatómica externa, proporciona la base para una prueba de cribado única e informativa para la salud de la piel y para evaluar la seguridad y la eficacia de agentes terapéuticos, productos para el cuidado de la piel y regímenes de cuidado de la piel existentes y nuevos. Además, al identificar los cambios genéticos específicos subyacentes a la enfermedad o estado de la piel de un sujeto, se puede determinar fácilmente si el paciente responderá, y en qué medida, a un agente terapéutico, un producto para el cuidado de la piel o régimen particular.

#### *Kits*

Los materiales de toma usados en el procedimiento de la presente invención pueden estar envasados, en función de la aplicación deseada, en un kit para el usuario o en un kit médico para su uso en un entorno clínico. Los kits de este tipo podrían incluir no sólo uno o más medios de muestreo, tales como hisopos estériles, bastoncillos de algodón o agujas, sino otros materiales necesarios para el genotipado y/o la identificación de mutaciones en el ADNmt.

Opcionalmente, los kits pueden incluir reactivos necesarios para desarrollar un ensayo de diagnóstico, tales como tampones, sales, reactivos de detección y similares. También se pueden incluir en el kit otros componentes, tales como tampones y soluciones para aislar y/o tratar una muestra de prueba. Uno o más de los componentes del kit pueden estar liofilizados y el kit puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Cuando sea apropiado, el kit puede contener también recipientes de reacción, recipiente de mezcla y otros componentes que facilitan la preparación de la muestra de prueba. Opcionalmente, el kit también puede incluir instrucciones de uso, que se pueden proporcionar en formato impreso o en un formato legible por ordenador, tal como un disco, un CD, un DVD o similar.

Para lograr un mejor entendimiento de la invención descrita en el presente documento, se exponen los ejemplos siguientes. Se entenderá que estos ejemplos pretenden describir modo de realización ilustrativo de la invención.

#### **Ejemplos**

Ejemplo 1: análisis de la delección de 3895 pb del ADNmt humano

Se usó el procedimiento de la presente invención para analizar la delección de 3895 pb del ADNmt identificada en la solicitud PCT n.º WO/06/111029. La toma y extracción del ADNmt se desarrolló como se indica a continuación.

1. Se tomaron muestras de piel hisopando un sitio de piel aproximadamente 15 veces con un hisopo estéril. Se tomaron muestras de piel del talón (n = 41), nariz (n = 43), parte interior del brazo (n = 20), oreja (n = 5), hombro (n = 5), nalga (n = 5) y espalda (n = 5).

2. Se extrajo el ADNmt usando un kit disponible comercialmente (microkit de ADN QiaAMP™, n.º de producto 56304, Qiagen, Maryland, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

3. Se cuantificó el ADN bicatenario de piel humana con el kit de ensayo Quant-it™ dsDNA HS (n.º producto Q32851, Invitrogen, California, EE. UU.) en el fluorímetro Qubit™ (n.º de producto Q32857), Invitrogen, California, EE. UU.).

4. Después, se cuantificó el nivel de la delección de 3895 pb por PCR en tiempo real (rt-PCR) usando el iQ Sybr Green Supermix™ (n.º de producto 170-8882, Bio-Rad, California, EE. UU.) y los siguientes cebadores:

Directo 5'-CTGCTAACGCCATACCCCGAAAATGTTG-3' (SEQ ID NO: 5);

Inverso 5'-GAAGGATTATGGATGCGGTTGCTTGCGTGAG-3' (SEQ ID NO: 6).

En este ejemplo, se usa el par de cebadores de amplificación para amplificar una región objetivo indicativa de la presencia de la delección de 3895 pb. El cebador directo solapa con una región de ADNmt sometida a empalme después de producirse la delección de la secuencia de 3895 pb (es decir, un empalme en una posición entre 547 a 4443 del genoma de ADNmt). Por lo tanto, solamente se puede producir la extensión del cebador solapante para crear el producto de amplificación de tamaño correcto si se elimina la sección de 3895 pb.

En la etapa de cuantificación de la delección de 3895 pb, se configuró la reacción de RT-PCR como sigue:

12,5 ul de iQ Sybr Green Supermix™;  
350 nmol de cebador directo (SEQ ID NO: 5);  
350 nmol de cebador inverso (SEQ ID NO: 6);  
5 ul de molde (aproximadamente 0,5 ng de ADN bicatenario);  
agua hasta 25 ul;

Parámetros de ciclado:

Etapa 1. 95 °C durante 3 minutos;  
Etapa 2. 95 °C durante 30 segundos;  
Etapa 3. 67,5 °C durante 30 segundos;  
Etapa 4. 4,72 °C durante 30 segundos;  
Etapa 5. Lectura de placa 45 ciclos de las etapas 2-5  
Curva de fusión 55-110 °C lectura cada 3 segundos en intervalos de 1 °C  
Mantener a 10 °C durante 10 minutos.

Los resultados de estos ensayos se muestran en las figuras 1 a 3 y demuestran una distinción clara entre hisopos de piel adquiridos de zonas raramente expuestas a la luz del sol/radiación UV (es decir, talón y nalgas) y las que se exponen habitualmente (nariz y oreja). En zonas que reciben un nivel mayor de radiación UV, tales como la nariz y los hombros, los niveles de la delección de 3895 pb son significativamente elevados en comparación con las zonas generalmente protegidas de la radiación UV, tales como el talón y las nalgas.

Como se muestra en las figuras 1 y 2, los umbrales de ciclo ( $C_T$ ) de la PCR en tiempo real para la delección de 3895 pb indican que hay una mayor incidencia de la delección en sitios de la piel expuestos a la radiación UV habitualmente (nariz u oreja) u ocasionalmente (hombro o espalda) en comparación con los sitios que raramente están expuestos (talón o nalgas).

La figura 3 muestra que el ADNmt tomado de las células epiteliales obtenidas de sitios que se exponen habitualmente a la radiación UV (p. ej., nariz y oreja) se caracteriza por presentar niveles más elevados del marcador de delección de 3895 pb que el ADNmt tomado de células epiteliales obtenidas de sitios que raramente se exponen a la radiación UV (p. ej., talón o parte interna del brazo).

Estos resultados también demuestra la eficacia de tomar muestras de piel de acuerdo con la presente invención con el fin de obtener ADNmt suficiente para desarrollar los ensayos. Como tal, los procedimientos de toma de piel no invasivos de la presente invención son igualmente eficaces para obtener ADNmt para análisis que las metodologías invasivas, por ejemplo, los procedimientos usados en la publicación PCT n.º WO/06/111029 del solicitante.

Ejemplo 2: comparación de procedimientos de toma de piel

5 Se probaron cinco metodologías de toma de piel no invasivas con el fin de identificar cuál, de haberla, daría una cantidad y una calidad suficientes de ácidos nucleicos para análisis moleculares tales como la PCR cuantitativa en tiempo real. Los cinco procedimientos probados fueron:

- 10 • Retirada de cinta adhesiva usando cinta adhesiva quirúrgica;
- Tira adhesiva Biore®;
- Hisopo estéril humedecido con ácido mandélico al 8 %;
- 15 • Hisopo estéril humedecido con agua destilada; y
- Banda de cera.

20 La cinta adhesiva, la tira Biore y la banda de cera se aplicaron a la superficie de la piel después de la aplicación de isopropanol al 70 % para esterilizar la zona. Se aplicó una presión firme y después se retiró rápidamente la cinta o banda. Los hisopos se depositaron en primer lugar en una solución estéril de ácido mandélico al 8 % o en agua destilada y después se frotaron con firmeza sobre el sitio de interés de la piel después de haber limpiado la piel con isopropanol al 70 %.

25 Después de la toma de células epiteliales de 3 individuos, se depositó cada medio de toma en 200 ul de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubó durante la noche a 56 °C.

30 Después, se sometieron todas las muestras a la extracción de ácidos nucleicos usando el minikit de ADN QiaAMP™ de Qiagen, con el protocolo de hisopos bucales (n.º de producto 51304). Se cuantificaron las muestras purificadas usando el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 para determinar si el procedimiento de extracción era satisfactorio.

Tabla 1: determinación de la cantidad de ADN extraído de la piel tomada mediante cinco procedimientos no invasivos

ID de la muestra	Concentración de ADN ng/ul	A260nm	Paridad ADN ratio 260:280
1 Biore	-0,42	-0,008	0,48
1 hisopo con agua	5,03	0,101	1,6
1 hisopo con ácido mandélico	5,05	0,101	1,74
1 cinta adhesiva quirúrgica	2,22	0,044	4,4
1 cera	3,52	0,07	1,69
2 Biore	-0,02	0	-0,09
2 hisopo con agua	2,74	0,055	1,97
2 hisopo con ácido mandélico	4,9	0,098	1,82
2 cinta adhesiva quirúrgica	2,99	0,06	1,78
2 cera	2,17	0,043	184
3 Biore	-0,26	-0,005	0,24
3 hisopo con agua	3,26	0,065	3,15
3 hisopo con ácido mandélico	2,71	0,054	12,1
3 cinta adhesiva quirúrgica	2,45	0,049	4,26
3 cera	2,67	0,053	4,25

35 Al tener en cuenta tanto la concentración de ácidos nucleicos como la pureza de la muestra, se obtuvieron los resultados más coherentes para las muestras de hisopos usando agua o ácido mandélico como agente humectante, o para las muestras de cera.

40 A continuación, se realizó una PCR en todas las muestras para determinar si había inhibidores de la amplificación presentes o se había producido una degradación significativa de la muestra durante el procesamiento. Se amplificaron las muestras de acuerdo con las siguientes condiciones:

Tabla 2: condiciones de PCR para amplificación de las muestras

Reactivo	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción 10X	1X
dNTP	0,4 mM cada uno
BSA	1X
cebador 12s (directo)	0,4 uM
cebador 12s (inverso)	0,4 uM
Taq LA (Takara p/n RR002B	1,25 unidades
Reactivo	Concentración final en la reacción
Molde	5 ul (de la concentración anterior)
Agua	Hasta 25 ul

5 Los cebadores usados eran cebadores de ADN mitocondrial con la secuencias que se proporcionan a continuación: secuencia de cebador directo 12s 5'-CGTTCCAGTGAGTTCACCTC-3' (SEQ ID NO: 7) secuencia de cebador inverso 12s 5'-CACTCTTACGCCGGCTTCTATT-3' (SEQ ID NO: 8)

Se ciclaron las reacciones de amplificación en un DNA Engine Tetrad (Bio-Rad) de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 10 1. 94 °C durante 2 minutos  
 2. 94 °C durante 30 segundos  
 3. 64 °C durante 30 segundos  
 4. 72 °C durante 30 segundos  
 5. Repetir las etapas 2-4 39 veces  
 15 6. 4 °C MANTENER

Después, se sometieron los productos de amplificación a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y se tificaron con bromuro de etidio. Los resultados de la amplificación se proporcionan en la figura 4, donde la mitad superior del gel contiene:

- 20 Carril 1 500 ng de 100 pb de GeneRuler SM0323 (Fermentas)  
 Carril 2 Biore del individuo 1  
 Carril 3 hisopo con agua del individuo 1  
 Carril 4 hisopo con ácido mandélico del individuo 1  
 25 Carril 5 cinta adhesiva quirúrgica del individuo 1  
 Carril 6 cera del individuo 1  
 Carril 7 Biore del individuo 2  
 Carril 8 hisopo con agua del individuo 2  
 Carril 9 hisopo con ácido mandélico del individuo 2  
 30 Carril 10 cinta adhesiva quirúrgica del individuo 2  
 Carril 11 cera del individuo 2  
 Carril 12 vacío  
 Carril 13 control negativo de la amplificación  
 Carril 14 control positivo de la amplificación  
 35 Carriles 15-18 vacíos

Y donde la mitad inferior del gel contiene:

- 40 Carril 1 Biore del individuo 3  
 Carril 2 hisopo con agua del individuo 3  
 Carril 3 hisopo con ácido mandélico del individuo 3  
 Carril 4 cinta adhesiva quirúrgica del individuo 3  
 Carril 5 cera del individuo 3  
 Carril 6 500 ng de 100 pb de GeneRuler SM0323 (Fermentas)  
 45 Carril 7 control negativo de extracción con Biore  
 Carril 8 control negativo de extracción con hisopo con agua  
 Carril 9 control negativo de extracción con hisopo con ácido mandélico  
 Carril 10 control negativo de extracción con cinta adhesiva quirúrgica  
 Carril 11 control negativo de extracción con cera  
 50 Carril 12 vacío

Carril 13 control negativo de la amplificación (carga por duplicado del carril 13 anterior)  
 Carril 14 control positivo de la amplificación (carga por duplicado del carril 14 anterior)  
 Carriles 15-18 vacíos

5 Resultados

10 No se amplificó nada de ADNmt del ADNmt tomado de células epiteliales recogidas usando las tiras Biore. Los hisopos tanto de agua como de ácido mandélico se amplificaron, si bien el hisopo de agua se amplificó más claramente. La cinta adhesiva quirúrgica se amplificó de forma esporádica. La cera se amplificó claramente, aunque es probable que el control negativo de la extracción del carril 11 de la mitad inferior del gel se contaminara como consecuencia de la naturaleza no estéril o de las dificultades de manipulación asociadas con la cera.

15 Con todos los factores considerados, este ejemplo demostró que el uso de un hisopo estéril es el procedimiento preferente de toma de una muestra de piel no invasiva. El hisopo puede estar seco o humedecido con diversos líquidos para facilitar la toma o el tamponamiento de la muestra.

Ejemplo 3: comparación de procedimientos de toma de piel adicionales

20 En este ejemplo, se probaron cinco procedimientos adicionales de toma de muestras de piel no invasivos con el fin de identificar cuál, de haberlo, daría una cantidad y una calidad suficientes de ácidos nucleicos para análisis moleculares tales como la PCR cuantitativa en tiempo real.

Se tomaron muestras de piel de un único individuo dos veces usando los procedimientos siguientes:

- 25 • raspado de la piel usando un bisturí estéril
- raspado de la piel usando un raspador de madera
- 30 • superficie pegajosa de una almohadilla adhesiva (almohadilla de limpieza CapSure™, Arcturus)
- película de LCM MacroCap™ (Arcturus)
- 35 • película calentada de LCM MacroCap™ (Arcturus)

40 En primer lugar, se preparó la piel limpiándola con una toallita de isopropanol al 70 %. El raspador de madera y el bisturí se pasaron con firmeza sobre la superficie de la piel para retirar células epiteliales y después se depositaron en un tubo de centrifuga. La almohadilla adhesiva y las películas se presionaron con firmeza contra la piel sin frotarlas para tomar células epiteliales.

45 Se procesaron las múltiples tomas usando dos procedimientos de extracción de ácidos nucleicos diferentes. El primer conjunto se extrajo usando una digestión con proteinasa K, bien conocida en la técnica, mientras que el segundo conjunto se extrajo usando el minikit de ADN QiaAMP (Qiagen 51304).

Después, se cuantificaron las muestras procesadas con el kit de Qiagen usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. No se hizo con las de la digestión con PK, ya que no estaban lo suficientemente limpias para facilitar este tipo de cuantificación.

50 *Tabla 3: determinación de la cantidad de ADN extraído de la piel tomada mediante procedimientos de toma adicionales (ADN extraído con Qiagen)*

ID de la muestra	Concentración de ADN ng/ul	A260nm	Paridad ADN ratio 260:280
Tampón AE	-1,09	-0,022	1,6
Raspador de madera	2,06	0,041	0,95
CapSure	5,59	0,112	1,29
Bisturí	2,32	0,046	1,41
Control negativo bisturí	1,19	0,024	0,8
Control negativo de CapSure	2,47	0,049	1,2
Control negativo de raspador de madera	2,92	0,058	1,35
Control negativo del kit de QiaGEN	2,4	0,048	1,83

Se amplificaron las muestras de acuerdo con el protocolo que se proporciona en el ejemplo 2.

Después, se sometieron los productos de amplificación a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y se tificaron con bromuro de etidio. Se muestran los resultados en la figura 5, donde el gel contiene:

- 5 Carril 1 500 ng de GeneRuler de 100 pb (SM0323)
- Carril 2 control negativo de la amplificación
- Carril 3 control positivo de la amplificación
- Carril 4 tampón de PK raspador de madera
- Carril 5 tampón de PK raspado con bisturí
- 10 Carril 6 tampón de PK almohadilla CapSure
- Carril 7 tampón de PK MacroCap
- Carril 8 tampón de PK MacroCap calentada
- Carril 9 tampón de PK control negativo de extracción con raspador de madera
- Carril 10 tampón de PK control negativo de extracción con raspado con bisturí
- 15 Carril 11 tampón de PK control negativo de extracción con CapSure
- Carril 12 tampón de PK control negativo de extracción con MacroCap
- Carril 13 tampón de PK control negativo de extracción con MacroCap calentada
- Carril 14 QiaAMP raspado con bisturí
- Carril 15 QiaAMP almohadilla CapSure
- 20 Carril 16 QiaAMP raspador de madera
- Carril 17 QiaAMP control negativo de extracción con raspado con bisturí
- Carril 18 QiaAMP control negativo de extracción con CapSure
- Carril 19 QiaAMP control negativo de extracción con raspador de madera
- 25 Carril 20 QiaAMP control negativo de reactivo

El raspado con bisturí y MacroCap™ se amplificaron usando el tampón de PK, mientras que la almohadilla CapSure™ se amplificó bien usando el kit QiaAMP™. Al comparar con el hisopado de la piel, se observó que la cantidad de ADNmt tomado y la cantidad de producto amplificado obtenido usando los procedimientos probados en este ejemplo no eran tan eficaces.

Ejemplo 4: toma de muestras de piel con aguja

Se usaron agujas para tomar muestras de piel de 5 sitios del cuerpo diferentes de 9 individuos. Los sitios del cuerpo incluían la cejas, lóbulo de las oreja, nuca, mano y talón.

Usando una aguja como se describe anteriormente, se pellizcó o se tensó la piel entre el dedo pulgar y el índice de la mano del que toma la muestra. Se pasó la aguja a través de la piel, extrayendo muy poco o nada de sangre. Se extrajo la muestra de piel de la aguja depositando solución salina tamponada con fosfato en la columna de la aguja y haciendo salir la muestra de la aguja con un émbolo hacia un tubo estéril. Después, se extrajo ADN de este volumen que contenía el tejido epitelial usando el minikit de ADN QiaAMP™ (Qiagen, n.º de producto 51304).

Después, se amplificaron las muestras con el fin de identificar la delección de 3895 pb del ADNmt. Las condiciones de reacción y los parámetros de ciclo para este ejemplo fueron los mismos que para el ejemplo 1 proporcionado anteriormente. Los resultados se presentan en la tabla 4

Tabla 4: resultados para muestras de piel tomadas con aguja

Muestra	Umbral del ciclo C(t)	Muestra	Umbral del ciclo C(t)
Ceja izquierda del sujeto 1	25,82	Ceja izquierda del sujeto 6	22,15
Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 1	25,98	Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 6	19,87
Cuello del sujeto 1	26,26	Cuello del sujeto 6	25,87
Mano derecha del sujeto 1	26,73	Mano derecha del sujeto 6	27,91
Talón derecho del sujeto 1	27,93	Ceja izquierda del sujeto 7	29,89
Ceja izquierda del sujeto 2	30,85	Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 7	19,18
Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 2	25,6	Cuello del sujeto 7	25,49
Cuello del sujeto 2	23,92	Mano derecha del sujeto 7	23,41
Mano derecha del sujeto 2	27,01	Talón derecho del sujeto 7	27,05

(continuación)

Muestra	Umbral del ciclo C(t)	Muestra	Umbral del ciclo C(t)
Talón derecho del sujeto 2	35,55	Ceja izquierda del sujeto 8	21,82
Ceja izquierda del sujeto 3	29,64	Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 8	21,32
Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 3	23,51	Cuello del sujeto 8	23,51
Cuello del sujeto 3	24,52	Mano derecha del sujeto 8	16,35
Mano derecha del sujeto 3	22,47	Talón derecho del sujeto 8	20,57
Ceja izquierda del sujeto 4	24,23	Ceja izquierda del sujeto 9	25,09
Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 4	23,64	Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 9	26,76
Cuello del sujeto 4	24,96	Cuello del sujeto 9	27,74
Mano derecha del sujeto 4	25,93	Mano derecha del sujeto 9	25,24
Talón derecho del sujeto 4	23,58	Talón derecho del sujeto 9	22,39
Ceja izquierda del sujeto 5	22,35		
Lóbulo de la oreja izquierda del sujeto 5	24,39		
Cuello del sujeto 5	22,06		
Mano derecha del sujeto 5	22,04		
Talón derecho del sujeto 5	22,6		

Resulta evidente que el material obtenido a través de este procedimiento de toma es suficiente para realizar análisis moleculares tales como la PCR en tiempo real. Específicamente, se ha detectado y cuantificado el producto de amplificación indicativo de la delección de 3895 pb del ADNmt, como se demuestra en la tabla 4. Por lo tanto, la toma de muestras de piel por medio del procedimiento de toma con aguja da suficiente ADN para su uso en un ensayo de este tipo.

Ejemplo 5: detección de variantes del MC1R

Se tomaron muestras bucales de tres sujetos. Todos los sujetos se enjuagaron la boca con agua corriente o embotellada y expulsaron el agua. Se sacó un hisopo de algodón de su envase protector y se tomó por el asa. Sujetando el asa del hisopo de algodón, se dispuso la punta de algodón dentro de la boca del sujeto y se frotó la punta de algodón sobre el interior del carrillo durante 30 segundos. Se dispusieron los hisopos en tubos estériles y se cerraron para su procesamiento adicional.

Se determinó la detección de alelos específicos usando ABI, un ensayo de genotipado de SNP por qPCR Taqman. Se sometió a todos los sujetos a pruebas para las siete variantes alélicas D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M.

Se identificaron los genotipos para D84E, R142H, R151C, V60L y V92M con ensayos ABI (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/direct/>) como sigue

V60L-n.ºde ensayo C751905410  
D84E-n.ºde ensayo C751905520  
V92M-n.ºde ensayo C203340520  
R142H-n.ºde ensayo C2754163410  
R151C-n.ºde ensayo C203340420

Para la detección de las variantes del alelo D294H se usaron cebadores y sondas a la medida, como se enumera a continuación.

Cebador directo MC1R-294: CGCCCTCATCATCTGCAATG SEQ ID NO: 9;  
Cebador inverso MC1R-294: GGCTGTGGAAGGCGTAGAT SEQ ID NO: 10;  
Sonda 1 MC1R-294V1VIC: CCATCATCGACCCCCT SEQ ID NO: 11;  
Sonda 2 MCIR-294M1 FAM: CCATCATCCACCCCCT SEQ ID NO: 12.

Las condiciones de reacción usadas para todos los ensayos fueron las descritas esquemáticamente en el protocolo de ensayos de genotipado de SNP Taqman™.

Se realizaron pruebas para la variante alélica R160H usando una digestión con Sac II. Se usaron cebadores para amplificar una región objetivo del ADN del gen MC1R. Después se sometió el producto de amplificación a una

digestión con Sac II. Los carriles de 1 a 4 del gel (véase la figura 12) muestran los resultados para los tres sujetos sometidos a las pruebas y la muestra de control. Las cuatro muestras eran de tipo natural homocigotas. El tamaño del producto de amplificación indicativo de un tipo natural homocigoto para este sitio alélico es de 436 pb, lo que después de la digestión con SAC II da un producto de 327 pb. En variantes homocigotas no se produce la digestión y, por tanto, todo el producto de amplificación por PCR mantiene un tamaño de 436 pb.

Los resultados de las pruebas se muestran en las figuras de 6 a 12. Se realizaron dos pruebas para cada individuo y también se sometió a prueba una muestra de control dos veces. El genotipo de la muestra de control era heterocigoto para V60L, variante homocigota para V92M y natural para el resto de los alelos. Se determinó que el primer individuo sometido a prueba tenía piel de tipo 3 (no se observaron variantes del MC1R). Se determinó que el segundo individuo sometido a prueba tenía piel de tipo 3 (no se observaron variantes del MC1R). Se determinó que el tercer individuo sometido a prueba tenía piel de tipo 2 (homocigoto para las variantes V60L y R151C y heterocigoto para R142H).

Resulta evidente que el material obtenido a través de este procedimiento de toma es suficiente para el genotipado del MC1R. Específicamente, la toma de muestras de ADN por medio del procedimiento de toma con hisopos bucales da ADN suficiente para su uso en un ensayo de este tipo.

#### Ejemplo 6: análisis de la eficacia de los regímenes de bloqueo solar

##### Antecedentes:

El UVB es el espectro de la RUV que provoca eritema (quemadura solar), la indicación visual de que se ha producido una sobreexposición a la radiación UV. Se suelen usar la frecuencia y la gravedad del eritema como medida del éxito de los hábitos de protección del sol de un individuo. Sin embargo, se sabe que el UVA contribuye al daño en la piel y el ADN, aunque hasta hace poco los bloqueadores solares y las pantallas solares no contenían agentes destinados a bloquear el UVA. Por tanto, se crea una situación en la que un individuo que usa bloqueador solar se protegía de los efectos inductores del eritema del UVB, pero que quizás sufría una exposición aún más prolongada a los efectos mutágenos del UVA de lo que habría sido de otro modo. Un individuo en esta situación referiría que usa bloqueadores solares y el profesional sanitario evaluaría de forma errónea que se adoptan medidas para evitar el daño por RUV cuando, de hecho, el paciente no se estaba protegiendo del UVA y los riesgos finales podrían seguir siendo muy altos.

Como se lleva a cabo en el ejemplo 1, la medida del nivel de la deleción de 3895 pb del ADN mitocondrial en la epidermis tomada con un hisopo de algodón en intervalos regulares, tales como bisemanales o mensuales, puede proporcionar a los profesionales sanitarios un herramienta de supervisión cuantitativa en tiempo real para comparar frente a las recomendaciones de tratamiento para determinar su eficacia en la prevención del daño de la piel provocado por la RUV.

Esta metodología de toma permite un muestreo regular sin efectos secundarios o molestias. El hisopo da concentraciones de ácidos nucleicos extremadamente bajas (aproximadamente 0,1 ng) que no resultarían útiles para un ensayo dirigido al ADN nuclear; sin embargo, los objetivos de ADN mitocondrial, tales como la deleción de 3895 pb son mucho más abundantes (aproximadamente 1000 veces más) y son especialmente adecuados para un procedimiento de toma con rendimientos tan extremadamente bajos.

##### Estudio:

La utilidad del análisis de la deleción del ADNmt para identificar malos hábitos de exposición al sol o procedimientos de protección ineficaces se demuestra con los resultados de dos individuos de edad y tono de piel similares. El paciente 202 no usaba bloqueadores solares en absoluto, mientras que el paciente 225 usaba bloqueadores solares de forma eficaz. Sus niveles de daño reflejan este comportamiento, al presentar el paciente 202 una cantidad aproximadamente 10 veces mayor de la deleción de 3895 pb que indica niveles altos de daño en el ADN por exposición a RUV que el paciente 225 (donde una diferencia de 3 CT es equivalente a una diferencia de 10 veces en la cantidad de objetivo). Aunque los fenotipos de estos dos individuos indican que el riesgo de daño en la piel asociado con RUV sería similar o equivalente, la deleción de 3895 pb vinculada a la toma con hisopos no invasiva puede demostrar que el paciente 202 presenta un riesgo mayor, probablemente debido a las diferencias conductuales tales como el uso de bloqueadores solares.

Tabla 5: perfil del paciente y factores de riesgo de daño por RUV

PACIENTE	CT (deleción de 3895 pb)	EDAD	SEXO	Cabello	Piel	Uso eficaz de filtros solares
202	23,16	25	Hombre	Negro	Marrón oscuro	No
225	26,06	28	Mujer	Marrón	Beige claro	Sí

Ejemplo 7: análisis de variantes del MC1R y delección del ADNmt para predecir la eficacia de regímenes de cuidado solar

5 A continuación se demuestra la utilidad combinada de realizar tanto un seguimiento del daño en el ADN con el biomarcador de la delección de 3895 pb asociado con la RUV como indicador para estimar la eficacia de regímenes de cuidado solar, como de determinar el estado de las variantes del MC1R, donde dos pacientes de edad, color de piel y uso de bloqueadores solares similares presentan niveles diferentes de daño en el ADN, probablemente como subproducto de diferentes genotipos del MC1R. El paciente 300 no tiene variantes asociadas con un aumento de la propensión a los efectos dañinos de la RUV en la piel, mientras que el paciente 10 303 tiene una variante en la posición de aminoácido 92. Aunque los pacientes son muy similares en cuanto al fenotipo y su puntuación en la escala de fototipos de Fitzpatrick sería muy parecida (tipo 3), el aumento de la propensión se refleja en un nivel de daño en el ADN 3 veces mayor en el paciente que tiene la variante del MC1R que en paciente sin variantes (donde una diferencia de 1 CT es aproximadamente una diferencia de 3 veces en la cantidad objetivo).

15 *Tabla 6: análisis comparativo de la variación del MC1R y la delección en el ADNmt para dos pacientes*

PACIENTE	CT de la delección de 3895 pb	Variante del MC1R (posición de aminoácidos)							EDAD	SEXO	Cabello	Tono de piel	Uso eficaz de bloqueadores solares
		60	84	92	142	151	160	294					
303	26,1	0	0	1	0	0	0	0	42	Mujer	Negro	Cetrino	Sí
300	27,11	0	0	0	0	0	0	0	45	Mujer	Marrón	Cetrino	Sí

20 Como se analiza previamente, el daño provocado por la RUV es un proceso multifactorial y, en consecuencia, no se puede suponer que un individuo con variantes del MC1R tenga siempre mayores daños que un individuo sin ellas, como tampoco es el caso de que un individuo que refiera un uso regular de bloqueadores solares tenga necesariamente menor daño que uno que refiera que no usa bloqueadores solares. La combinación de estas dos pruebas proporciona al profesional sanitario la información necesaria para realizar recomendaciones mejor fundamentadas a aquellos bajo su cuidado.

25 Las dos tablas siguientes ilustran este punto, ya que, por lo general, los individuos con y sin variantes están representados de igual manera en todo el espectro de daño en el ADN.

*Tablas 7A y 7B: comparación de la variación del MC1R con el nivel de daño en el ADN*

A.

	% de la población con variantes	% de la población sin variantes
daño bajo	30	70
daño promedio	37	63
daño alto	44	58

30

B.

Daño	60	84	92	142	151	160	294	SUMA	SIN V	UNA V	DOS V	>0 V	N.º de pacientes
Bajo	0	0	1	1	8	8	1	19	6	9	5	14	20
Prom.	10	1	18	3	16	16	4	68	28	28	20	48	76
Alto	2	1	2	0	2	5	0	12	7	6	3	9	16

sin v                      Pacientes sin variantes  
 una v                     Pacientes con una variante heterocigótica en v60, v80 o v92  
 dos v                     Pacientes con dos variantes heterocigóticas o una homocigótica en v60, v80 y/o v92.  
 >0 v                     Pacientes con al menos una variante en v60, v80 o v92

Bajo                      Grupo con daño bajo; el C(t) está una desviación estándar por encima de la media de la población  
 Prom. + alto            Grupo con daño promedio y superior; el C(t) está menos de una desviación estándar por encima de la media de la población

5 En las dos tablas siguientes se observa una excepción al tener en cuenta únicamente variantes que típicamente no se asocian con un fenotipo de riesgo. Estas variantes en las posiciones de aminoácido 60 y 92 están infrarrepresentadas en la población con riesgo bajo, lo que quizás indica que su combinación exclusiva de propensión al daño como consecuencia de la variantes del MC1R vinculada con una ausencia de indicios visuales tales como la piel clara o el cabello pelirrojo, que indican un riesgo aumentado, da lugar a un nivel de daño consistentemente más alto en los portadores.

Tabla 8: comparación de las variantes v60 y v92 del MC1R frente al nivel de daño en el ADN

10 Pruebas de proporciones agrupadas usando solamente v60 y v92

Daño	SIN V	>0 V	N.º de pacientes
Bajo	19	1	20
Prom. + alto	63	29	92

		n1	n2	p1	p2	n1+n2	1/n1+1/n2	p1hat	p2hat	delta phat	phat	phat(1-phat)	z	p	¿sig a 0,95?	¿sig a 0,90?
bajo frente a prom.+ alto	sin v	20	92	19	63	112	0,06	0,95	0,68	0,27	0,73	0,20	2,43	0,02	SÍ	SÍ
	>0 v	20	92	1	29	112	0,06	0,05	0,32	0,27	0,27	0,20	2,43	0,02	SÍ	SÍ

Sin V Pacientes sin variantes

una v Pacientes con una variante heterocigótica en v60, v80 o v92

dos v Pacientes con dos variantes heterocigóticas o una homocigótica en v60, v80 y/o v92

>0 v Pacientes con al menos una variante en v60, v80 o v92

Bajo Grupo con daño bajo; el C(t) está una desviación estándar por encima de la media de la población

Prom. + alto Grupo con daño promedio y superior; el C(t) está menos de una desviación estándar por encima de la media de la población

15 Ejemplo 8: muestreo con aguja para la determinación de la fotoedad

Una herramienta adicional que hace uso de un procedimiento de muestreo mínimamente invasivo vinculado con un marcador mitocondrial para evaluar la exposición a RUV se proporciona realizando un muestreo del tejido epitelial de la cara o la cabeza, tal como el lóbulo de la oreja o cerca del arco superciliar, con una aguja de calibre pequeño (calibre 28), expulsar el micronúcleo en una solución, realizar la extracción del ácido nucleico y medir la cantidad de un objetivo mitocondrial asociado con el daño por RUV tal como la delección de 3895 pb (véase el ejemplo 1). Después, se compara este resultado con una base de datos de resultados y se clasifica en una cohorte de edad basándose en el nivel de delección de 3895 pb. La base de datos se crea midiendo los niveles de delección de 3895 pb en varios individuos en intervalos de 5 años con edades de entre 0 y 80 años, hallando agrupaciones o medias para cada intervalo, eliminando los valores atípicos y estableciendo la correlación del intervalo del nivel de delección de 3895 pb con un intervalo de edad. Por ejemplo, se pueden correlacionar valores de CT desde 21,5-23,5 con un intervalo de edad de 45-65 años. Después, se compararían los resultados de la prueba de un individuo con su edad cronológica para determinar si presenta un fotodaño mayor o menor que otros individuos de su grupo de edad y asignarle una fotoedad con base en su resultado.

Para crear esta base de datos, se tomaron micronúcleos de 289 individuos, tanto de su lóbulo de la oreja como del arco superciliar. Como se muestra en la figura 13, después de la extracción del ADN y cuantificación del nivel de delección de 3895 pb, se construyó la base de datos como se describe anteriormente con cohortes de edad clasificadas en 3 grupos con una diferencia significativa entre ellos ( $p < 0,01$ ).

35

**Listado de secuencias**

<110> Genesis Genomics Inc.

- 5 <120> Procedimientos para someter a ensayo variantes del MC1R y marcadores mitocondriales en muestras de piel
- <130> 102222/00047
- 10 <140> -
- <141> 14-10-2008
- <150> PCT/CA2007/001790
- <151> 11-10-2007
- 15 <150> US 60/999.074
- <151> 15-10-2007
- <160> 12
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 12674
- 25 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

30	gatcacaggt ctatcacctt attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttggtatfff	60
	cgctctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgfc	120
	gcagtatctg tctttgattc ctgcctcatc ctattattta tgcacacctac gttcaatatt	180
35	acaggcgaac atacttacta aagtgtgtta attaattaat gcttgtagga cataataata	240
	acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca	300
40	aacccccct cccccgcttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aacccccaaa	360
	acaagaacc ctaacaccag cctaaccaga tttcaaattt tatcttttgg cggtatgcac	420
	ttttaacagt cccccccaa ctaacacatt attttccct cccactccca tactactaat	480
45	ctcatcaata caacccccgc ccactctacc cagcacacac acaccgctgc taaccccata	540
	ccccgaaaat gttggttata cccttcccgct actaattaat cccctggccc aaccgctcat	600
	ctactctacc atctttgcag gcacactcat cacagcgcta agctcgact gattttttac	660
50	ctgagtaggc ctagaataa acatgctagc ttttattcca gttctaacca aaaaaataaa	720
	ccctcgttcc acagaagctg ccataagta tttcctcacg caagcaaccg catccataat	780
55	ccttctaata gctatcctct tcaacaatat actctccgga caatgaacca taaccaatac	840
	taccaatcaa tactcatcat taataatcat aatagctata gcaataaac taggaatagc	900
	cccccttcac ttctgagctc cagaggttac ccaaggcacc cctctgacat ccggcctgct	960
60	tcttctcaca tgacaaaaac tagccccat ctcaatcata taccaaatct ctccctcact	1020
	aaacgtaagc cttctctca ctctctcaat cttatccatc atagcaggca gttgaggtgg	1080

	attaaccaa	accagctac	gcaaaatctt	agcatactcc	tcaattaccc	acataggatg	1140
	aataatagca	gttctaccgt	acaaccctaa	cataaccatt	cttaatttaa	ctatttatat	1200
5	tatcctaact	actaccgcat	tcctactact	caacttaaac	tccagcacca	cgaccctact	1260
	actatctcgc	acctgaaaca	agctaacatg	actaacaccc	ttaattccat	ccaccctcct	1320
	ctccctagga	ggcctgcccc	cgctaaccgg	ctttttgccc	aaatgggcca	ttatcgaaga	1380
10	attcacaaaa	aacaatagcc	tcatcatccc	caccatcata	gccaccatca	ccctccttaa	1440
	cctctacttc	tacctagcc	taatctactc	cacctcaatc	acactactcc	ccatatctaa	1500
15	caacgtaaaa	ataaaatgac	agtttgaaca	tacaaaaccc	accccatcc	tccccacact	1560
	catcgccctt	accagctac	tcctacctat	ctcccccttt	atactaataa	tcttatagaa	1620
	atntaggtta	aatacagacc	aagagccttc	aaagccctca	gtaagttgca	atacttaatt	1680
20	tctgtaacag	ctaaggactg	caaaacccca	ctctgcatca	actgaacgca	aatcagccac	1740
	tttaattaag	ctaagccctt	actagaccaa	tgggacttaa	accacacaa	acttagttaa	1800
	cagctaagca	ccctaatcaa	ctggcttcaa	tctactctc	ccgccgccgg	gaaaaaggc	1860
25	gggagaagcc	ccggcagggt	tgaagctgct	tcttcgaatt	tgcaattcaa	tatgaaaatc	1920
	acctcggagc	tggtaaaaag	aggcctaacc	cctgtcttta	gatttacagt	ccaatgcttc	1980
30	actcagccat	tttacctcac	ccccactgat	gttcgccgac	cgttgactat	tctctacaaa	2040
	ccacaaagac	attggaacac	tatacctatt	atcggcgca	tgagctggag	tcctaggcac	2100
	agctctaagc	ctccttattc	gagccgagct	gggccagcca	ggcaaccttc	taggtaacga	2160
35	ccacatctac	aacgttatcg	tcacagccca	tgcatttgta	ataatcttct	tcatagtaat	2220
	acccatcata	atcggaggct	ttggcaactg	actagtccc	ctaataatcg	gtgccccga	2280
	tatggcgttt	ccccgcataa	acaacataag	cttctgactc	ttacctccct	ctctcctact	2340
40	cctgctcgca	tctgctatag	tggaggccgg	agcaggaaca	ggttgaacag	tctaccctcc	2400
	cttagcaggg	aactactccc	accctggagc	ctccgtagac	ctaaccatct	tctccttaca	2460
45	cctagcaggt	gtctcctcta	tcttaggggc	catcaatttc	atcacacaa	ttatcaatat	2520
	aaaacccct	gccataaccc	aataccaaac	gcccctcttc	gtctgatccg	tcctaactac	2580
	agcagtccta	cttctcctat	ctctcccagt	cctagctgct	ggcatcacta	tactactaac	2640
50	agaccgcaac	ctcaacacca	ccttcttcga	ccccgccgga	ggaggagacc	ccattctata	2700
	ccaacaccta	ttctgatttt	tcggtcaccc	tgaagtttat	attcttatcc	taccaggctt	2760
	cggataatc	tcccatattg	taacttacta	ctccggaaaa	aaagaacat	ttggatacat	2820
55	aggatggtc	tgagctatga	tatcaattgg	cttcctaggg	tttatcgtgt	gagcacacca	2880
	tatatttaca	gtaggaatag	acgtagacac	acgagcatat	ttcacctccg	ctaccataat	2940
60	catcgctatc	cccaccggcg	tcaaagtatt	tagctgactc	gccacactcc	acggaagcaa	3000

	tatgaaatga tctgctgcag tgctctgagc cctaggattc atctttcttt tcaccgtagg	3060
	tggcctgact ggcattgtat tagcaaactc atcactagac atcgtactac acgacacgta	3120
5	ctacgttgta gcccacttcc actatgtcct atcaatagga gctgtatttg ccatcatagg	3180
	aggcttcatt cactgatttc cctatttctc aggctacacc ctagacccaaa cctacgccaa	3240
	aatccatttc actatcatat tcctcggcgt aaatctaact ttcttcccac aacactttct	3300
10	cggcctatcc ggaatgcccc gacgttactc ggactacccc gatgcataca ccacatgaaa	3360
	catcctatca tctgtaggct cattcatttc tctaacagca gtaatattaa taattttcat	3420
15	gatttgagaa gccttcgctt cgaagcgaaa agtcctaata gtagaagaac cctccataaa	3480
	cctggagtga ctatatggat gccccccacc ctaccacaca ttcgaagaac ccgatacat	3540
	aaaatctaga caaaaaagga aggaatcgaa ccccccaaag ctggtttcaa gccaacccca	3600
20	tggcctccat gactttttca aaaagggtatt agaaaaacca ttccataact ttgtcaaagt	3660
	taaattatag gctaaatcct atatatctta atggcacatg cagcgcaagt aggtctacaa	3720
	gacgtactt cccctatcat agaagagctt atcaccttc atgatcacgc cctcataatc	3780
25	attttcctta tctgcttctt agtcctgtat gcccttttcc taacactcac aacaaaacta	3840
	actaatacta acatctcaga cgctcaggaa atagaaaccg tctgaactat cctgcccgcc	3900
30	atcatcctag tcctcatcgc cctcccatcc ctacgcatcc ttacataac agacgaggtc	3960
	aacgatccct cccttaccat caaatcaatt ggccaccaat ggtactgaac ctacgagtac	4020
	accgactacg gcggactaat cttcaactcc tacatacttc cccattatt cctagaacca	4080
35	ggcgacctgc gactccttga cgttgacaat cgagtagtac tcccgattga agccccatt	4140
	cgtataataa ttacatcaca agacgtcttg cactcatgag ctgtccccac attaggctta	4200
40	aaaacagatg caattcccgg acgtctaaac caaaccactt tcaccgctac acgaccgggg	4260
	gtatactacg gtcaatgctc tgaaatctgt ggagcaaacc acagtttcat gcccatcgtc	4320
	ctagaattaa ttcccctaaa aatctttgaa atagggcccc tatttaccct atagcacccc	4380
45	ctctaccccc tctagagccc actgtaaagc taacttagca ttaacctttt aagttaaaga	4440
	ttaagagaac caacacctct ttacagtga atgccccaac taaatactac cgtatggccc	4500
	accataatta cccccatact ccttactacta ttctcatca cccaactaaa aatattaac	4560
50	acaaactacc acctacctcc ctcaccaaag ccataaaaa taaaaaatta raacaaacc	4620
	tgagaaccaa aatgaacgaa aatctgttcg cttcattcat tgccccaca atcctaggcc	4680
	tacccgccgc agtactgatc attctatttc cccctctatt gatccccacc tccaaatatc	4740
55	tcacacaaca cggactaatc accacccaac aatgactaat caaactaacc tcaaaacaaa	4800
	tgataaccat acacaacact aaaggacgaa cctgatctct tatactagta tccttaatca	4860
60	tttttattgc cacaactaac ctctcgggac tctgctca ctcatttaca ccaaccacc	4920

	aactatctat	aaacctagcc	atggccatcc	ccttatgagc	gggcacagtg	attataggct	4980
	ttcgctctaa	gattaaaaat	gccctagccc	acttcttacc	acaaggcaca	cctacacccc	5040
5	ttatccccat	actagttatt	atcgaaaacca	tcagcctact	cattcaacca	atagccctgg	5100
	ccgtacgcct	aaccgctaac	attactgcag	gccacctact	catgcaccta	attggaagcg	5160
	ccaccctagc	aatatcaacc	attaaccttc	cctctacact	tatcatcttc	acaattctaa	5220
10	ttctactgac	tatcctagaa	atcgctgctg	ccttaatcca	agcctacggt	ttcacacttc	5280
	tagtaagcct	ctacctgcac	gacaacacat	aatgaccac	caatcacatg	cctatcatat	5340
15	agtaaaaccc	agcccatgac	ccctaacagg	ggccctctca	gccctcctaa	tgacctccgg	5400
	cctagccatg	tgatttctact	tccactccat	aacgctcttc	atactaggcc	tactaaccaa	5460
	cacactaacc	atataccaat	gatggcgcga	tgtaacacga	gaaagcacat	accaaggcca	5520
20	ccacacacca	cctgtccaaa	aaggccttcg	atacgggata	atcctattta	ttacctcaga	5580
	agtttttttc	ttcgcaggat	ttttctgagc	cttttaccac	tcagcctag	cccctacccc	5640
	ccaattagga	gggcaactggc	ccccaacagg	catcaccccg	ctaaatcccc	tagaagtccc	5700
25	actcctaaac	acatccgtat	tactcgcac	aggagtatca	atcacctgag	ctcaccatag	5760
	tctaatagaa	aacaaccgaa	accaaataat	tcaagcactg	cttattacaa	ttttactggg	5820
30	tctctatttt	accctctac	aagcctcaga	gtacttcgag	tctcccttca	ccatttccga	5880
	cggcatctac	ggctcaacat	ttttgtagc	cacaggcttc	cacggacttc	acgtcattat	5940
	tggctcaact	ttcctcacta	tctgcttcat	ccgccaaacta	atatttctact	ttacatccaa	6000
35	acatcacttt	ggcttcgaag	ccgccgctg	atactggcat	tttgtagatg	tggtttgact	6060
	atctctgtat	gtctccatct	attgatgagg	gtcttactct	tttagtataa	atagtaccgt	6120
	taacttccaa	ttaactagtt	ttgacaacat	tcaaaaaaga	gtaataaact	tcgccttaat	6180
40	tttaataatc	aacaccctcc	tagccttact	actaataatt	attacatttt	gactaccaca	6240
	actcaacggc	tacatagaaa	aatccacccc	ttacgagtgc	ggcttcgacc	ctatatcccc	6300
45	cgcccgcgtc	cctttctcca	taaaattctt	cttagtagct	attaccttct	tattatttga	6360
	tctagaaatt	gccctccttt	tacccttacc	atgagcccta	caaacaacta	acctgccact	6420
	aatagttatg	tcatccctct	tattaatcat	catcctagcc	ctaagtctgg	cctatgagtg	6480
50	actacaaaaa	ggattagact	gaaccgaatt	ggtatatagt	ttaacaaaaa	cgaatgattt	6540
	cgactcatta	aattatgata	atcatattta	ccaaatgcc	ctcatttaca	taaatattat	6600
	actagcattt	accatctcac	ttctaggaat	actagtatat	cgctcacacc	tcatatcttc	6660
55	cctactatgc	ctagaaggaa	taatactatc	gctgttcatt	atagctactc	tcataaccct	6720
	caacaccac	tcctcttag	ccaatattgt	gcctattgcc	atactagtct	ttgccgctg	6780
60	cgaagcagcg	gtgggcctag	ccctactagt	ctcaatctcc	aacacatag	gcctagacta	6840

	cgtacataac	ctaaacctac	tccaatgcta	aaactaatcg	tcccaacaat	tatattacta	6900
	ccactgacat	gactttccaa	aaaacacata	atltgaaatca	acacaaccac	ccacagccta	6960
5	attattagca	tcatecctct	actatltttt	aaccaaataca	acaacaacct	atlttagctgt	7020
	tccccaacct	tttctctcga	ccccctaaca	acccccctcc	taataactaac	tacctgactc	7080
10	ctacccctca	caatcatggc	aagccaacgc	cacttatcca	gtgaaccact	atcacgaaaa	7140
	aaactctacc	tctctatact	aatctcccta	caaatactct	taattataac	atlcacagcc	7200
	acagaactaa	tcataatltta	tatctttctc	gaaaccacac	ttatccccac	cttggtctatc	7260
15	atcacccgat	gaggcaacca	gccagaacgc	ctgaacgcag	gcacatactt	cctattctac	7320
	accctagtag	gctcccttcc	cctactcctc	gcactaatlt	acactcacia	caccctaggg	7380
	tcactaaaca	ttctactact	cactctcact	gccccagaac	tatcaaactc	ctgagccaac	7440
20	aacttaatat	gactagctta	cacaatagct	tttatagtaa	agatacctct	ttacggactc	7500
	cacttatgac	tcctaaagc	ccatgtcgaa	gccccatcg	ctgggtcaat	agtacttgcc	7560
25	gcagtactct	taaaactagg	cggtatgggt	ataatacgcc	tcacactcat	tctcaacccc	7620
	ctgacaaaac	acatagccta	ccccttctct	gtactatccc	tatgaggcat	aattataaca	7680
	agctccatct	gcctacgaca	aacagaccta	aaatcgctca	ttgcatactc	ttcaatcagc	7740
30	cacatagccc	tcgtagtaac	agccattctc	atccaaaccc	cctgaagctt	caccggcgca	7800
	gtcattctca	taatcgccc	cggtcttaca	tcctcattac	tattctgcct	agcaaaactca	7860
	aactacgaac	gcactcacag	tcgcatcata	atcctctctc	aaggacttca	aactctactc	7920
35	ccactaatag	ctttttgatg	acttctagca	agcctcgcta	acctcgctt	acccccact	7980
	attaacctac	tgggagaact	ctctgtgcta	gtaaccacgt	tctcctgatc	aaatatact	8040
40	ctcctactta	caggactcaa	catactagtc	acagccctat	actcctctca	catatlttacc	8100
	acaacacaaat	ggggctcact	caccaccac	attaacaaca	taaaaccctc	atlcacacga	8160
	gaaaacaccc	tcatgttcat	acacctatcc	cccattctcc	tcctatccct	caaccccgac	8220
45	atcattaccg	ggttttctct	ttgtaaataat	agtttaacca	aaacatcaga	ttgtgaaatct	8280
	gacaacagag	gcttacgacc	ccttatlttac	cgagaaaagct	cacaagaact	gctaactcat	8340
	gccccatgt	ctaacaacat	ggctttctca	actltttaaag	gataacagct	atccattgggt	8400
50	cttaggcccc	aaaaatlttg	gtgcaactcc	aaataaaaagt	aataaccatg	cacactacta	8460
	taaccaccct	aacctgact	tcctaatcc	cccccatcct	taccaccctc	gttaacccta	8520
55	acaaaaaaaa	ctcatacccc	cattatgtaa	aatccattgt	cgcatccacc	tttattatca	8580
	gtctcttccc	cacaacaata	ttcatgtgcc	tagaccaaga	agttattatc	tcgaactgac	8640
	actgagccac	aacccaaaca	accagctct	ccctaagctt	caaactagac	tacttctcca	8700
60	taatattcat	ccctgtagca	ttgttcgtta	catgggtccat	catagaattc	tcactgtgat	8760

	atataaactc agacccaaac attaatcagt tcttcaaata tctactcatc ttcttaatta	8820
	ccataactaat cttagttacc gctaacaacc tattccaact gttcatcggc tgagagggcg	8880
5	taggaattat atccttcttg ctcatcagtt gatgatacgc ccgagcagat gccaacacag	8940
	cagccattca agcaatccta tacaaccgta tcggcgatat cggtttcatc ctgccttag	9000
10	catgatttat cctacactcc aactcatgag acccacaaca aatagccett ctaaacgcta	9060
	atccaagcct caccctacta ctaggcctcc tcttagcagc agcaggcaaa tcagcccaat	9120
	taggtctcca cccctgactc ccctcagcca tagaaggccc caccctcagtc tcagccctac	9180
15	tccactcaag cactatagtt gtagcaggaa tcttcttact catccgcttc caccctctag	9240
	cagaaaatag cccactaatc caaactctaa cactatgctt aggcgctatc accactctgt	9300
	tcgcagcagt ctgcgccctt acacaaaatg acatcaaaaa aatcgtagcc ttctccactt	9360
20	caagtcaact aggactcata atagttacaa tcggcatcaa ccaaccacac ctagcattcc	9420
	tgcacatctg taccacgccc ttcttcaaag ccatactatt tatgtgctcc gggctccatca	9480
	tccacaacct taacaatgaa caagatattc gaaaaatagg aggactactc aaaaccatac	9540
25	ctctcacttc aacctccctc accattggca gcctagcatt agcaggaata cctttcctca	9600
	caggtttcta ctccaaagac cacatcatcg aaaccgcaaa catatcatac acaaacgcct	9660
30	gagccctatc tattactctc atcgctacct ccctgacaag cgcctatagc actcgaataa	9720
	ttcttctcac cctaacaggt caacctcget tccccacct tactaacatt aacgaaaata	9780
	accccacctt actaaacccc attaaacgcc tggcagccgg aagcctattc gcaggatttc	9840
35	tcattactaa caacatttcc cccgcacccc ccttccaac aacaatcccc ctctacctaa	9900
	aactcacagc cctcgtctc actttcctag gacttctaac agccctagac ctcaactacc	9960
40	taaccaacaa acttaaaata aaatccccac tatgcacatt ttatttctcc aacatactcg	10020
	gattctacct tagcatcaca caccgcacaa tcccctatct aggccttctt acgagccaaa	10080
	acctgcccct actctctcta gacctaacct gactagaaaa gctattacct aaaacaattt	10140
45	cacagcacca aatctccacc tccatcatca cctcaacca aaaaggcata attaaacttt	10200
	acttctctc tttcttcttc ccactcatcc taaccctact cctaatacaca taacctattc	10260
	ccccgagcaa tctcaattac aatataatac ccaacaacaa atgttcaacc agtaactact	10320
50	actaatcaac gcccataatc atacaaagcc cccgcaccaa taggatcctc ccgaatcaac	10380
	cctgaccctt ctcttctata aattattcag ctctctacac tattaagtt taccacaacc	10440
	accaccccat catactcttt caccacagc accaatccta cctccatcgc taacccact	10500
55	aaaacactca ccaagacctc aaccctgac ccccatgcct caggatactc ctcaatagcc	10560
	atcgctgtag tatatccaaa gacaaccatc attcccccta aataaattaa aaaaactatt	10620
60	aaacccatat aacctcccc aaaattcaga ataataacac acccgaccac accgctaaca	10680

atcaatacta aacccccata aataggagaa ggcttagaag aaaacccac aaacccatt 10740  
 actaaacca cactcaacag aaacaaagca tacatcatta ttctcgcacg gactacaacc 10800  
 5 acgaccaatg atatgaaaaa ccatcgttgt atttcaacta caagaacacc aatgaccca 10860  
 atacgcaaaa ctaacccct aataaaatta attaaccact cattcatcga cctccccacc 10920  
 ccatccaaca tctccgcatg atgaaacttc ggctcactcc ttggcgctg cctgatcctc 10980  
 10 caaatcacca caggactatt cctagccatg cactactcac cagacgctc aaccgccttt 11040  
 tcatcaatcg cccacatcac tcgagacgta aattatggct gaatcatccg ctacctcac 11100  
 15 gccaatggcg cctcaatatt ctttatctgc ctcttctac acatcggcg aggcctatat 11160  
 tacggatcat ttctctactc agaaacctga aacatcggca ttatctctct gcttgcaact 11220  
 atagcaacag cttcatagg ctatgtctc ccgtgaggcc aaatatcatt ctgaggggccc 11280  
 20 acagtaatta caaacttact atccgccatc ccatacattg ggacagacct agttcaatga 11340  
 atctgaggag gctactcagt agacagtccc accctcacac gattctttac ctttacttc 11400  
 atcttgccct tcattattgc agccctagca aactccacc tctattctt gcacgaaacg 11460  
 25 ggatcaaaca acccctagg aatcacctc cattccgata aaatcacctt ccacccttac 11520  
 tacacaatca aagacgcctt cggcttactt ctcttcttc tctcttaat gacattaaca 11580  
 30 ctattctcac cagacctctt aggcgacca gacaattata ccctagccaa ccccttaaac 11640  
 acccctccc acatcaagcc cgaatgatat ttctattcg cctacacaat tctccgatcc 11700  
 gtccctaaca aactaggagg cgtccttgcc ctattactat ccacctcat cctagcaata 11760  
 35 atccccatcc tccatatac caacaacaa agcataatat ttgcgccact aagccaatca 11820  
 ctttattgac tcttagccgc agacctctc attctaacct gaatcggagg acaaccagta 11880  
 40 agctaccctt ttaccatcat tggacaagta gcatccgtac tatacttcac aacaatccta 11940  
 atcctaatac caactatctc cctaattgaa aacaaaatac tcaaatgggc ctgtccttgt 12000  
 agtataaact aatacaccag tcttgtaaac cggagatgaa aaccttttc caaggacaaa 12060  
 45 tcagagaaaa agtctttaac tccaccatta gcacccaaag ctaagattct aatttaaaact 12120  
 attctctggt ctttcatggg gaagcagatt tgggtaccac ccaagtattg actcaccat 12180  
 caacaaccgc tatgtatttc gtacattact gccagccacc atgaatattg tacggtagca 12240  
 50 taaataactg accacctgta gtacataaaa acccaatcca catcaaaacc cctccccat 12300  
 gcttacaagc aagtacagca atcaaccctc aactatcaca catcaactgc aactccaaag 12360  
 ccacccctca cccactagga taccaacaaa cctaccacc cttaacagta catagtacat 12420  
 55 aaagccattt accgtacata gcacattaca gtcaaatecc ttctcgtccc catggatgac 12480  
 cccctcaga taggggtccc ttgaccacca tctcctgtga aatcaatctc ccgcacaaga 12540  
 60 gtgctactct cctcgtccg ggcccataac acttgggggt agctaaagtg aactgtatcc 12600

	<b>gacatctggt tcctacttca gggtcataaa gcctaaatag cccacacggt ccccttaaat</b>	<b>12660</b>
	<b>aagacatcac gatg</b>	<b>12674</b>
5		
	<210> 2	
	<211> 3895	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> caract_misc	
	<222> (2559)..(2559)	
15	<223> n es a, c, g o t	
	<400> 2	
20	ccaaccaaac cccaaagaca cccccacag tttatgtagc ttacctctc aaagcaatac	60
	actgaaaatg tttagacggg ctcacatcac cccataaaca aataggtttg gtcctagcct	120
	ttctattagc tcttagtaag attacacatg caagcatccc cgttccagtg agttcacctt	180
25	ctaaatcacc acgatcaaaa ggaacaagca tcaagcacgc agcaatgcag ctcaaaacgc	240
	ttagcctagc cacaccccca cgggaaacag cagtgattaa cctttagcaa taaacgaaag	300
30	tttaactaag ctatactaac cccaggggtg gtcaatttcg tgccagccac cgcggtcaca	360
	cgattaacct aagtcaatag aagccggcgt aaagagtgtt ttagatcacc ccctcccaa	420
	taaagctaaa actcacctga gttgtaaaaa actccagttg acacaaaata gactacgaaa	480
35	gtggctttaa catatctgaa cacacaatag ctaagacca aactgggatt agatacccca	540
	ctatgcttag ccctaaacct caacagttaa atcaacaaaa ctgctcgcca gaacactag	600
	agccacagct taaaactcaa aggacctggc ggtgcttcat atccctctag aggagcctgt	660
40	tctgtaatcg ataaaccccg atcaacctca ccacctctg ctcagcctat ataccgccat	720
	cttcagcaaa cctgatgaa ggctacaaag taagcgcaag taccacgta aagacgttag	780
45	gtcaagggtg agcccatgag gtggcaagaa atgggctaca tttctacct cagaaaacta	840
	cgatagccct tatgaaactt aagggtcgaa ggtggattta gcagtaaact aagagtagag	900
	tgcttagttg aacagggccc tgaagcgcgt acacaccgcc cgtcaccctc ctcaagtata	960
50	cttcaaagga catttaacta aaacccttac gcatttatat agaggagaca agtcgtaaca	1020
	tggtaatgtg actggaaagt gcacttggaac gaaccagagt gttagcttaac acaaagcacc	1080
	caacttacac ttaggagatt tcaacttaac ttgaccgctc tgagctaaac cttagcccaa	1140
55	accactcca ccttactacc agacaacctt agccaaacca tttacccaaa taaagtatag	1200
	gcatagaaaa ttgaaacctg gcgcaataga tatagtaccg caagggaaag atgaaaaatt	1260
60	ataaccaagc ataatatagc aaggactaac ccctatacct tctgcataat gaattaacta	1320
	gaaataactt tgcaaggaga gccaaagcta agacccccga aaccagacga gctacctag	1380
	aacagctaaa agagcacacc cgtctatgta gcaaaatagt gggaagattt ataggtagag	1440

	gcgacaaacc	taccgagcct	ggtgatagct	ggttgtccaa	gatagaatct	tagttcaact	1500
	ttaaatttgc	ccacagaacc	ctctaaatcc	ccttgtaa	ttaactgtta	gtccaaagag	1560
5	gaacagctct	ttggacacta	ggaaaaaacc	ttgtagagag	agtaaaaaat	ttaacaccca	1620
	tagtaggcct	aaaagcagcc	accaattaag	aaagcgttca	agctcaacac	ccactaccta	1680
	aaaaatccca	aacatataac	tgaactcctc	acacccaatt	ggaccaatct	atcacccctat	1740
10	agaagaacta	atgttagtat	aagtaacatg	aaaacattct	cctccgcata	agcctgcgctc	1800
	agattaaaac	actgaactga	caattaacag	cccaatatct	acaatcaacc	aacaagtcac	1860
15	tattaccctc	actgtcaacc	caacacaggc	atgctcataa	ggaaagggtta	aaaaaagtaa	1920
	aaggaactcg	gcaaattctta	ccccgcctgt	ttaccaaaaa	catcacctct	agcatcacca	1980
	gtattagagg	caccgcctgc	ccagtgacac	atgtttaacg	gccgcggtac	cctaaccgtg	2040
20	caaaggtagc	ataatcactt	gttccttaaa	tagggacctg	tatgaatggc	tccacgaggg	2100
	ttcagctgtc	tcttactttt	aaccagtgaa	attgacctgc	ccgtgaagag	gcgggcataa	2160
	cacagcaaga	cgagaagacc	ctatggagct	ttaatttatt	aatgcaaaca	gtacctaac	2220
25	aaccacagc	tcctaaacta	ccaaacctgc	attaaaaatt	tcggttgggg	cgacctcgga	2280
	gcagaaccca	acctccgagc	agtacatgct	aagacttcac	cagtcaaagc	gaactactat	2340
30	actcaattga	tccaataact	tgaccaacgg	aacaagttac	cctagggata	acagcgcac	2400
	cctattctag	agtccatata	aacaataggg	tttacgacct	cgatgttgg	tcaggacatc	2460
	ccgatggtgc	agccgctatt	aaaggttcgt	ttgttcaacg	attaaagtcc	tacgtgatct	2520
35	gagttcagac	cggagtaatc	caggtcgggt	tctatctanc	ttcaaattcc	tcctgtacg	2580
	aaaggacaag	agaaataagg	cctacttcac	aaagcgctt	ccccgtaaa	tgatatcatc	2640
40	tcaacttagt	attataccca	caccaccca	agaacaggg	ttgttaagat	ggcagagccc	2700
	ggtaatcgca	taaaacttaa	aactttacag	tcagaggttc	aattcctctt	cttaacaaca	2760
	tacccatggc	caacctccta	ctcctcattg	taccattct	aatcgcaatg	gcattcctaa	2820
45	tgcttaccga	acgaaaaatt	ctaggctata	tacaactacg	caaaggcccc	aacgttgtag	2880
	gcccctacgg	gctactacaa	cccttcgctg	acgccataaa	actcttcacc	aaagagcccc	2940
	taaaacccgc	cacatctacc	atcacctct	acatcacccg	cccgacctta	gctctcacca	3000
50	tcgctcttct	actatgaacc	cccctcccc	tacccaaccc	cctggtcaac	ctcaacctag	3060
	gcctcttatt	tattctagcc	acctctagcc	tagccgttta	ctcaatcctc	tgatcaggg	3120
55	gagcatcaaa	ctcaaacctac	gccctgatcg	gcgcactgcg	agcagtagcc	caaacaatct	3180
	catatgaagt	caccctagcc	atcattctac	tatcaacatt	actaataagt	ggctccttta	3240
	acctctccac	ccttatcaca	acacaagaac	acctctgatt	actcctgcca	tcatgacct	3300
60	tggccataat	atgatttatc	tccacactag	cagagaccaa	ccgaaccccc	ttcgaccttg	3360

ES 2 523 684 T3

ccgaagggga gtccgaacta gtctcaggct tcaacatcga atacgccgca ggccccctcg 3420  
 ccctattctt catagccgaa tacacaaaca ttattataat aacaccctc accactacaa 3480  
 5 tcttcctagg aacaacatat gacgcactct cccctgaact ctacacaaca tattttgtca 3540  
 ccaagaccct acttetaacc tccctgttct tatgaattcg aacagcatac ccccgattec 3600  
 gctacgacca actcatacac ctctatgaa aaaacttctt accactcacc ctagcattac 3660  
 10 ttatatgata tgtctccata cccattacaa tctccagcat tccccctcaa acctaagaaa 3720  
 tatgtctgat aaaagagtta ctttgataga gtaaataata ggagcttaa cccccctatt 3780  
 tctaggacta tgagaatcga acccatcctt gagaatcaa aattctcctg gccacctatc 3840  
 15 acaccccatc ctaaagtaag gtcagctaaa taagctatcg ggcccatacc ccgaa 3895

<210> 3  
 <211> 2360  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 25 gagagggcag gtccccggga agctccggac tcctagaggg gcggccaggt gggggccctg 60  
 gtgaccagga cagactgtgg tgtttttaa cgtaaaggag atccgcggtg tgagggaccc 120  
 30 cctgggtcct gcacgcccgc tgggtggcagg ccgggccatg gtgggtgctc acgcccccg 180  
 catgtggccg ccctcagtgg gaggggctct gagaacgact ttttaaacg cagagaaaag 240  
 35 ctccattctt cccaggacct cagcgcagcc ctggcccagg aaggcaggag acagaggcca 300  
 ggacggtcca gaggtgtcga aatgtcctgg ggacctgagc agcagccacc agggaagagg 360  
 cagggagggga gctgaggacc aggcttggtt gtgagaatcc ctgagcccag gcggtagatg 420  
 40 ccaggagggtg tctggactgg ctgggccatg cctgggctga cctgtccagc cagggagagg 480  
 gtgtgagggc agatctgggg gtgcccagat ggaaggaggc aggcattggg gacacccaag 540  
 gccccctggc agcaccatga actaagcagg acacctggag gggagaact gtggggacct 600  
 45 ggaggcctcc aacgactcct tcctgcttc tggacaggac tatggctgtg cagggatccc 660  
 agagaagact tctgggctcc ctcaactcca cccccacagc catccccag ctggggctgg 720  
 ctgccaacca gacaggagcc cgggtgcctgg aggtgtccat ctctgacggg ctcttctca 780  
 50 gcctggggct ggtgagcttg gtggagaacg cgctgggtgg ggcaccatc gccaagaacc 840  
 ggaacctgca ctcacccatg tactgcttca tctgctgcct ggccttgctg gacctgctgg 900  
 55 tgagcgggag caacgtgctg gagacggccg tcatcctcct gctggaggcc ggtgactgg 960  
 tggccccggc tgcggtgctg cagcagctgg acaatgtcat tgacgtgatc acctgcagct 1020  
 ccatgctgtc cagcctctgc ttctggggc ccatcgccgt ggaccgctac atctccatct 1080  
 60 tctacgcact gcgctaccac agcatcgtga ccctgcccgc ggcgcggcga gccgttgccg 1140

ES 2 523 684 T3

	ccatctgggt ggccagtgtc gtcttcagca cgctcttcat cgcctactac gaccacgtgg	1200
	ccgtcctgct gtgcctcgtg gtcttcttcc tggctatgct ggtgctcatg gccgtgctgt	1260
5	acgtccacat gctggccccg gcctgccagc acgcccaggg catcgccccg ctccacaaga	1320
	ggcagcgcgc ggtccaccag ggctttggcc ttaaaggcgc tgtcacccctc accatectgc	1380
	tgggcatttt ctctctctgc tggggccctt tcttctgca tctcacactc atcgctctct	1440
10	gccccgagca ccccacgtgc ggctgcatct tcaagaactt caacctcttt ctgcccctca	1500
	tcatctgcaa tgccatcatc gacccccctca tctacgcctt ccacagccag gagctccgca	1560
	ggacgctcaa ggaggtgctg acatgctcct ggtgagcgcg gtgcacgcgg cttaagtgt	1620
15	gctgggcaga gggaggtggt gatatttgtt ggtctggttc ctgtgtgacc ctgggcagtt	1680
	ccttacctcc ctggtccccg tttgtcaaag aggatggact aaatgatctc tgaaagtgtt	1740
20	gaagcgcgga cccttctggg tccagggagg ggtccctgca aaactccagg caggacttct	1800
	caccagcagt cgtggggaac ggaggaggac atggggaggt tgtggggcct caggctccgg	1860
	gcaccagggg ccaacctcag gctcctaaag agacattttc cgcctactcc tgggacactc	1920
25	cgtctgctcc aatgactgag cagcatccac cccaccccat ctttctgctc agctctcagg	1980
	accgtgcctt cgtcagctgg gatgtgaagt ctctgggtgg aagtgtgtgc caagagctac	2040
	tcccacagca gccccaggag aaggggcttt gtgaccagaa agcttcatcc acagccttgc	2100
30	agcggctcct gcaaaaggag gtgaaatccc tgcctcaggc caagggacca ggtttgagg	2160
	agccccctta gtggtatggg gctgagccct cctgagggcc ggttctaagg ctgagactgg	2220
35	gactggggc ctcagcctgc tttcctgag cagtgcacca agcagacagc cctggcaaat	2280
	gcctgactca gtgaccagtg cctgtgagca tggggccagg aaagtctggt aataaatgtg	2340
	actcagcatc acccacctta	2360
40		
	<210> 4	
	<211> 3115	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
45		
	<400> 4	
50	agacgcaguc uucagcaagg aagugcuggg aacgcccugg agugaaccca ggaagaugcc	60
	ugcagugggu gccagggccc cucuccaccg ucccugcugg gcuucggggc cacgcccgac	120
	ugcugugaac ggccugcgga gcaccacgug cgacggcugg aggcgagagg ucugccuuug	180
55	auguggcugu uggugcaggg ccuguggugc cuuccgcagc ggaaauggcg cgcgccccg	240
	ggagggcggg agcagcgucc cgggugcccc ugugaggau agcagcagaga ugacuggagg	300
	gucccugaag accucacuag ggugccctca gccgguccgc ucccaggaag cgacaccccc	360
60	acagccccag ggcugcagcu gagggggucg ccacucuggc ugggcgaggc ugggcccucg	420
	ggggcaggcg ccagaguggc cucaggcucu acaagaugcc ugaaaacacc aaccucucca	480

	gggcucacua	gcauuggacg	cuuucacgcu	cugcccuggc	cggaagcccc	cucaccccgc	540
	gcgaugugca	aacuccugca	gggcucacuc	aguuuccaga	acuuuaauua	uuggaaaguu	600
5	cucccugguc	cagcccccaa	aucugccgug	aacguugaca	gcugaguugc	ugcuccaugc	660
	gugcuuuggc	ugagagcaga	ggggaccccu	guccucccug	agcugcugac	gaggggaggg	720
	gugaagggug	gggccucugg	agagggcagg	ucccggggaa	gcuccggacu	ccuagagggg	780
10	cggccaggug	ggggcccugg	ugaccaggac	agacuguggu	guuuuuuaac	guaaaggaga	840
	uccgcggugu	gagggacccc	cuggguccug	cacgccgccu	gguggcaggc	cgggccauug	900
15	ugggugcuca	cgcccccggc	auguggccgc	ccucaguggg	aggggcucug	agaacgacuu	960
	uuuaaacgc	agagaaaagc	uccauucuuc	ccaggaccuc	agcgcagccc	uggcccagga	1020
	aggcaggaga	cagaggccag	gacgguccag	aggugucgaa	auguccuggg	gaccugagca	1080
20	gcagccacca	gggaagaggc	agggagggag	cugaggacca	ggcuugguug	ugagaauccc	1140
	ugagcccagg	cgguagaugc	caggaggugu	cuggacuggc	ugggccaugc	cugggcugac	1200
	cuguccagcc	agggagaggg	ugugagggca	gaucuggggg	ugcccagaug	gaaggaggca	1260
25	ggcauggggg	acacccaagg	ccccuggca	gcaccaugaa	cuaagcagga	caccuggagg	1320
	ggaagaacug	uggggaccug	gaggccucca	acgacuccuu	ccugcuuccu	ggacaggacu	1380
30	auggcugugc	agggauccca	gagaagacuu	cugggcuccc	ucaacuccac	ccccacagcc	1440
	aucucccagc	uggggcuggc	ugccaaccag	acaggagccc	ggugccugga	gguguccauc	1500
	ucugacgggc	ucuuccucag	ccuggggcug	gugagcuugg	uggagaacgc	gcugguggug	1560
35	gccaccaucg	ccaagaaccg	gaaccugcac	ucacccaugu	acugcuucau	cugcugccug	1620
	gccuugucgg	accugcuggu	gagcgggagc	aacgugcugg	agacggccgu	cauccuccug	1680
	cuggaggccg	gugcacuggu	ggcccgggcu	gcggugcugc	agcagcugga	caaugucauu	1740
40	gacgugauca	ccugcagcuc	caugcugucc	agccucugcu	uccugggcgc	caucgccgug	1800
	gaccgcuaca	ucuccaucuu	cuacgcacug	cgcuaaccaca	gcaucgugac	ccugccgcgg	1860
45	gcgcggcgag	ccguugcggc	caucuggggug	gccagugucg	ucuucagcac	gcucuucauc	1920
	gccuacuacg	accacguggc	cguccugcug	ugccucgugg	ucuucuuuccu	ggcuaugcug	1980
	gugcucaugg	ccgugcugua	cguccacaug	cuggcccggg	ccugccagca	cgcccagggc	2040
50	aucgcccggc	uccacaagag	gcagcgcgcc	guccaccagg	gcuuuggccu	uaaaggcgcu	2100
	gucaccucuca	ccauccugcu	gggcuuuuuc	uuccucugcu	ggggccccuu	cuuccugcau	2160
55	cucacacuca	ucguccucug	ccccgagcac	cccacgugcg	gcugcaucuu	caagaacuuc	2220
	aaccucuuc	ucgcccucau	caucugcaau	gccaucaucg	acccccucau	cuacgccuuc	2280
	cacagccagg	agcuccgcag	gacgcucaag	gaggugcuga	caugcuccug	gugagcgcg	2340
60	ugcacgcggc	uuuaagugug	cugggcagag	ggagguggug	auauugugug	gucugguucc	2400

ES 2 523 684 T3

ugugugaccc ugggcaguuc cuuaccuccc ugguccccgu uugucaaaga ggauggacua 2460  
 aaugaucucu gaaaguguug aagcgcggac ccuucugggu ccagggaggg gucccugcaa 2520  
 5 aacuccaggc aggacuucuc accagcaguc guggggaacg gaggaggaca uggggagguu 2580  
 guggggccuc aggcuccggg caccaggggc caaccucagg cuccuaaaga gacauuuucc 2640  
 gcccacuccu gggacacucc gucugcuca augacugagc agcauccacc ccaccccauc 2700  
 10 uuugcugcca gcucucagga ccgugcccuc gucagcuggg augugaaguc ucugggugga 2760  
 agugugugcc aagagcuacu cccacagcag ccccaggaga aggggcuuug ugaccagaaa 2820  
 15 gcuucaucca cagccuugca gcggcuccug caaaaggagg ugaaaucccu gccucaggcc 2880  
 aagggaccag guuugcagga gcccccuag ugguaugggg cugagcccuc cugagggccg 2940  
 guucuaaggc ucagacuggg cacuggggcc ucagccugcu uuccugcagc agucgcccua 3000  
 20 gcagacagcc cuggcaaug ccugacucag ugaccagugc cugugagcau ggggcccagga 3060  
 aagucuggua auaaauguga cucagcauca cccaccuuua aaaaaaaaaa aaaaa 3115

25 <210> 5  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador directo de la delección de 3895 en el ADNmt  
 <400> 5

35 ctgctaacc cataccccga aaatgtg 28

40 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cebador inverso de la delección de 3895 en el ADNmt  
 <400> 6

gaaggattat g gatgcggtt gcttgcgtga g 31

50 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador directo del genoma de ADNmt  
 <400> 7

60 cgttcagtg agttcacct c 21

65 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso del genoma de ADNmt  
 <400> 8

5 cactctttac gccggcttct att 23  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo 294-MC1R

15 <400> 9 –  
 cgccctcatc atctgcaatg 20  
 <210> 10  
 20 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador inverso 294-MC1R  
 <400> 10

30 ggctgtggaa ggcgtagat 19  
 <210> 11  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> sonda VIC 294V1-MC1R  
 <400> 11

40 ccatcatcga ccccct 16  
 <210> 12  
 <211> 16  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda FAM 294M1-MC1R

50 <400> 12  
 ccatcatcca ccccct 16

55

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un procedimiento de diagnóstico para determinar el estado de la piel y la predisposición genética de un sujeto al daño por RUV, que comprende:
- 10 (a) someter a ensayo una muestra de piel del sujeto para una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt), en el que la anomalía es una delección de 3895 pb en el ADNmt entre los nucleótidos 546 a 4444 del genoma del ADNmt;
- 15 (b) someter a ensayo una muestra de tejido del sujeto para una o más variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R), en el que las una o más variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M; y
- (c) determinar el estado de la piel y la predisposición genética del sujeto al daño por RUV basándose en la detección de la anomalía en el ADNmt y la(s) variante(s) del MC1R en las muestras de piel y tejido, respectivamente.
- 20 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se obtuvo la muestra de piel usando una técnica de toma de piel no invasiva o mínimamente invasiva.
- 25 3.- El procedimiento de la reivindicación 2, en el que se tomó la muestra de piel usando un hisopo estéril, un bastoncillo de algodón, una aguja de calibre pequeño para tomar micronúcleos de tejido epitelial o una combinación de los mismos.
- 30 4.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de piel se tomó de la capa dérmica o epidérmica del sujeto.
- 35 5.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de piel procede del talón, nariz, parte interna del brazo, oreja, boca, cuero cabelludo, pecho, hombro, nalga, espalda, cara, nuca, mano, cabeza o una combinación de los mismos.
- 6.- Uso del procedimiento de la reivindicación 1 para predecir fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel o para determinar un tratamiento profiláctico o terapéutico para evitar o mejorar el fotoenvejecimiento, daño por RUV o cáncer de piel.
- 40 7.- Un procedimiento para supervisar la respuesta de un sujeto a un tratamiento preventivo o terapéutico para el fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel, que comprende:
- (a) someter a ensayo una primera muestra de piel del sujeto para una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt), en el que la anomalía es una delección de 3895 pb en el ADNmt entre los nucleótidos 546 a 4444 del genoma del ADNmt;
- 45 (b) someter a ensayo una muestra de tejido del sujeto para una o más variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R), en el que las una o más variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M;
- 50 (c) determinar el estado de la piel y la predisposición genética del sujeto al daño por RUV basándose en la detección de la anomalía en el ADNmt en la primera muestra de piel y las una o más variantes del MC1R en la muestra de tejido;
- (d) someter a ensayo una segunda muestra de piel del sujeto para la anomalía en el ADNmt transcurrido un periodo de tiempo prescrito después de un tratamiento preventivo o terapéutico para el fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel;
- 55 (e) repetir la etapa (d) en intervalos regulares a lo largo de un periodo de tiempo prescrito; y
- (f) comparar el nivel de anomalía en el ADNmt entre la primera muestra de piel y las muestras de piel adquiridas en intervalos regulares para detectar cambios en la anomalía en el ADNmt, supervisando así la eficacia del tratamiento.
- 60 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que se obtuvieron las muestras de piel usando una técnica de toma de piel no invasiva o mínimamente invasiva.
- 65 9.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la técnica de toma de piel no invasiva o mínimamente invasiva comprende obtener una cantidad suficiente de la muestra para dar niveles ultrabajos de ADN, tales como aproximadamente 0,1 ng de ácido nucleico.

- 10.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dichos intervalos regulares son bisemanales o mensuales.
- 5 11.- Un procedimiento de cribado para un agente terapéutico o cosmeticéutico eficaz para el tratamiento del fotoenvejecimiento, daño por RUV o enfermedad de la piel, que comprende:
- 10 (a) someter a ensayo una primera muestra de piel de un sujeto para una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt), en el que la anomalía es una delección de 3895 pb en el ADNmt entre los nucleótidos 546 a 4444 del genoma del ADNmt;
- 15 (b) someter a ensayo una muestra de tejido del sujeto para una o más variantes del receptor de melanocortina 1 (MC1R), en el que las una o más variantes del MC1R se seleccionan del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M;
- 20 (c) determinar el estado de la piel y la predisposición genética del sujeto al daño por RUV basándose en la detección de la anomalía en el ADNmt en la primera muestra de piel y las una o más variantes del MC1R en la muestra de tejido;
- (d) someter a ensayo una segunda muestra de piel del sujeto para la anomalía en el ADNmt transcurrido un periodo de tiempo prescrito después del tratamiento con el agente terapéutico o cosmeticéutico; y
- 25 (e) comparar el nivel de anomalía en el ADNmt en la primera muestra de piel y la segunda muestra de piel frente a un control para determinar la eficacia del agente terapéutico o cosmeticéutico.
- 30 12.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que se obtuvieron la primera muestra de piel y la segunda muestra de piel usando una técnica de toma de piel no invasiva o mínimamente invasiva.
- 35 13.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 7 a 12, en el que la muestra de tejido para el ensayo del MC1R comprende una muestra de tejido epitelial, una muestra de tejido bucal, una muestra de tejido muscular o una muestra de tejido nervioso.
- 40 14.- Un kit de diagnóstico para determinar el estado de la piel y la predisposición genética de un sujeto al daño por RUV, que comprende:
- (a) material para tomar muestras de tejido; y
- (b) cebadores, sondas y reactivos adecuados para llevar a cabo el genotipado del receptor de melanocortina 1 (MC1R) y la detección de una anomalía en el ADN mitocondrial (ADNmt);
- en el que la anomalía en el ADNmt es una delección de 3895 pb en el ADNmt entre los nucleótidos 546 a4444 del genoma del ADNmt y en el que el genotipado del MC1R comprende someter a ensayo una o más variantes del MC1R seleccionadas del grupo que consiste en D84E, R142H, R151C, R160H, D294H, V60L y V92M.

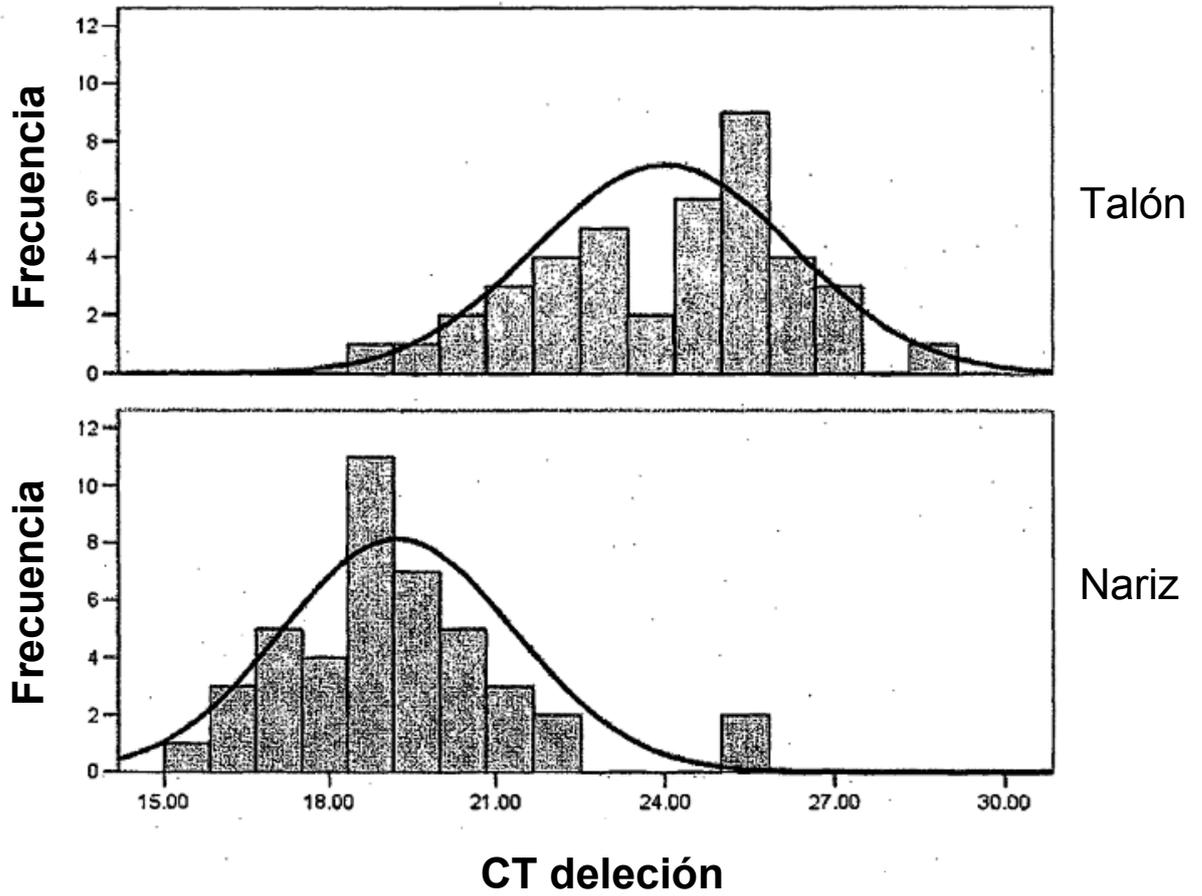


Fig. 1

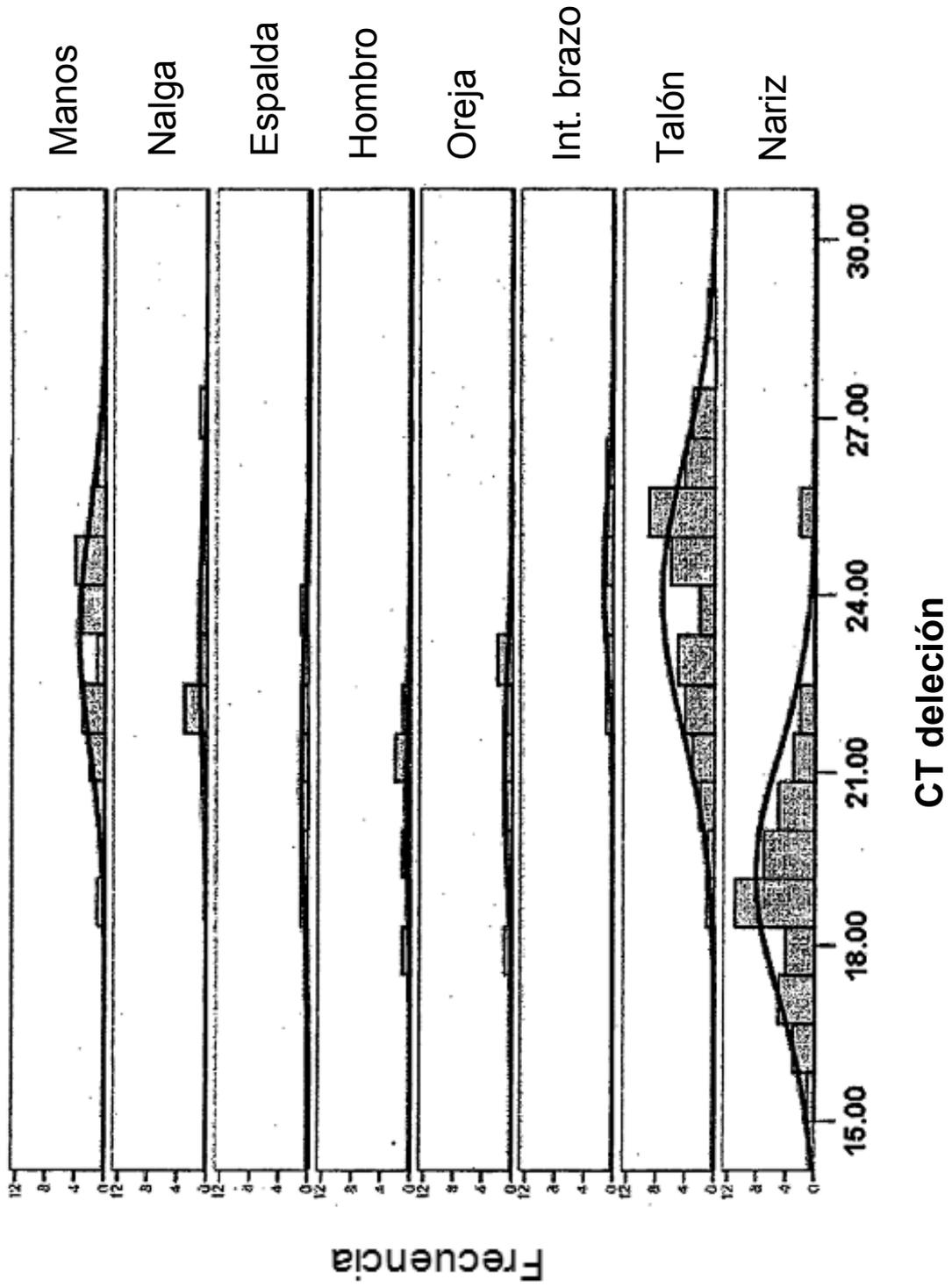
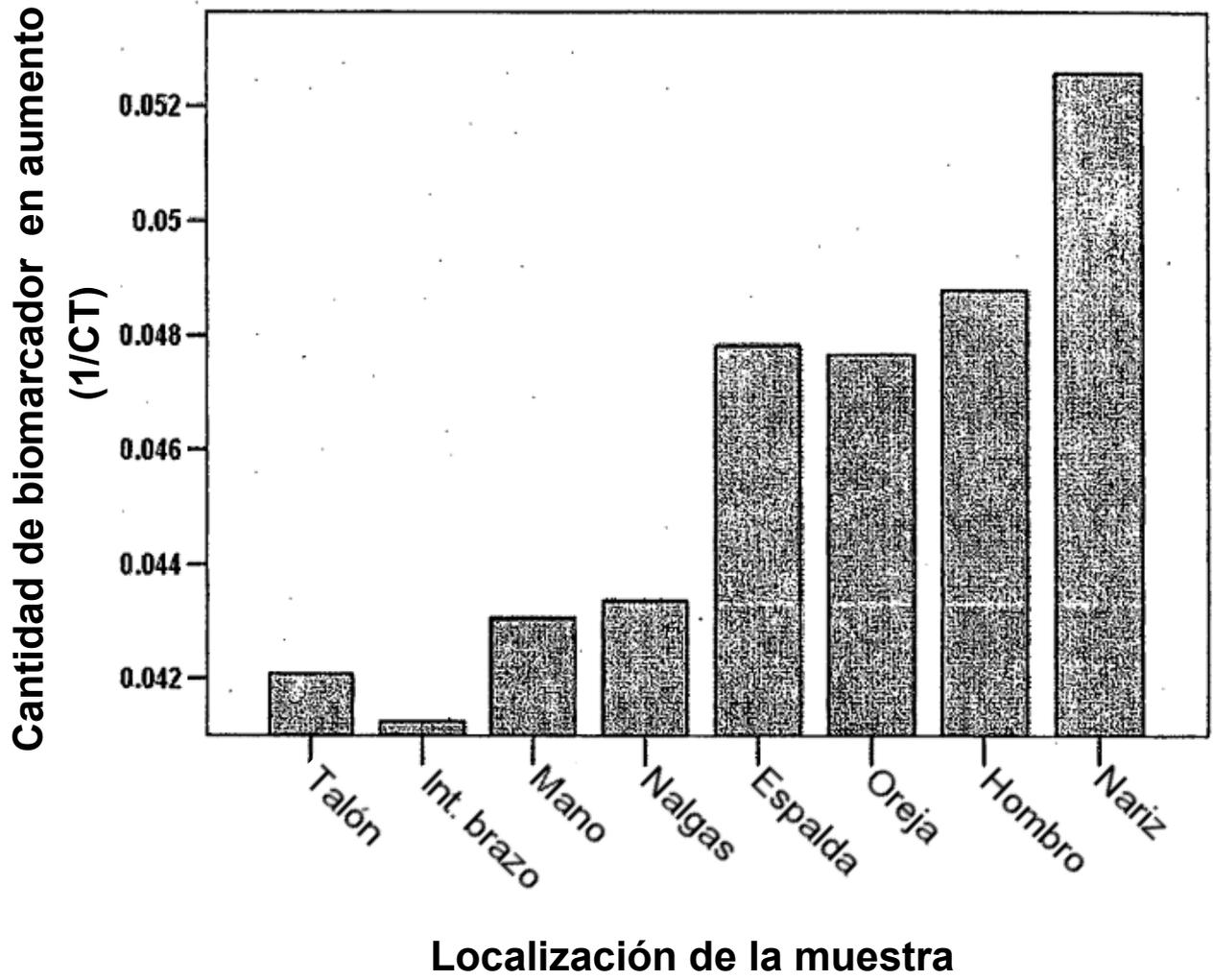
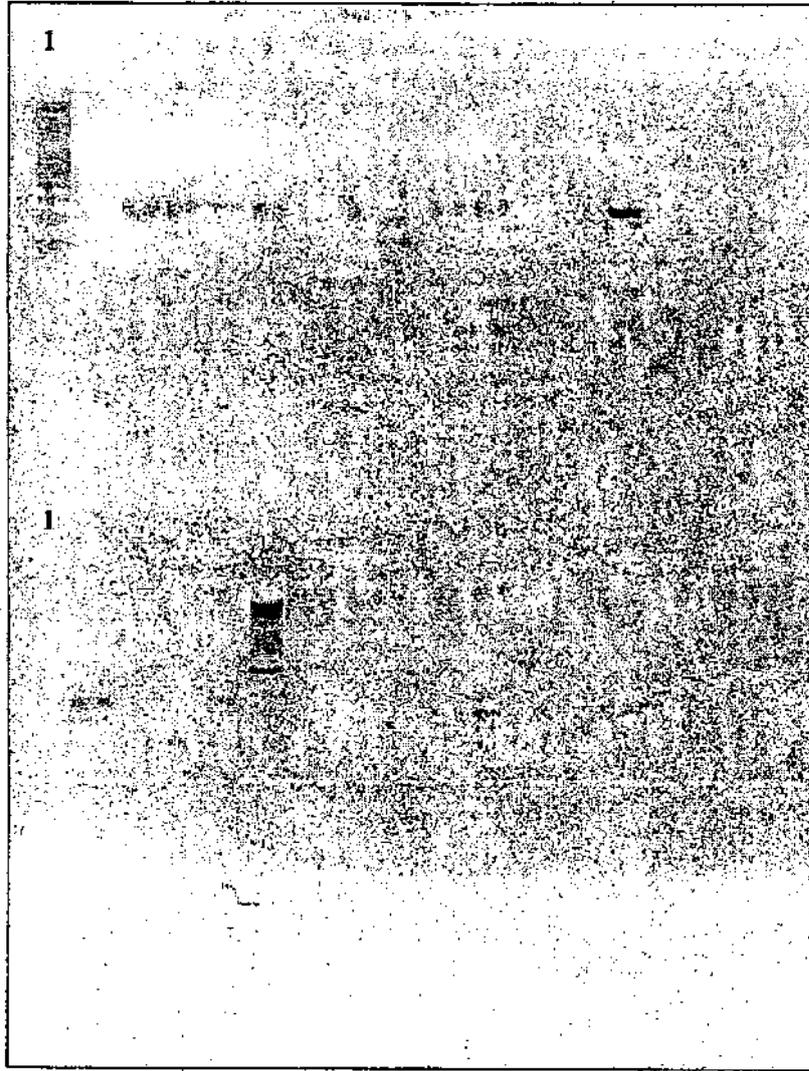


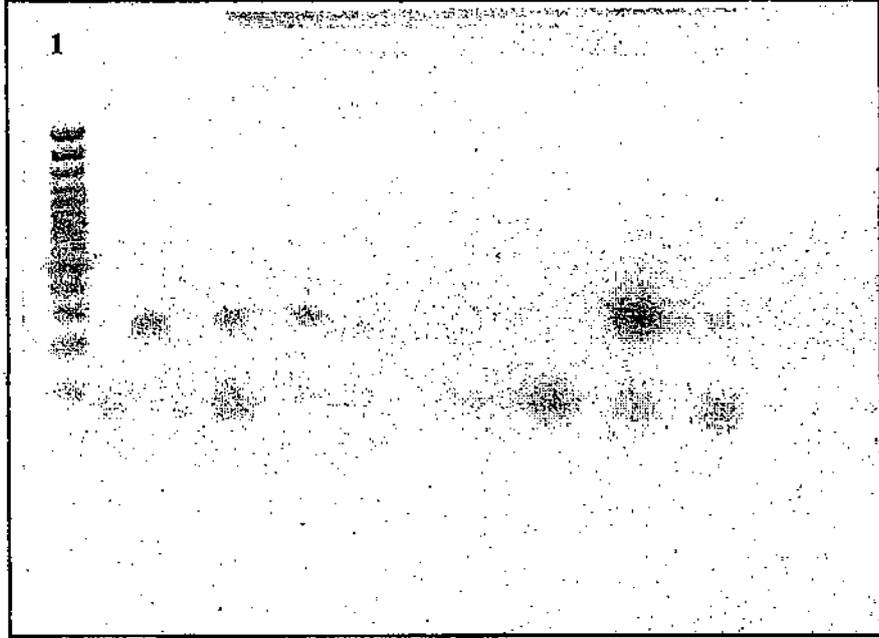
Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

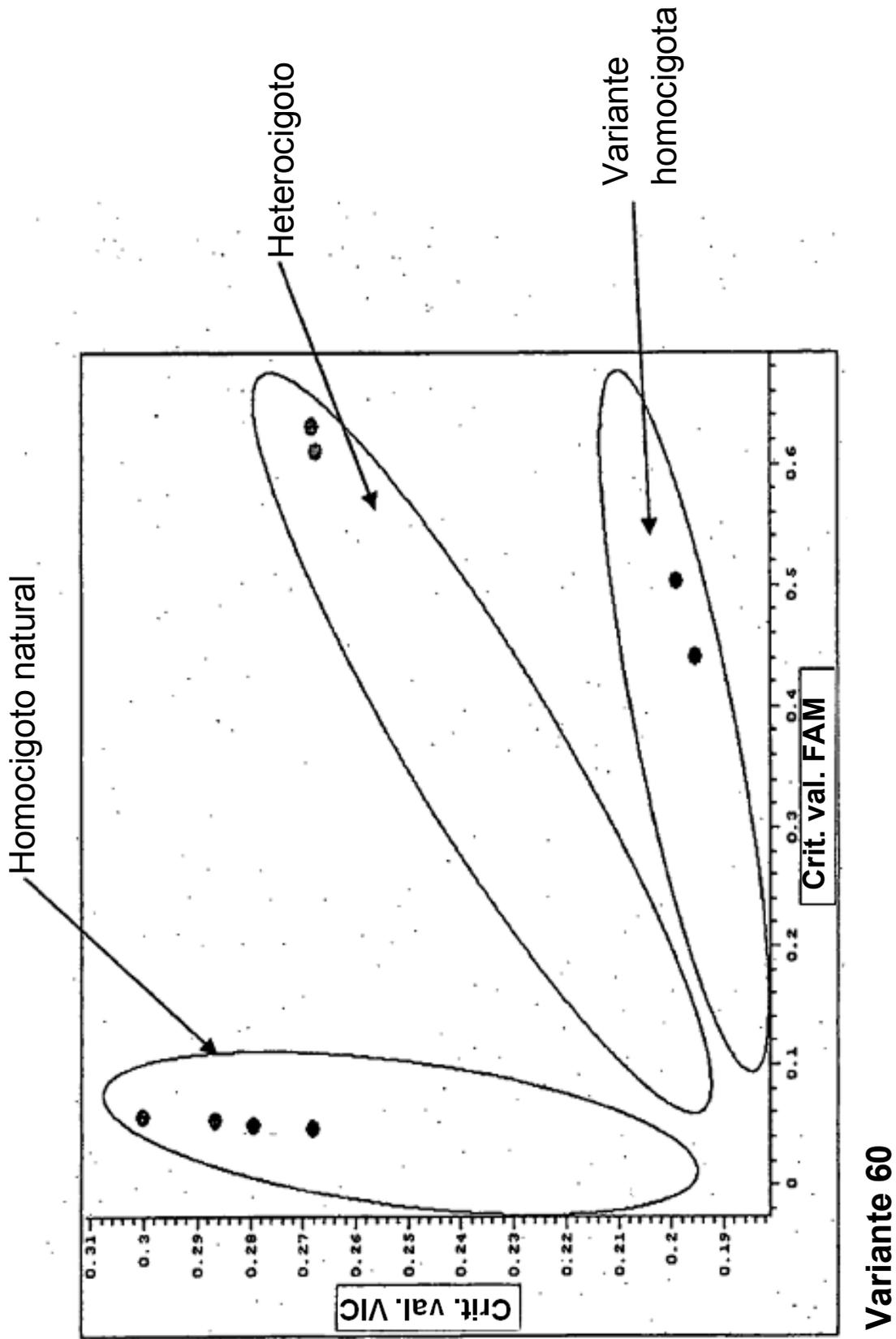


Fig. 6

Variante 60

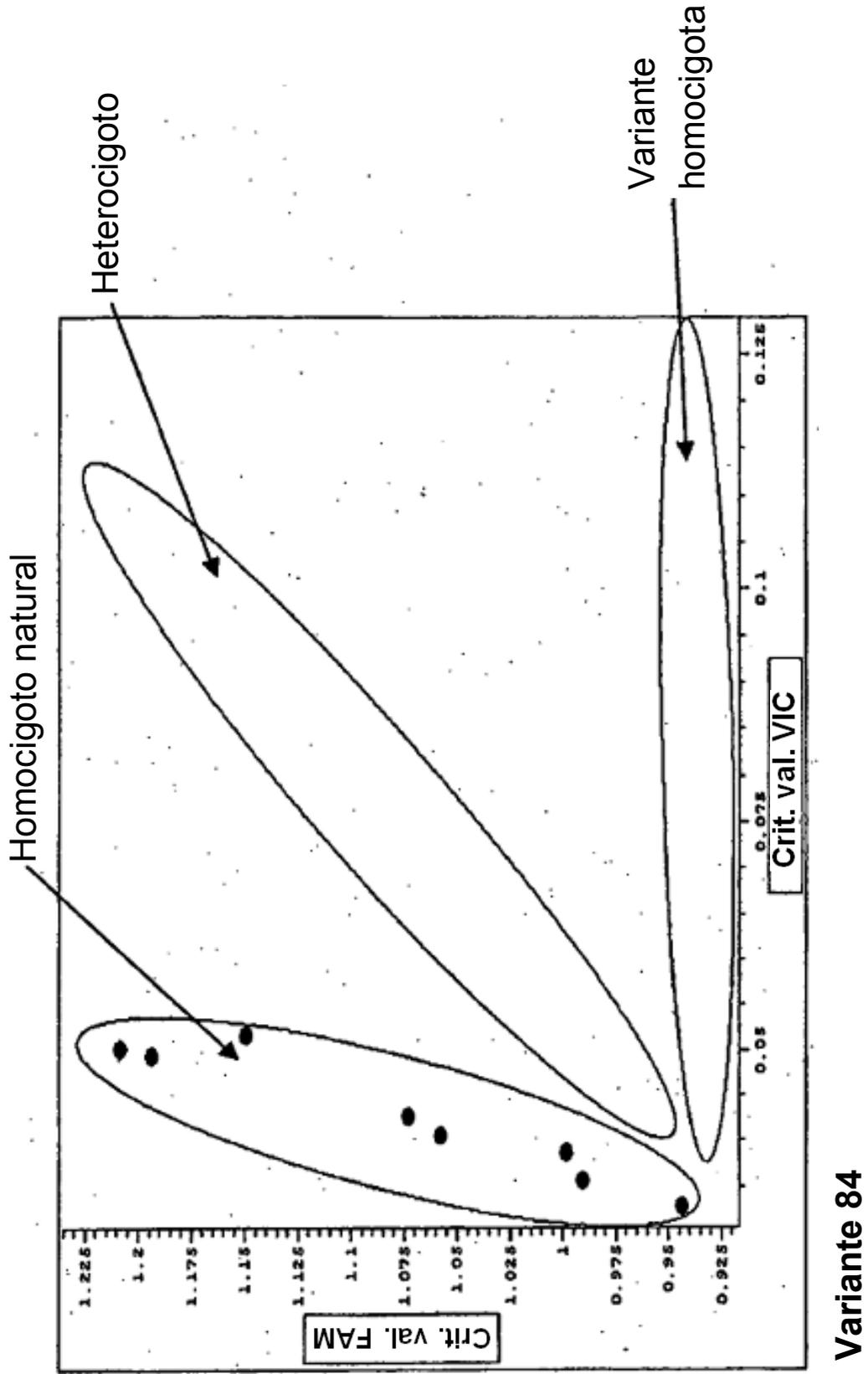


Fig. 7

Variante 84

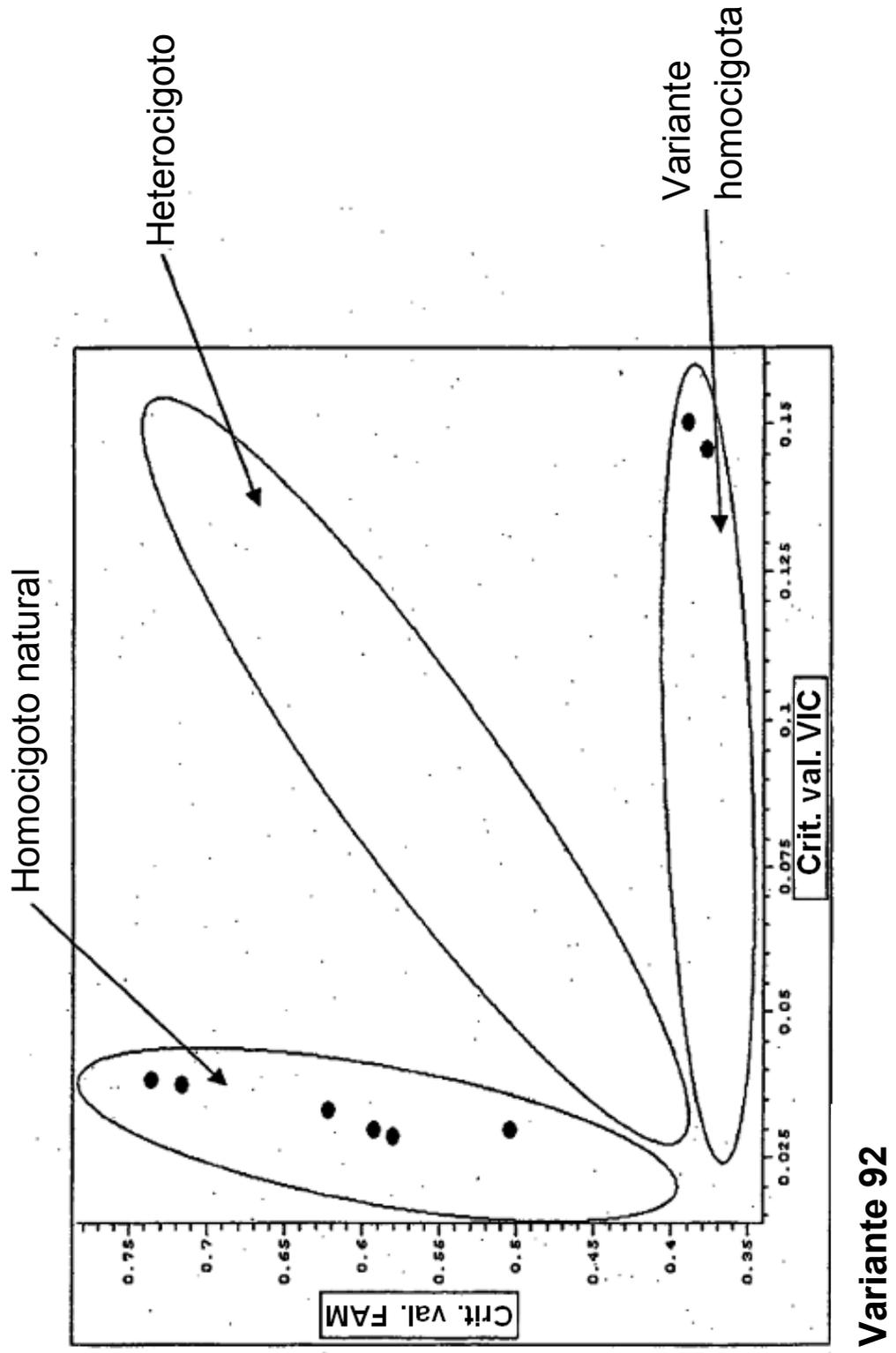
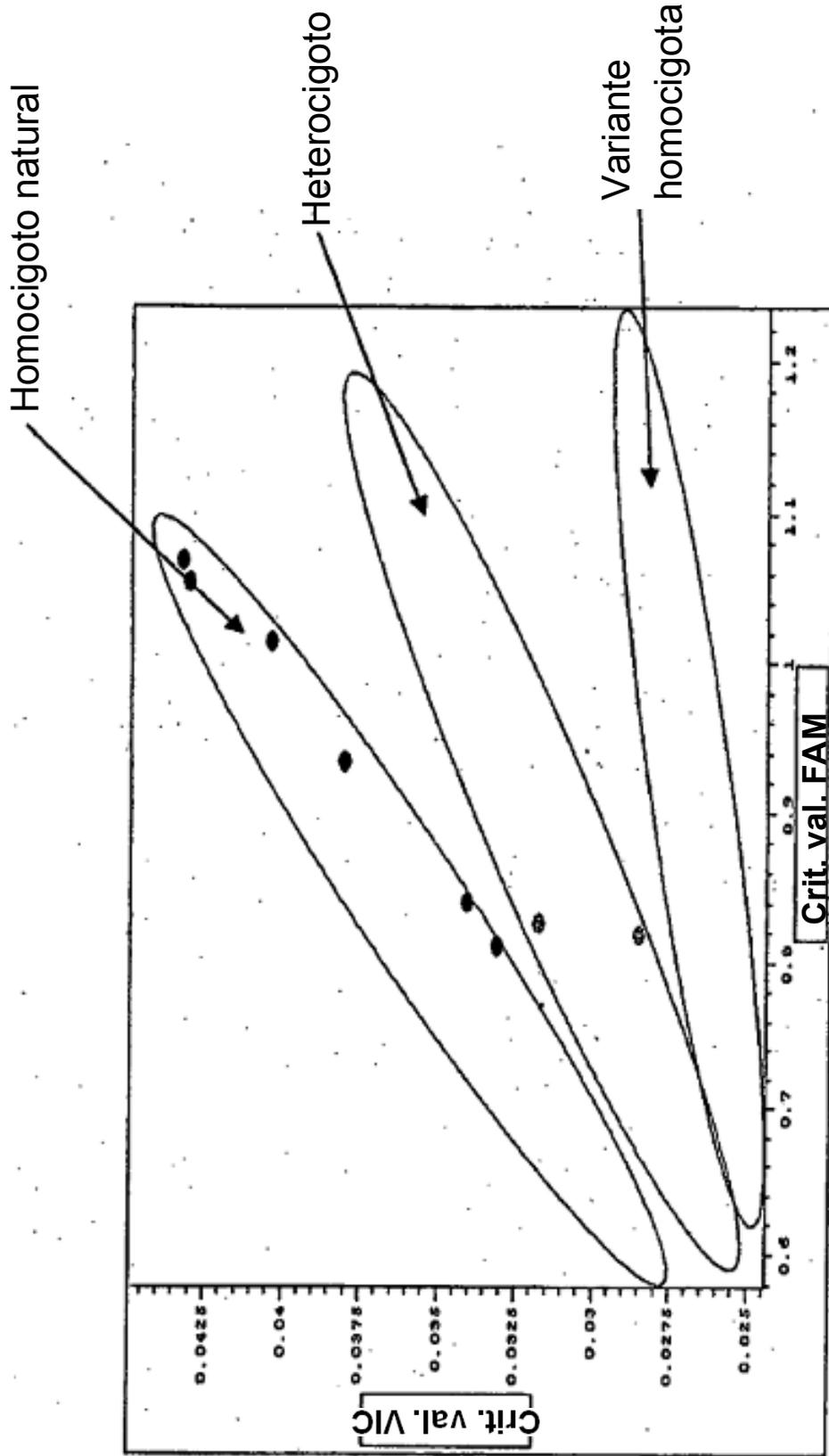
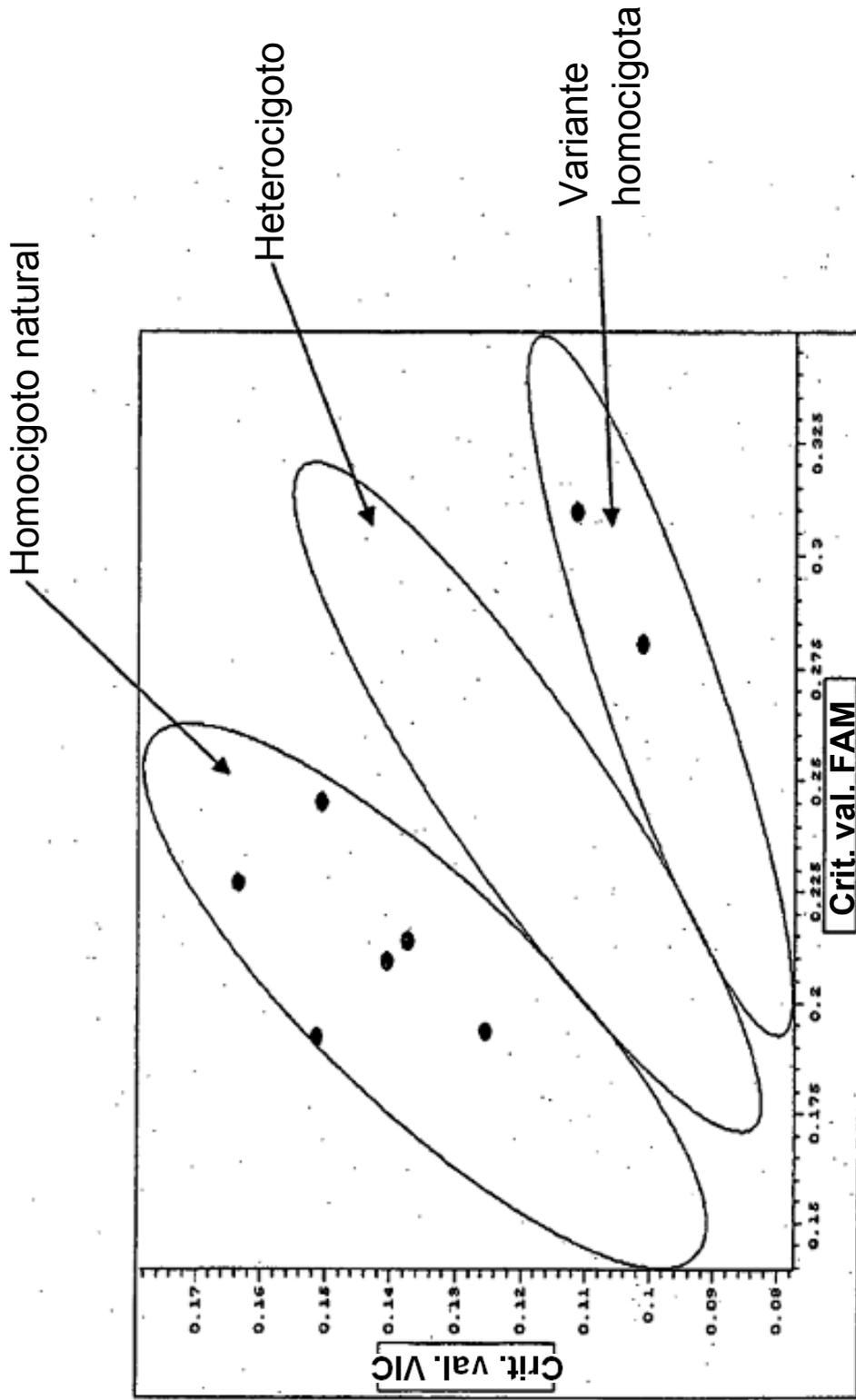


Fig. 8



Variante 142

Fig. 9



Variante 151

Fig. 10

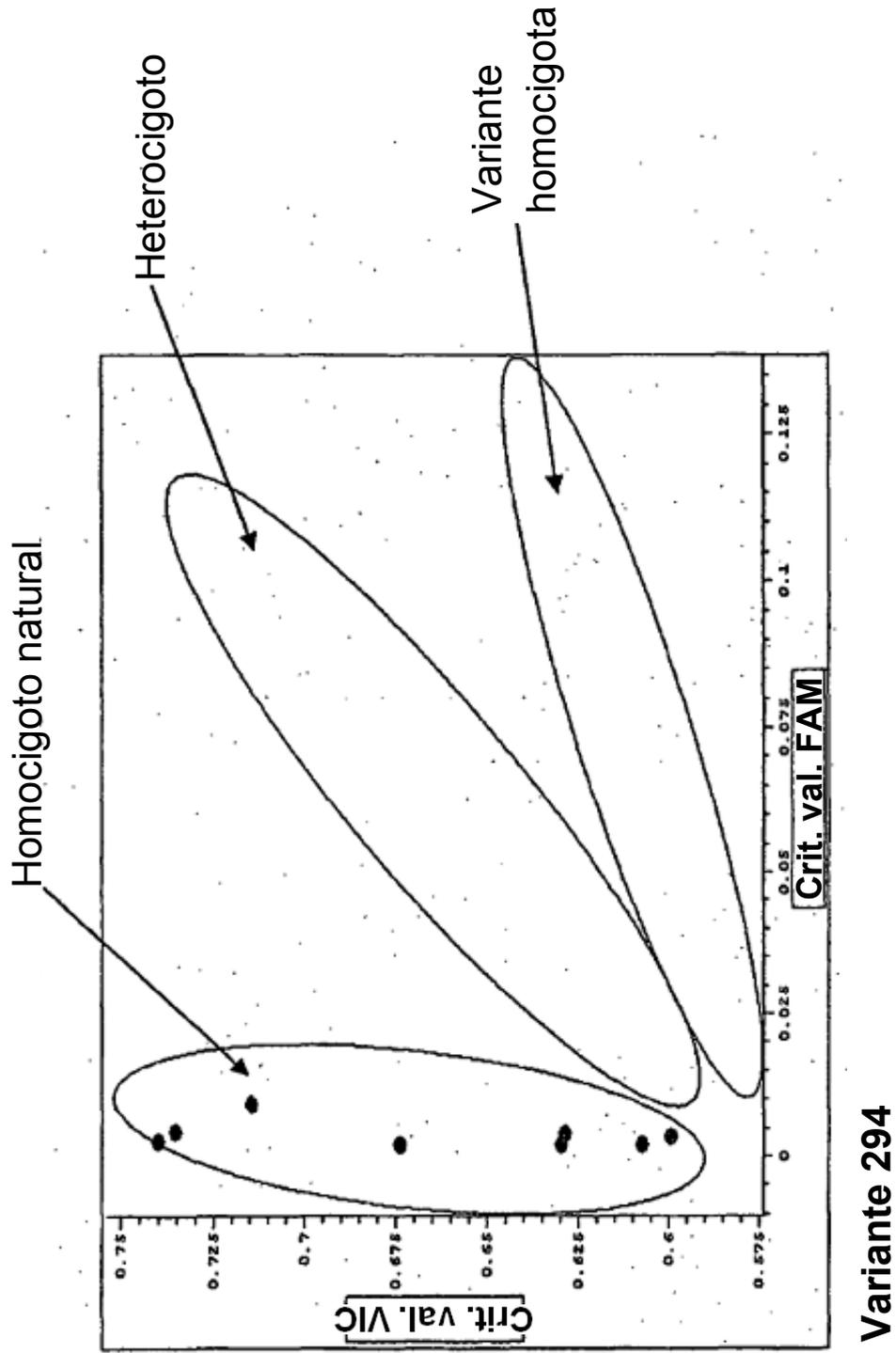
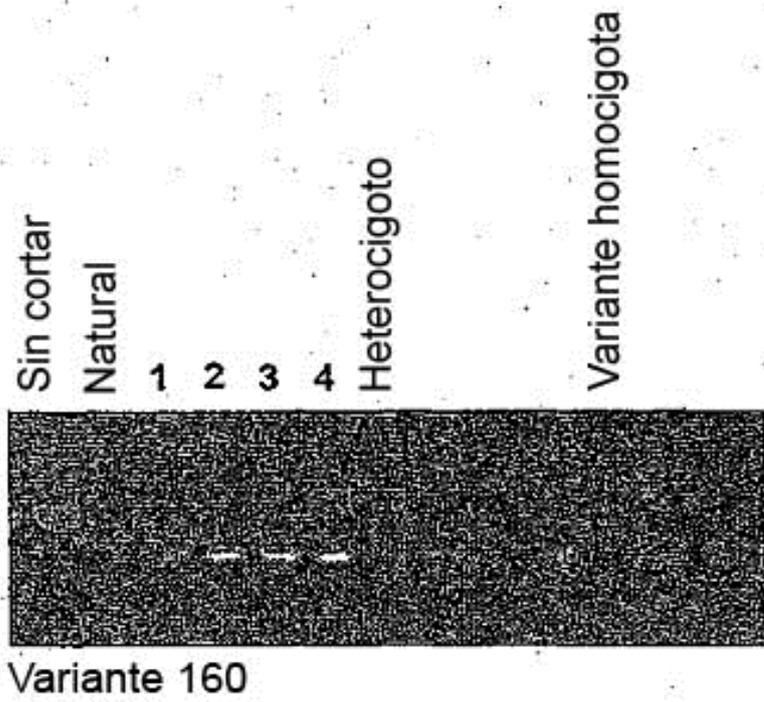
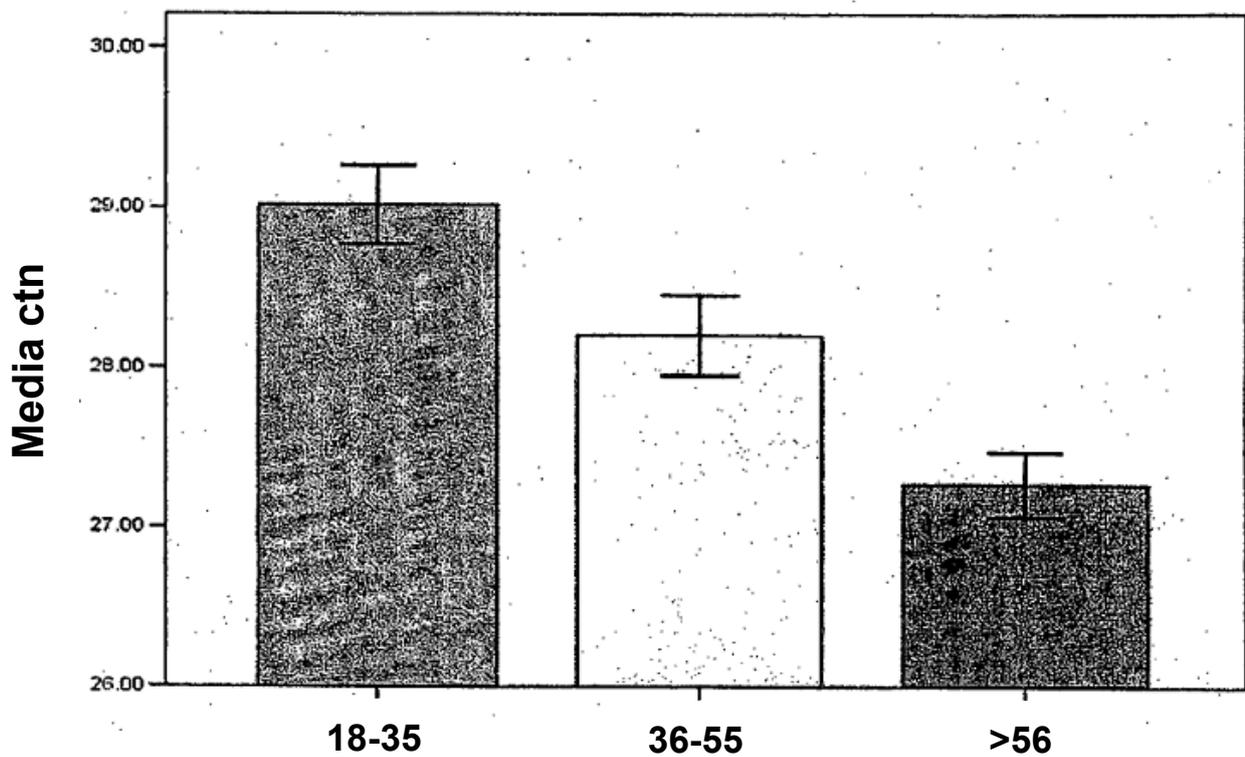


Fig. 11



**Fig. 12**



3 agrup. edades

barras de error: +/- 1,00 DE

**ANOVA**

ctn

	Suma de los cuadrados	df	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	125,556	2	62,778	13,633	0,000
Dentro de grupos	1165,060	253	4,605		
Total	1290,616	255			

**Fig. 13**