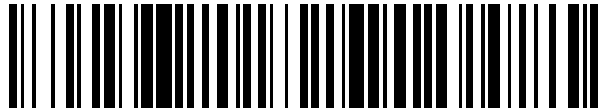


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 001**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007 E 13169334 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2634267**

54 Título: **Deleción de ADN mitocondrial de 3,4 kb para uso en la detección de cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.06.2015**

73 Titular/es:

**MITOMICS INC. (100.0%)  
PO Box 10069, 1005 Alloy Drive  
Thunder Bay, ON P7B 6T6, CA**

72 Inventor/es:

**PARR, RYAN;  
THAYER, ROBERT;  
DAKUBO, GABRIEL D.;  
CREED, JENNIFER;  
ROBINSON, KERRY;  
MAGGRAH, ANDREA y  
REGULY, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**CAPITAN GARCÍA, Nuria**

**ES 2 539 001 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

Deleción de ADN mitocondrial de 3,4 kb para uso en la detección de cáncer

5 **Objeto de la Invención**

Esta invención está relacionada con el campo de la genómica mitocondrial. En particular, está relacionada con una deleción de 3,4 kb en el genoma mitocondrial y su utilidad como indicador de cáncer.

10 **Antecedentes de la Invención**

*ADN mitocondrial (ADNmt) como herramienta de diagnóstico*

15 Las dinámicas de secuencia de ADNmt son herramientas de diagnóstico importantes. Las mutaciones en el ADNmt son a menudo indicadores preliminares de enfermedades en desarrollo, asociadas a menudo a mutaciones nucleares, y actúan como biomarcadores relacionados específicamente con: enfermedades tales como, pero sin limitación, daño de tejido y cáncer por tabaquismo y exposición pasiva a humo de tabaco (Lee *et al.*, 1998; Wei, 1998); longevidad, basada en la acumulación de mutaciones genómicas mitocondriales que empiezan aproximadamente a los 20 años de edad y aumentan después de ello (von Wurmb, 1998); enfermedad metastásica causada por mutación o exposición a carcinógenos, mutágenos o radiación ultravioleta (Birch-Machin, 2000); artrosis; enfermedad cardiovascular, de Alzheimer y de Parkinson (Shoffner *et al.*, 1993; Sherratt *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998); pérdida de audición asociada a la edad (Seidman *et al.*, 1997); degeneración del nervio óptico y disritmia cardiaca (Brown *et al.*, 1997; Wallace *et al.*, 1988); exoftalmoplejia externa progresiva crónica (Taniike *et al.*, 1992); aterosclerosis (Bogliolo *et al.*, 1999); carcinomas tiroideos papilares y tumores tiroideos (Yeh *et al.*, 2000); así como otros (p.ej. Naviaux, 1997; Chinnery y Turnbull, 1999).

Las mutaciones en sitios específicos del genoma mitocondrial pueden estar asociadas a ciertas enfermedades. Por ejemplo, las mutaciones en las posiciones 4216, 4217 y 4917 están asociadas a la neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) ("Mitochondrial Research Society"; Huoponen (2001); MitoMap). Se encontró en 5/5 30 pacientes que una mutación en 15452 estaba asociada a deficiencia de ubiquinol citocromo c reductasa (complejo III) (Valnot *et al.* 1999).

Específicamente, estas mutaciones o alteraciones incluyen mutaciones puntuales (transiciones, transversiones), 35 deleciones (de una base a miles de bases), inversiones, duplicaciones (de una base a miles de bases), recombinaciones e inserciones (de una base a miles de bases). Además, se ha encontrado que alteraciones o deleciones de pares de bases específicos o combinaciones de las mismas, están asociadas al inicio temprano de cáncer de próstata, piel y pulmón, así como al envejecimiento (p.ej. Polyak *et al.*, 1998), al envejecimiento prematuro, exposición a carcinógenos (Lee *et al.*, 1998), etc.

40 **Cáncer de próstata**

El cáncer de próstata es un tumor sólido diagnosticado frecuentemente que se origina lo más probablemente en el epitelio prostático (Huang *et al.* 1999). En 1997, se cribó en casi 10 millones de hombres estadounidenses el antígeno específico de próstata (PSA), cuya presencia sugiere cáncer de próstata (Woodwell, 1999). Es más, 45 esto indica un número aún mayor de hombres cribados mediante un examen rectal digital (ERD) inicial. El mismo año, 31 millones de hombres tuvieron un ERD (Woodwell, 1999). Además, el número anual de nuevos casos diagnosticados de cáncer de próstata en los Estados Unidos se estima en 179.000 (Landis *et al.*, 1999). Es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado y la segunda causa principal de mortalidad por cáncer en los hombres canadienses. En 1997, el cáncer de próstata dio cuenta de 19.800 nuevos cánceres diagnosticados en 50 hombres canadienses (28 %) (National Cancer Institute of Canada). Se estima que de un 30 a un 40 % de todos los hombres de más de cuarenta y nueve (49) años tienen algunas células de próstata cancerosas, aunque solo de un 20 a un 25 % de estos hombres tienen una forma clínicamente significativa de cáncer de próstata (SpringNet - CE Connection, internet, www.springnet.com/ce/j803a.htm). El cáncer de próstata exhibe una amplia 55 variedad de comportamientos histológicos que implican factores tanto endógenos como exógenos, concretamente situaciones socioeconómicas, dieta, geografía, desequilibrio hormonal, historial familiar y constitución genética (Konishi *et al.* 1997; Hayward *et al.* 1998). Aunque ciertas alteraciones del ADNmt se han asociado anteriormente al cáncer de próstata, existe la necesidad de marcadores adicionales para la detección de cáncer de próstata.

60 **Deleción de ADNmt de 3,4 kb y la detección de cáncer de próstata**

En la solicitud PCT pendiente de la solicitante que ostenta el nº de publicación WO/06/111029 (cuyos contenidos completos se incorporan a la presente como referencia), se identificó una deleción de un segmento de 3379 pb de ADNmt mediante amplificación del genoma mitocondrial completo de tejido de próstata. Se determinó que la 65 deleción de 3379 pb (a la que se hace referencia como deleción de 3,4 kb) estaba localizada entre los

nucleótidos 10744-14124 del genoma mitocondrial. Se determinó que podía usarse la detección de esta delección en el diagnóstico de cáncer de próstata cuando se ensayan muestras de tejido.

- 5 La delección de 3,4 kb retira todos o parte de los siguientes genes del genoma de ADNmt: (i) la subunidad 4L de NADH deshidrogenasa, (ii) la subunidad 4 de NADH deshidrogenasa, (iii) la subunidad 5 de NADH deshidrogenasa, (iv) histidina de ARNt, (v) serina2 de ARNt y (vi) leucina2 de ARNt.

#### Cáncer de mama

- 10 El cáncer de mama es un cáncer del tejido glandular de mama y es la quinta causa más común de muerte por cáncer. En 2005, el cáncer de mama causó 502.000 muertes (7 % de las muertes por cáncer; casi 1 % de todas las muertes) en todo el mundo (Nota descriptiva nº 297 de la Organización Mundial de la Salud). Entre las mujeres de todo el mundo, el cáncer de mama es el cáncer más común y la causa más común de muerte por
- 15 cáncer (nota descriptiva nº 297 de la Organización Mundial de la Salud). Aunque ciertas alteraciones del ADNmt se han asociado anteriormente a cáncer de mama, por ejemplo en Parrella *et al.* (*Cancer Research*: 61, 2001), existe la necesidad de marcadores adicionales para la detección de cáncer de mama.

#### Descripción de la Invención

- 20 La invención es un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende:
- a) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de una muestra biológica del individuo;
  - b) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una secuencia correspondiente a la secuencia identificada en la SEQ ID NO:1 usando un par de cebadores de amplificación, en el que uno del par de
  - 25 cebadores de amplificación usados en la amplificación de la región diana se superpone con un sitio de reinserción de la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, después de recircularizar la secuencia;
  - c) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra correspondiente a la SEQ ID NO: 1 recircularizada con al menos un valor de referencia conocido.

30 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende:

- a) obtener una muestra biológica del individuo;
- b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
- c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección en la secuencia de ácido nucleico que se extiende aproximadamente de los residuos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt;
- 35 d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con al menos un valor de referencia conocido.

40 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende:

- a) obtener una muestra biológica del individuo;
  - b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
  - c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección en la secuencia de ácido nucleico que se extiende aproximadamente de los residuos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt;
  - 45 d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de delección en una muestra de referencia de ADNmt de un tejido o fluido corporal no canceroso conocido;
- en el que una cantidad elevada de la delección en la muestra biológica, en comparación con la muestra de referencia, es indicativa de cáncer.

50 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende:

- a) obtener una muestra biológica del individuo;
  - b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
  - c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección en la secuencia de ácido nucleico que se extiende aproximadamente de los residuos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt;
  - 55 d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido;
- en el que un nivel similar de delección en la muestra biológica, en comparación con la muestra de referencia, es indicativo de cáncer.

60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de monitorización en un individuo del desarrollo de un cáncer que comprende:

- a) obtener una muestra biológica;
- b) extraer ADNmt de la muestra;
- c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección en la secuencia de ácido nucleico que se extiende aproximadamente de los residuos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt;
- 65 d) repetir las etapas a) a c) durante un periodo de tiempo;

en el que un nivel creciente de delección durante el periodo de tiempo es indicativo de cáncer.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende:

- 5 a) obtener una muestra biológica del individuo;
- b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
- c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una secuencia correspondiente a la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1;
- 10 d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra correspondiente a la SEQ ID NO: 1 con al menos un valor de referencia conocido.

### Descripción de las Figuras

15 Se complementa la presente memoria descriptiva, con un juego de figuras, ilustrativas del ejemplo preferente y nunca limitativo de la invención.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el diseño y secuencia de un cebador útil para la detección de la delección de 3,4 kb.

20 La Figura 2 es una gráfica que muestra la comparación del umbral de ciclo entre participantes malignos y benignos sintomáticos en el estudio de 3,4 kb.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el umbral de ciclo como se refiere en el ejemplo 1.

25 La Figura 4 muestra una curva COR que ilustra la especificidad y sensibilidad de una realización de la presente invención.

La Figura 5 muestra una curva COR que ilustra la especificidad y sensibilidad de una realización de la presente invención.

30 La Figura 6 muestra los datos de PCR en tiempo real referentes a los niveles de delección de ADNmt de 3,4 kb asociados a cáncer de mama.

35 La Figura 7 muestra una curva COR que ilustra la especificidad y sensibilidad de otra realización de la presente invención.

### Exposición Detallada de la Invención

40 Como se usa en la presente memoria, "umbral de ciclo" ( $C_T$ ) es el punto en que la amplificación de diana usando PCR en tiempo real se eleva por encima del fondo, como se indica por una señal tal como una señal de fluorescencia. El  $C_T$  está inversamente relacionado con la cantidad de secuencia que se está investigando.

45 Como se define en la presente memoria, "sensibilidad" hace referencia a la fracción de resultados verdaderos positivos (índice de verdaderos positivos) obtenidos usando el procedimiento de la presente invención.

Como se define en la presente memoria, "especificidad" hace referencia a la fracción de resultados falsos positivos (índice de falsos positivos) obtenidos usando el procedimiento de la presente invención.

50 En una realización de la presente invención, se proporcionan procedimientos para monitorizar y diagnosticar cáncer mediante la detección y cuantificación de la delección de ADNmt de 3,4 kb anteriormente mencionada. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para detectar la presencia de preneoplasia, neoplasia y progresión hacia la malignidad potencial de cáncer de próstata y cáncer de mama. En un aspecto, la presente invención implica la detección y cuantificación de la delección de ADNmt de 3,4 kb (SEQ ID NO:1) para la detección, diagnóstico y/o monitorización de cáncer. En este procedimiento, se extrae ADNmt de una muestra biológica (por ejemplo, tejido corporal o fluidos corporales tales como orina o fluido de masaje prostático). Se ensaya entonces el ADNmt para determinar los niveles (concretamente la cantidad) de delección de 3,4 kb en la muestra. En pruebas realizadas por los presentes inventores, se encontró que los niveles de delección eran elevados en muestras obtenidas de sujetos con cáncer cuando se comparaban con muestras obtenidas de sujetos sin cáncer. Basándose en la información y datos suministrados a continuación, los inventores han concluido que niveles elevados de delección de 3,4 kb en el ADNmt son indicativos de cáncer.

60 Como se da a conocer en el documento PCT WO/06/111029, la delección de 3,4 kb se extiende aproximadamente de los nucleótidos 10744 a 14124 del genoma de ADNmt. El genoma de ADNmt se enumera como SEQ ID NO:8 (nº de acceso a Genbank AC\_000021). Los inventores han determinado, como se proporciona por el ejemplo siguiente, que esta delección está también asociada a cáncer y en particular cáncer de

próstata y cáncer de mama. Por lo tanto, dicha deleción proporciona un biomarcador exacto y, por lo tanto, una herramienta valiosa para la detección, diagnóstico o monitorización de cáncer al menos en estos tejidos.

5 La deleción da como resultado la creación de dos monómeros de deleción, uno de 3,4 kb de tamaño (sublímón pequeño) y otro de aproximadamente 12,6 kb de tamaño (sublímón grande). La aparición de la deleción puede detectarse identificando la presencia del sublímón pequeño o determinando que la secuencia de 3,4 kb se ha eliminado del sublímón grande.

10 Como se da a conocer anteriormente, la deleción es de aproximadamente 3379 pb y comprende genes que codifican la subunidad 4L de NADH deshidrogenasa, la subunidad 4 de NADH deshidrogenasa, la subunidad 5 de NADH deshidrogenasa, histidina de ARNt, serina2 de ARNt y leucina2 de ARNt.

15 En una realización, se obtienen muestras de, por ejemplo, tejido de próstata, fluido de masaje prostático, orina o tejido de mama de un individuo y se ensayan durante un periodo de tiempo (p.ej. años) para monitorizar el origen o progresión de cáncer. Niveles crecientes de deleción de 3,4 kb con el tiempo podrían ser indicativos del inicio o progresión de cáncer.

20 La acumulación relacionada con la edad de deleción de ADNmt de 3,4 kb puede predisponer a un individuo, por ejemplo, a cáncer de próstata o cáncer de mama, que es prevalente en hombres de mediana edad y ancianos y en mujeres de mediana edad y ancianas, respectivamente. Según un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento en el que puede tener lugar el cribado regular de cáncer monitorizando con el tiempo la cantidad de deleción de 3,4 kb en tejidos corporales tales como tejido de mama o fluidos corporales tales como fluido de masaje prostático u orina.

25 El sistema y procedimiento de la presente invención pueden usarse para detectar cáncer en una etapa temprana, y antes de cualquier anomalía histológica. Por ejemplo, el sistema y procedimiento de la presente invención pueden usarse para detectar preneoplasia en tejido de mama.

30 Se prefieren las siguientes secuencias cebadoras para la detección de la deleción de 3,4 kb:  
3.4 de codificación (se une a las bases 10729-10744/14124-14139 del genoma de ADNmt) 5'-TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA- 3' (SEQ ID NO: 2);

35 3.4 inversa (se une a las bases 14361-14379 del genoma de ADNmt) 5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3' (SEQ ID NO: 3).

40 En un aspecto de la presente divulgación, se usan un par de cebadores de amplificación para amplificar una región diana indicativa de la presencia de la deleción de 3,4 kb. En esta realización, uno del par de cebadores de amplificación se superpone con una región cortada y empalmada de ADNmt después de ocurrir la deleción de la secuencia de 3,4 kb (concretamente, un corte y empalme en una posición de la secuencia que se extiende de aproximadamente 10744 a 14124 del genoma de ADNmt). Por lo tanto, la extensión del cebador superpuesto puede ocurrir solo si se elimina la sección de 3,4 kb.

45 En otra realización de la presente invención, se usan un par de cebadores de amplificación para amplificar una región diana asociada a la secuencia de 3,4 kb eliminada. La secuencia de 3,4 kb eliminada, después de la deleción, puede reconformarse como una molécula de ADNmt circular. En esta realización, uno del par de cebadores de amplificación se superpone con el sitio de inserción de los extremos de la secuencia de 3,4 kb. Por tanto, un aumento en la cantidad de la molécula de 3,4 kb detectada en una muestra es indicativo de cáncer. Se prefiere el par cebador siguiente para la detección del ácido nucleico de 3,4 kb eliminado.

50 De codificación 14115/10755 5'-CCCACTCATCACCTAACCTAC-3' (SEQ ID NO: 9)

Inverso 10980R 5'-GGTAGGAGTCAGGTAGTTAG-3' (SEQ ID NO: 10).

55 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un kit para diagnosticar cáncer, por ejemplo cáncer de próstata o mama, que comprende medios para la extracción de ADNmt, cebadores que tienen las secuencias de ácido nucleico indicadas en las SEQ ID NO: 2 y 3, o SEQ ID NOS: 9 y 10, reactivos e instrucciones.

60 Otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para confirmar o refutar la presencia de una prueba de biopsia de cáncer de una muestra de biopsia (p.ej. cáncer de próstata o mama) que comprenden: obtener tejido no canceroso de una muestra de biopsia y detectar y cuantificar la cantidad de deleción de ADNmt de 3,4 kb en el tejido no enfermo.

65 En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para cribar en individuos cáncer de próstata o mama a partir de una muestra de fluido corporal que comprende: obtener una muestra de fluido corporal y detectar y cuantificar el nivel de deleción de ADNmt de 3,4 kb en el fluido corporal.

Aunque los procedimientos de PCR cuantitativa en tiempo real, como se describen en los ejemplos siguientes, representan el medio preferido para detectar y cuantificar la presencia o ausencia de la delección de 3,4 kb, podrían utilizarse también otros procedimientos que sean bien conocidos por un individuo especialista en la materia. Por ejemplo, la cuantificación de la delección podría hacerse usando el sistema Bio-Rad's Bioplex™ y la tecnología de matriz en suspensión. Generalmente, el procedimiento requiere la amplificación y cuantificación de secuencias usando cualquier procedimiento conocido.

Los ejemplos proporcionados a continuación ilustran que esta delección no solo puede usarse para la detección de cáncer de próstata en tejido de próstata, sino que puede usarse también para detectar la presencia de cáncer en otras muestras biológicas, por ejemplo fluido de masaje prostático, orina y tejido de mama. Basándose en los hallazgos de estos ejemplos, la delección de ADNmt de 3,4 kb puede usarse como biomarcador para cáncer.

Los diversos ejemplos proporcionados ilustran la diferencia en la cantidad de ADNmt que tiene la delección de 3,4 kb entre muestras obtenidas de sujetos que tienen cáncer y sujetos sin cáncer. Se encontró que la cantidad de delección de 3,4 kb era mayor en las muestras obtenidas de sujetos con cáncer. Esta determinación se realizó comparando la cantidad de delección de 3,4 kb en las muestras de prueba con las cantidades de células cancerosas conocidas y/o células no cancerosas conocidas.

### **Ejemplo 1: Delección de 3,4 kb en el ADNmt de tejido de próstata**

Se identificó una delección de aproximadamente 3,4 kilobases (kb) mediante la amplificación de genoma mitocondrial completo de tejido de próstata recién congelado. Usando regresión lineal, se estimó que el tamaño de la delección estaba entre 3000 pares de bases (pb) y 3500 pb. Se identificaron dos posibles candidatos a delecciones usando Mitomap™ (Brandon, M. C., Lott, M. T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Navathe, S. B., Baldi, P. y Wallace, D. C., "MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update". Nucleic Acids Research 33 (Número de bases de datos): D611-613, 2005; www.mitomap.org), la delección de 3397 pb en 9574-12972 y la delección de 3379 pb en 10744-14124. Para determinar cuál de las dos delecciones estaba asociada a cáncer de próstata, si acaso, se desarrolló un cebador de codificación que abarcaba la conexión de delección para cada uno de los dos candidatos, asegurando que el cebador se extendía más que las regiones repetidas que flanquean las delecciones. La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el diseño y secuencia del cebador (concretamente, SEQ ID NO: 2). Se obtuvieron resultados de amplificación positivos del amplicón correspondiente a la delección de 3379 pb (a la que se hace referencia como delección de 3,4 kb) en 10744-14124.

Como se indica anteriormente, la delección de 3,4 kb retira todos o parte de los siguientes genes: (i) la subunidad 4L de NADH deshidrogenasa, (ii) la subunidad 4 de NADH deshidrogenasa, (iii) la subunidad 5 de NADH deshidrogenasa, (iv) histidina de ARNt, (v) serina2 de ARNt y (vi) leucina2 de ARNt.

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

Los presentes investigadores secuenciaron los genomas mitocondriales enteros de 32 muestras de tejido microdisecionadas por microdissección de captura láser y 12 biopsias con aguja de próstatas histológicamente normales. Se usaron secciones de tejido archivadas de cada una de estas muestras para el siguiente estudio. Se retiraron 1-2 secciones en serie de cada muestra. Se extrajo ADN de cada muestra en su totalidad en lugar de como microdissección. Por tanto, cada muestra consistía en una mezcla de tejido glandular de próstata así como tejido estromal de próstata. Se efectuó esta extracción usando el kit QIAamp™ DNA Mini de Qiagen (nº de cat. 51304). Después de la extracción, se cuantificaron las muestras usando un espectrofotómetro Nano-Drop™ y se normalizaron posteriormente las concentraciones a 2 ng/µl. Se amplificó cada muestra usando 20 ng de ADN de entrada y un kit iQ™ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad Laboratories Inc.). Se procesaron las reacciones en un sistema de PCR en tiempo real en dos colores Opticon® 2 (MJ Research).

Como se muestra en la Figura 2, se observó una diferencia marcada en el umbral de ciclo y, por extensión, en la cantidad de delección entre las muestras de próstata malignas y las muestras de próstata benignas sintomáticas. Las muestras malignas exhibían un umbral de ciclo consistentemente más temprano que las muestras benignas.

### **Ejemplo 2: Estudio con anonimato de la delección de 3,4 kb- Comparación del umbral de ciclo**

Se seleccionaron 21 muestras de tejido de próstata adicionales, 10 de las cuales eran benignas y 11 de las cuales eran malignas. Se determinó el estado patológico mediante biopsias con aguja realizadas por un patólogo cualificado. Las muestras se anonimizaron de tal modo que los presentes investigadores no conocieran su estado patológico cuando realizaron esta prueba. Los presentes investigadores fueron capaces de predecir el estado patológico correctamente en un 81 % de los casos al examinar el umbral de ciclo. De los 4 casos incorrectos, dos eran muestras malignas que se determinó que eran benignas y 2 eran muestras benignas que se determinó que eran malignas. Se requirió al médico información clínica de seguimiento para los 2 individuos de la última situación para determinar si se habían diagnosticado con cáncer de próstata posteriormente a los

resultados de biopsia con aguja usados para este estudio. Uno de los individuos que generó originalmente una muestra benigna, pero se predijo por este estudio que tenía una malignidad, generó una muestra maligna. Como resultado, uno de los falsos positivos se volvió un verdadero positivo. Por lo tanto, el estado patológico se predijo correctamente en un 86 % de los casos examinados en este estudio. El valor predictivo positivo definitivo (VPP, en que VPP= verdaderos positivos/(verdaderos positivos + falsos positivos)) para este estudio era de un 91 % y el valor predictivo negativo (VPN, en que VPN= verdaderos negativos/(verdaderos negativos + falsos negativos)) era de un 80 %.

**Ejemplo 3: Estudio de delección de 3,4 kb- Procedimientos (n= 76)**

Se examinó en 76 muestras de tejido de próstata la delección de 3,4 kb en este estudio. Todas las muestras de tejido se fijaron con formalina, siendo 25 malignas, siendo 12 normales y teniendo 39 enfermedad prostática mostrada histológicamente. Del último grupo, más de la mitad tenía hiperplasia. Se tomaron biopsias con aguja de todos los especímenes de los archivos de tejido de los investigadores.

Especímenes de próstata

Se efectuó una toma de muestra con cinta en cada portaobjetos usando Prep-Strips (número de catálogo LCM0207) de Arcturus Bioscience Inc. Esto permitió la retirada de cualquier material particulado o tejido no adherente del portaobjetos antes de la extracción de ADN. Con el tejido restante sobre los portaobjetos, se aclararon los portaobjetos con PBS (solución salina tamponada con fosfato) para retirar todo el fijador posible. Se rasparon las 1-2 secciones de biopsia con aguja sobre los portaobjetos en tubos de microcentrifuga estériles usando cuchillas de afeitar quirúrgicas esterilizadas envasadas individualmente. Se aisló entonces el ADN y se purificó usando un kit QIAamp® DNA Mini (Qiagen, nº de cat. 51304) según las especificaciones del fabricante. Se procesó un control de extracto negativo en paralelo con las extracciones de portaobjetos como comprobación del control de calidad. Se determinó la concentración total de ADN y la relación de pureza para cada muestra mediante espectrofotometría (Nano-Drop™ ND-1000) y se prepararon diluciones de 2 ng/ml con el fin de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc).

Cebadores (Oligonucleótidos)

Se sintetizaron químicamente los cebadores oligonucleotídicos purificados por Invitrogen (California, EE.UU.). Se enumeran en la Tabla 1 las secuencias de los cebadores y los tamaños esperados de los productos de PCR amplificados. Además, el análisis por PCR de las detecciones de ADNmt incluía controles positivos (ADN de una fuente conocida por portar el ADNmt mutante). Se comprobó cada conjunto de cebadores, con la excepción del TNF (factor de necrosis tumoral), frente a una línea celular rho 0 exenta de mitocondrias para confirmar la ausencia de coamplificación pseudogénica.

Tabla 1. Cebadores de amplificación

Par cebador	Posición amplificada 5'- 3'	Longitud del producto amplificado (pares de bases)
<b>Delección de 3,4 en tiempo real</b>	10729-14379 (menos 3379 pb en 10744-14124)	273
<b>ADNmt de 12s</b>	708-945	238
<b>TNF</b>	3756-3886	131
de codificación de <b>3,4</b> (10729-10743 - 14125-14139) 5'TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA-3' SEQ ID NO: 2 Inverso de <b>3,4</b> (14361-14379) 5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3' SEQ ID NO: 3 de codificación de <b>12s</b> (708-728) 5'-CGTTCAGTGAGTTCACCCTC-3" SEQ ID NO: 4 inverso de <b>12s</b> (923-945) 5'-CACTCTTTACGCCGGCTTCTATT-3' SEQ ID NO: 5 de codificación de <b>TNF</b> (3756-3775) 5' -CCTGCCCAATCCCTTTATT-3' SEQ ID NO: 6 inverso de <b>TNF</b> (3866-3886) 5'-GGTTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3' SEQ ID NO: 7		

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se efectuaron 3 PCR separadas en cada muestra. Cada reacción tenía un volumen total de 25 ml e incluía ADN de molde, un par de cebadores (de 12s o delección 3,4 o TNF), un kit iQ™ SYBR Green Supermix™ (número de catálogo 170-8882, Bio-Rad Laboratories Inc.) y agua desionizada destilada (H<sub>2</sub>Odd). TNF (factor de necrosis tumoral) comprendía cebadores de gen nuclear de una copia y 12s comprendía cebadores del genoma mitocondrial total. Se enumeran a continuación el volumen y concentraciones de ADN de molde, cebadores y tampón de reacción.

Tabla 2. Componentes de la PCRc

Reactivo	Concentración por reacción	Volumen por reacción
Tampón de reacción	1X	12,5 µl
Cebador (de codificación e inverso)	250 nM	0,0625 µl de cada solución madre de 100 µmol
H <sub>2</sub> Odd	N/A	2,375 µl
ADN de molde	20 ng	10,0 µl
<b>Total</b>		25 µl

Se enumeran en la Tabla 3 los parámetros de ciclación para cada amplicón.

5

Tabla 3. Parámetros de ciclación

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

10

Se llevaron a cabo el ciclamiento térmico, detección en tiempo real y análisis de las reacciones usando un sistema de detección de fluorescencia continua DNA Engine Opticon® 2 equipado con software Intuitive Opticon Monitor™ (MJ Research Inc.). Se utilizó el procedimiento de la curva patrón para la cuantificación de ADN. Se efectuó un conjunto de diluciones en serie (10<sup>8</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>) de tres moldes generados por PCR purificados, un producto de la delección 3,4, otro de los cebadores de 12s y otro de TNF. A partir de esto, se generaron tres curvas patrón diferentes que muestran el número de copias de ADNmt total (cebadores del genoma mitocondrial total del amplicón 12s), teniendo la cantidad de ADNmt la delección de 3,4 kb, o ADN nuclear total (cebadores de gen nuclear de una copia TNF). Se convirtieron entonces los valores de C<sub>T</sub> de las muestras en el número de copias de ADN comparando la C<sub>T</sub> de la muestra con la de los patrones. La delección 3,4 se consideraba ausente o a bajos niveles si no se detectaba la delección al cabo de 37 ciclos.

15

20

La determinación de la malignidad está basada en la cantidad de la delección de 3,4 kb presente en la muestra normalizada, como se indica por la localización del umbral de ciclo. Esta localización puede ser absoluta como en más de 25 ciclos pero menos de 35 ciclos, o más probablemente una relación entre el ADN mitocondrial total presente como se indica por el amplicón 12s y la delección de 3,4 kb. Esto puede expresarse como un porcentaje del ADN mitocondrial total. El número de células, como se representa por el amplicón de TNF, puede incorporarse para refinar la distinción entre tejidos benignos y malignos.

25

Para automatizar los análisis de estas muestras, se emplearon herramientas bioinformáticas. Las tres variables que se consideraron para estos análisis fueron el umbral de ciclo C<sub>T</sub> de factor de necrosis tumoral (TNF), las especies totales de mitocondrias que contienen estos sitios cebadores específicos y aquellas mitocondrias que albergan la delección de interés.

30

Análisis de agrupamiento

El agrupamiento no se normalizó ni se usaron funciones logarítmicas debido al intervalo de datos similar y pequeño.



La Figura 3 muestra el recorrido real y las tendencias de los datos. El eje x es el número de paciente y el eje y es el umbral de ciclo obtenido por PCR en tiempo real.

Es importante observar que cuanto mayor es el umbral de ciclo, menor cantidad de delección está presente.

La tendencia general mostrada en la Figura 3 está basada en las diferencias/relaciones entre las variables de delección, total y TNF. La delección es de baja a ausente para las muestras benignas/normales (lado derecho) y aumenta (hacia la izquierda) con las muestras benignas anormales y malignas. Las muestras benignas anormales y malignas empiezan a diferenciarse entre sí basándose en la relación de umbral de ciclo de delección a TNF.

#### Aprendizaje supervisado

El aprendizaje supervisado está basado en los intentos del sistema de predecir las respuestas para muestras conocidas. Se usaron la mitad de los datos para ajustar y la otra mitad para ensayar el algoritmo. El aprendizaje supervisado compara sus predicciones con la respuesta objetivo resultado y “aprende” de sus errores. Pero, si la salida predicha es mayor o menor que la respuesta real de los datos, se retropropaga el error por el sistema y se ajustan los pesos en consecuencia.

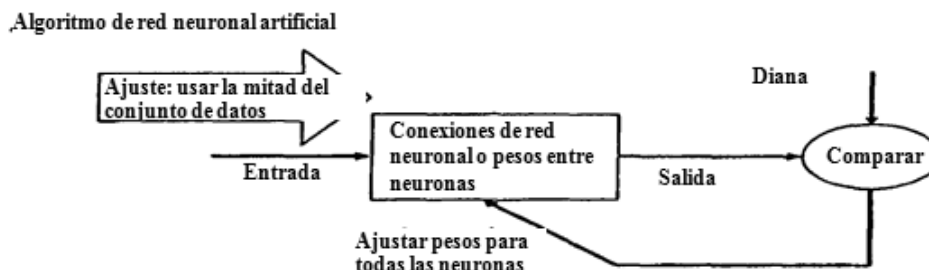
Conjunto de datos: 5 % a 35 % - **Benigna**  
 35 % a 65 % - **Hiperplasia**  
 65 % a 95 % - **Maligna**

Algoritmo de red neuronal artificial (RNA) (mostrado esquemáticamente a continuación):

La mitad del conjunto de datos usado para el ajuste del RNA

La otra mitad usado para comparar la exactitud.

Exactitud: comparar el conjunto de datos esperados con el conjunto de datos obtenidos → 86,6 %



Aprendizaje supervisado de los datos de delección usando la red neuronal artificial (RNA)

Tres clasificaciones:

- Benigna
- Hiperplasia
- Maligna

Se usaron tres variables para cada clasificación basándose en el umbral de ciclo  $C_T$  de PCR en tiempo real:

- Factor de necrosis tumoral (TNF)- control de copia nuclear
- Mitocondrias totales- control de copia mitocondrial
- Delección- mitocondrias en estado de delección.

Resultados:

Se usa la mitad del conjunto de datos para ajustar la RNA y se usa la mitad restante para comparar la exactitud.

**Exactitud de las tres clasificaciones = 86,6 %**

**Valor de predicción positiva (VPS):**

Benigna a maligna= 88,2 %

**Valor de predicción negativa (VPN):**

Benigna a maligna= 76,5 %

**Ejemplo 4: Delección de 3,4 kb en ADNmt asociado a cáncer de mama**

Se ensayaron en 18 muestras de tejido de mama maligno y benigno, siendo 9 malignas y 9 benignas, la presencia de la deleción de 3,4 kb anteriormente mencionada. Se clasificaron las muestras como malignas o benignas usando análisis histopatológicos convencionales.

5 Se aisló ADN y se purificó de las muestras usando un kit QIAamp® DNA Mini (Qiagen, nº de cat. 51304) según las instrucciones del fabricante.

10 Se sintetizaron químicamente los cebadores oligonucleotídicos purificados por Invitrogen (California, EE.UU.). Se enumeran en la Tabla 1 anterior las secuencias de los cebadores y los tamaños esperados de los productos de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

15 Se efectuaron tres PCR separadas en cada muestra. Cada reacción tenía 25 µl de volumen total e incluía ADN de molde, un par de cebadores (de 12s o deleción 3,4 o TNF), un kit iQ™ SYBR Green Supermix (número de catálogo 170-8882, Bio-Rad Laboratories Inc.) y agua desionizada destilada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). El TNF (factor de necrosis tumoral) comprendía cebadores de gen nuclear de una copia y 12s comprendía cebadores del genoma mitocondrial total. Se enumeran a continuación el volumen y las concentraciones de ADN de molde, cebadores y tampón de reacción:

20

Tabla 4. Componentes de PCRc.

Reactivo	Concentración por reacción	Volumen por reacción
Tampón de reacción	1X	12,5 µl
Cebador (de codificación e inverso)	250 nM	0,0625 µl de cada solución madre de 100 µmol
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	N/A	2,375 µl
ADN de molde	20 ng	10,0 µl
<b>Total</b>	25 µl	25 µl

Se enumeran en la Tabla 5 los parámetros de ciclación para cada amplicón.

25

Tabla 5. Parámetros de ciclación

Etapas	Temperatura (°C)	Duración
1	95	3 min
2	95	30 s
3	66 (cebadores de deleción de 3,4) o 61,5 (cebadores de 12s) o 61,5 (cebadores de TNF)	30 s
4	72	30 s
5	Lectura de placa	
6	72	10 min
7	Curva de fusión de 50-110 °C, lectura cada 1 °C	3 s
Repetir las etapas 2-5 44 veces para un total de 45 ciclos.		

30 Se llevaron a cabo la ciclación térmica, detección en tiempo real y análisis de las reacciones usando un sistema de detección continua de fluorescencia DNA Engine Opticon® 2 equipado con software Intuitive Opticon Monitor™ (MJ Research Inc.). Se utilizó el procedimiento de la curva patrón para la cuantificación de ADN. Se efectuó un conjunto de diluciones en serie (10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>) de los tres moldes generados por PCR, un producto de la deleción de 3,4, otro de los cebadores de 12s y otro de TNF. A partir de esto, se generaron tres curvas patrón diferentes que muestran el número de copias de ADNmt total (amplicón 12s-cebadores del genoma mitocondrial total), deleción de 3,4 o ADN nuclear total (TNF-cebadores de gen nuclear de una copia). Se convirtieron entonces los valores de C<sub>T</sub> de las muestras en el número de copias de ADN comparando el C<sub>T</sub> de muestra con el de los patrones.

35

5 Se basó la determinación de la malignidad en la cantidad de delección de 3,4 kb presente en la muestra normalizada, como se indica por la localización del umbral de ciclo. Esta localización puede ser absoluta, como en más de 25 ciclos pero menos de 30 ciclos, o más probablemente una relación entre el ADN mitocondrial total presente indicado por el amplicón de 12s y la delección de 3,4 kb. Esto puede expresarse como un porcentaje del ADN mitocondrial total.

10 Para automatizar los análisis de estas muestras, se emplearon herramientas de bioinformática. Las tres variables que se consideraron para estos análisis fueron el umbral de ciclo  $C_T$  de factor de necrosis tumoral (TNF), las especies totales de mitocondrias que contienen esos sitios cebadores específicos y aquellas mitocondrias que albergan la delección de interés.

15 La Tabla 6 y la Figura 7 muestran la diferencia en las puntuaciones medias de  $C_T$  para muestras de tejido maligno y tejido benigno. El valor medio de  $C_T$  para tejido normal era de 30,5889, mientras que el  $C_T$  medio para tejido maligno era de 27,8533, ilustrando así la diferencia en la cantidad de ADNmt que tiene la delección de 3,4 kb en tejido de mama maligno en comparación con tejido de mama normal.

Tabla 6 Valores medios de puntuación de  $C_T$

Estadística de grupo					
GRP		N	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
del3,4	normal	9	30,5889	2,53897	0,84632
	maligno	9	27,8533	2,52253	0,84084

20 La Figura 8 es una curva COR que ilustra la especificidad y sensibilidad de la delección de ADNmt de 3,4 kb como marcador para cáncer de mama cuando se ensaya tejido de mama. Estos resultados se obtuvieron usando un corte  $C_T$  de 29,1900. La sensibilidad del marcador a este  $C_T$  era de 77,8 %, mientras que la especificidad era de 77,8 %.

25 La Tabla 7 muestra el cálculo del área bajo la curva para el presente ejemplo como medida de la exactitud de la prueba.

Área bajo la curva				
Variable(s) del resultado de la prueba del3,4				
Área	Error estándar <sup>a</sup>	Señal asintótica <sup>b</sup>	Intervalo de confianza asintótico del 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
0,790	0,112	0,038	0,570	1,010

a. Bajo la hipótesis no paramétrica  
b. Área real para hipótesis nula = 0,5

30 Se muestra en la tabla 8 siguiente la determinación del corte  $C_T$  de 29,1900. Los resultados enumerados en la tabla 8 muestran que un corte  $C_T$  de 29,1900 proporcionaba la máxima sensibilidad y especificidad de 78 % y 78 % respectivamente.

Tabla 8. Determinación del corte  $C_T$ .

Coordenadas de la curva		
Variable(s) del resultado de ensayo: del3,4		
Positiva si es menor o igual a <sup>a</sup>	Sensibilidad	1 - Especificidad
24,6000	0,000	0,000
25,6800	0,111	0,000
25,7700	0,222	0,000
25,9250	0,333	0,000
26,2050	0,444	0,000

26,8400	0,556	0,000
27,4800	0,556	0,111
28,1600	0,556	0,222
28,8800	0,667	0,222
29,1900	0,778	0,222
28,4600	0,778	0,333
29,8750	0,778	0,444
30,5850	0,778	0,556
31,2200	0,778	0,667
31,5000	0,889	0,667
31,7650	0,889	0,778
32,9900	1,000	0,778
34,3350	1,000	0,889
36,6400	1,000	1,000

<sup>a</sup>. El menor valor de corte es el valor de prueba observado mínimo menos 1, y el mayor valor de corte es el valor de prueba observado máximo más 1. Todos los valores de corte son las medias de dos valores de prueba observados ordenados consecutivos

**Ejemplo 5: La delección de 3,4 kb en el fluido de masaje prostático de individuos con cáncer de próstata en comparación con el fluido de aquellos sin evidencia histológica de cáncer de próstata**

5 Se recogieron 40 muestras de fluido de masaje prostático por urólogos de pacientes que se diagnosticaron posteriormente con cáncer de próstata o no mostraron evidencia histológica de cáncer de próstata después de un procedimiento de biopsia con aguja de próstata. Se depositó la muestra en una IsoCode Card™ (Schleicher y Shuell), se secó y se extrajo entonces según el protocolo del fabricante. Se cuantificaron todos los extractos de ADN usando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 y se normalizó la concentración de ADN a 2 ng/μl. Se amplificó entonces cada muestra según los siguientes parámetros:

10 1X iQ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad P/N 170-8880)  
 150 nmol de cebador de codificación  
 (5'-TAGACTACGTACATACTAACCCCTACTCCTA-3') (SEQ ID NO: 2).  
 15 150 nmol de cebador inverso  
 (5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3') (SEQ ID NO: 3)  
 20 ng de ADN de molde  
 en una reacción de 25 μl.

20 Se ciclaron las reacciones en un Opticon™ 2 DNA Engine (Bio-Rad Canada) según el siguiente protocolo:  
 1. 95 °C durante 3 minutos  
 2. 95 °C durante 30 segundos  
 3. 66 °C durante 30 segundos  
 4. 72 °C durante 30 segundos  
 25 5. Lectura de placa  
 6. Repetir las etapas 2-5 44 veces  
 7. 72 °C durante 10 minutos  
 8. Curva de fusión de 50 a 105 °C, lectura cada 1 °C, mantener durante 3 segundos  
 9. Mantener a 10 °C

30 *Tabla 9. Resultados que muestran los valores medios de C<sub>T</sub> para la prueba de fluido de masaje prostático*

Estadística de grupo					
Grupo		N	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
DEL3.4	benigna	25	37,1869	3,18495	0,63699
	maligna	15	33,7712	3,98056	1,02778

Las Tablas 9 y 10 muestran una diferencia significativa entre los valores medios de  $C_T$  obtenidos para los grupos de muestras benignas y muestras malignas ( $p= 0,005$ ).

Tabla 10. Resultados que muestran la diferencia ( $p= 0,005$ ) para los valores de  $C_T$  de muestras

Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba de t para la igualdad de medias							
		F	Señ.	t	df	Señ. (bilateral)	Diferencia media	Error estándar de la diferencia	Intervalo de confianza del 95 % de la diferencia		
										Inferior	Superior
DEL3.4	Suponiendo varianzas iguales	1,251	0,270	2989	38	0,005	3,41570	1,14283	1,10217	5,72923	
	No suponiendo varianzas iguales			2825							24,696

5 La Figura 5 es una curva de característica operativa del receptor (COR) que ilustra la especificidad y sensibilidad de la delección de ADNmt de 3,4 kb como marcador de cáncer de próstata cuando se ensaya fluido de masaje prostático. Se obtuvieron estos resultados usando un corte  $C_T$  de 37,3683. La sensibilidad del marcador a este  $C_T$  es de 87 %, mientras que la especificidad es de 64 %.

10 La exactitud de la prueba depende de lo bien que la prueba separe el grupo que se ensaya en aquellos con y sin cáncer de próstata. La exactitud se mide por el área bajo la curva COR. La Tabla 11 muestra el cálculo del área bajo la curva para el presente ejemplo.

15 Tabla 11. Resultados que muestran el área bajo la curva COR

Área bajo la curva				
Variable(s) del resultado de la prueba: DEL3,4				
Área	Error estándar <sup>a</sup>	Señal asintótica <sup>b</sup>	Intervalo de confianza del 95 % asintótico	
			Límite inferior	Límite superior
0,768	0,074	0,005	0,622	0,914

a. Bajo la hipótesis no paramétrica  
b. Hipótesis nula: área verdadera: 0,5

Tabla 12. Determinación de especificidad y sensibilidad

Coordenadas de la curva		
Variable(s) del resultado de la prueba: DEL3,4		
Positiva si es menor o igual a <sup>a</sup>	Sensibilidad	1-Especificidad
26,2992	0,000	0,000
27,3786	0,067	0,000
28,2484	0,133	0,000
29,5193	0,200	0,000
30,1757	0,200	0,040
30,4580	0,200	0,080

30,5980	0,267	0,080
31,5709	0,333	0,080
32,5712	0,333	0,120
32,9500	0,333	0,160
33,3314	0,400	0,160
33,8547	0,467	0,160
33,9247	0,533	0,160
34,3554	0,533	0,200
34,9058	0,533	0,240
35,4650	0,533	0,280
35,9172	0,533	0,320
36,0648	0,600	0,320
36,3816	0,667	0,320
38,6421	0,733	0,320
36,8531	0,733	0,360
37,1188	0,800	0,360
37,3683	0,867	0,360
37,5200	0,867	0,400
37,8341	0,867	0,440
38,2533	0,867	0,480
38,5198	0,933	0,480
38,8519	0,933	0,520
38,8552	0,933	0,580
39,1258	0,933	0,600
39,2734	0,933	0,640
39,4952	0,933	0,680
39,7323	1,000	0,680
39,8956	1,000	0,720
41,0000	1,000	1,000

El menor valor de corte es el valor de prueba observado mínimo menos 1, y el mayor valor de corte es el valor de prueba máximo observado más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de prueba observados ordenados consecutivos.

5

Se muestra en la tabla 12 anterior la determinación del corte  $C_T$  de 37,3683. Los resultados enumerados en la tabla 12 ilustran que un corte  $C_T$  de 37,3683 proporcionaba la máxima sensibilidad y especificidad.

10 **Ejemplo 6: La delección de 3,4 kb en la orina de individuos con cáncer de próstata en comparación con el fluido de aquellos sin evidencia histológica de cáncer de próstata**

15 Se recogieron muestras de orina de 5 pacientes que se habían diagnosticado con cáncer de próstata y 5 que habían experimentado un procedimiento de biopsia con aguja que no pudo detectar malignidad de próstata. Se recogieron estas muestras después de un examen rectal digital (ERD) para facilitar la recogida de células de próstata.

20 Tras la recepción de las muestras, se retiró una alícuota de 5 ml y se centrifugaron entonces 2 ml a 14.000 x g, formando un sedimento. Se retiró el sobrenadante y se desechó. Se resuspendieron los sedimentos en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato. Se sometieron tanto el sedimento resuspendido como la muestra de orina completa a un procedimiento de extracción de ADN usando el kit QiaAMP™ DNA Mini (Qiagen P/N 51304) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron entonces los extractos de ADN resultantes usando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 y se normalizaron a una concentración de 0,1 ng/µl.

25 Se analizaron las muestras mediante PCR en tiempo real cuantitativa con los cebadores específicos de delección de 3,4 kb según lo siguiente:  
 1X iQ SYBR Green Supermix™ (Bio-Rad P/N 170-8880)  
 100 nmol de cebador de codificación (5'-TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA-3') (SEQ ID NO: 2)  
 100 nmol de cebador inverso (5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3') (SEQ ID NO: 3)  
 1 ng de ADN de molde

en una reacción de 25 µl.

Se ciclaron las reacciones en un Opticon™ 2 DNA Engine (Bio-Rad Canada) según el siguiente protocolo:

- 5 1. 95 °C durante 3 minutos
2. 95 °C durante 30 segundos
3. 69 °C durante 30 segundos
4. 72 °C durante 30 segundos
5. Lectura de placa
6. Repetir las etapas 2-5 44 veces
- 10 7. 72 °C durante 10 minutos
8. Curva de fusión de 50 a 105 °C, lectura cada 1 °C, mantener durante 3 segundos
9. Mantener a 10 °C

Tabla 13. Valores medios para las puntuaciones de  $C_T$

Estadísticas de grupo					
GRPfluid38		N	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
CTf3.4	Benigna	5	33,2780	1,10900	0,49596
	Maligna	5	30,6980	2,55767	1,14382

15 Las Tablas 13 y 14 muestran una diferencia significativa entre los valores medios de  $C_T$  obtenidos para grupos de muestras benignas y muestras malignas ( $p= 0,005$ ).

Tabla 14. Resultados que muestran la diferencia ( $p= 0,005$ ) para valores de  $C_T$  de muestras

Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba de t para la igualdad de medias							
		F	Señ.	t	df	Señ. (bilateral)	Diferencia media	Error estándar de la diferencia	Intervalo de confianza del 95 % de la diferencia		
										Inferior	Superior
CTf	Suponiendo varianzas iguales	1,272	0,292	2069	8	0,072	258000	1,24672	-0,29494	5,45494	
	No suponiendo varianzas iguales			2069	5,453	0,089	258000	1,24672	-0,54639	5,70639	

20 La Figura 6 es una curva de característica operativa del receptor (COR) que ilustra la especificidad y sensibilidad de la detección de ADNmt de 3,4 kb como marcador para cáncer de próstata cuando se ensaya orina. Se obtuvieron estos resultados usando un corte  $C_T$  de 31,575. La sensibilidad del marcador a este  $C_T$  es de 80 %, mientras que la especificidad es de 100 %.

25 Se muestra en la Tabla 15 la determinación del corte  $C_T$  de 31,575. Los resultados enumerados en la tabla 15 muestran que el corte  $C_T$  de 31,575 proporcionaba las máximas sensibilidad y especificidad.

Tabla 15: Determinación del corte  $C_T$ .

Coordenadas de la curva		
Variable(s) del resultado de la prueba: $C_{Tf}$		
Positiva si es menor o igual a <sup>a</sup>	Sensibilidad	1 - Especificidad
26,2900	0,000	0,000
28,4950	0,200	0,000
30,3850	0,400	0,000

31,0800	0,600	0,000
31,5750	0,800	0,000
32,1400	0,800	0,200
32,8150	0,800	0,400
33,8700	0,800	0,600
34,3350	0,800	0,800
34,3550	1,000	0,800
35,3700	1,000	1,000

<sup>a</sup>. El menor valor de corte es el valor de prueba mínimo observado menos 1 y el mayor valor de corte es el valor de prueba máximo observado más 1. Todos los demás valores de corte son las medias de dos valores de prueba observados ordenados consecutivos.

### Ejemplo 7: Detección de la secuencia eliminada de 3,4 kb recircularizada en tejido de próstata maligno y benigno

5 En este ejemplo, se ensayó la cantidad de moléculas de ADNmt eliminadas de 3,4 kb en muestras como indicador de cáncer de próstata. Como se menciona anteriormente, la secuencia de 3,4 kb, tras la delección, puede reconformarse como una molécula de ADNmt circular. Se realizó la amplificación de la región diana del sublimón de ADNmt de 3,4 dt eliminado usando un par de cebadores (SEQ ID NOS: 9 y 10). El cebador de codificación (SEQ ID NO: 9) se superpone con el sitio de reinserción de los extremos de la secuencia de 3,4 kb.

10 El tejido de próstata se fijó con formalina y se embebió en parafina con biopsias con aguja de tejido de próstata.

La configuración de reactivos usada para este ejemplo fue como sigue:

15 250 nmol de cada cebador,  
12,5 µl de 2x mezcla de reacción,  
20 ng (10 µl de 2 ng/µl) de molde en un volumen de reacción de 25 µl.

Los parámetros de ciclación fueron los siguientes:

20 1. 95 °C durante 3 minutos  
2. 95 °C durante 30 segundos  
3. 62 °C durante 30 segundos  
4. 72 °C durante 30 segundos  
5. Lectura de placa  
6. Repetir las etapas 2-5 44 veces  
25 7. 72 °C durante 10 minutos  
8. Curva de fusión de 50-100 °C, lectura cada 1 °C durante 3 segundos  
9. mantener a 4 °C.

30 Se realizó la amplificación de la región diana del sublimón de ADNmt de 3,4 kb eliminado usando un par de cebadores (SEQ ID NOS: 9 y 10).

35 La Tabla 16 siguiente proporciona un sumario de las pruebas realizadas para la detección de los 3,4 kb reales eliminados en el ADNmt obtenidos a partir de tejido de próstata maligno y benigno. Usando una puntuación de  $C_T$  de 30,0, fue posible una clara identificación del tejido maligno y benigno. Como tal, un aumento en la cantidad de la molécula de 3,4 kb presente en una muestra era indicativo de cáncer.

Tabla 16: Puntuaciones de  $C_T$  para la detección de cáncer en tejido de próstata

Descripción	$C_T$
Muestra benigna 1	33,75
Muestra maligna 1	28,79
Muestra benigna 2	30,96
Muestra maligna 2	28,4
Muestra benigna 3	32,19
Muestra maligna 3	27,38



Aunque la invención se ha descrito con referencia a ciertas realizaciones específicas, resultarán evidentes para los especialistas en la materia diversas modificaciones de la misma sin apartarse de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 **REFERENCIAS**

- Birch-Machin MA, "Online Conference Report (Sunburnt DNA), International Congress of Biochemistry and Molecular Biology", New Scientist, 2000(a).
- Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B, Ackrell BAC, Turnbull DM. Ann. Neurol. 48: 330-335, 2000(b).
- 10 Birch-Machin, M.A. (2000). "Mitochondria and skin disease". Clin. Exp. Dermatol., 25, 141-6.
- Brown, M.D., *et al.*, Am. J. Humn. Genet., 60: 381-387, 1997.
- 15 Bogliolo, M, *et al.*, Mutagenesis, 14: 77-82, 1999.
- Chinnery PF y Turnbull DM., Lancet 354 (suplemento 1): 17-21, 1999.
- Huoponen, Kirsi, "Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings", Neurogenetics (2001) 3: 119-125.
- 20 Hayward SW, Grossfeld GD, Tlsty TD, Cunha GR., Int. J. Oncol. 13: 35-47, 1998.
- Huang GM, Ng WL, Farkas J, He L, Liang HA, Gordon D, Hood R., Genomics 59(2): 178-86,1999.
- 25 Konishi N, Cho M, Yamamoto K, Hiasa Y. Pathol. Int. 47: 735-747,1997.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer J. Clin. 49: 8-31..
- 30 Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YHu. "Federation of European Biochemical Societies", 441: 292-296,1998
- Mitochondrial Research Society <http://www.mitoresearch.org/diseases.html>.
- MITOMAP: base de datos del genoma mt humano ([www.gen.emory.edu/mitomap.html](http://www.gen.emory.edu/mitomap.html)).
- 35 Naviaux, RK., "Mitochondrial Disease- Primary Care Physican's Guide". Psy-Ed. Corp D/B/A Exceptional Parents Guide: 3-10, 1997.
- Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sánchez-Céspedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D: "Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates". Cancer Res. 2001, 61: 7623-7626
- 40 Polyak Y, *et al.*, Nature Genet. 20 (3): 291-293, 1998.
- 45 Seidman, M.D. *et al.*, Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 123: 1039-1045, 1997.
- Sherrat EJ, Thomas AW, Alcolado JC., Clin. Sci. 92: 225-235,1997.
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckford CL y Wallace DC., Genomics 17: 171-184, 1993.
- 50 SpringNet - CE Connection: "Screening, Diagnosis: Improving Primary Care Outcomes". Sitio web: <http://www.springnet.com/ce/j803a.htm>.
- 55 Taniike, M. *et al.*, BioChem. BioPhys. Res. Comun., 186: 47-53, 1992.
- Valnot, Isabelle, *et al.*, "A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency", Human Genetics (1999) 104: 460-466.
- 60 von Wurmb, N, Oehinichen, M, Meissner, C., Mutat. Res. 422: 247-254, 1998.
- Wallace *et al.*, "Mitochondiral DNA MUtatio Assoicated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy", Science, 1427-1429.
- 65 Wei YH. "Proceedings of the Nat. Sci. Council of the Republic of China" abril 22(2): 5567, 1998.

Woodwell DA. "National Ambulatory Medical Care Survey: 1997 Summary. Advance data from vital and health statistics"; nº 305. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 1999.

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

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

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

10 A continuación, se representan realizaciones adicionales de la presente divulgación:

1. Un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende;
  - a) obtener una muestra biológica del individuo;
  - b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
  - 15 c) cuantificar la cantidad de ADNmt de la muestra que tiene una deleción en la secuencia de ácido nucleico entre los residuos 10743 y 14125 del genoma de ADNmt;
  - d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con al menos un valor de referencia conocido.
2. El procedimiento de la realización 1, en el que la deleción tiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1.
- 20 3. El procedimiento de la realización 1, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido.
4. El procedimiento de la realización 1, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de deleción en una muestra de referencia de ADNmt a partir de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de cuantificación se realiza usando PCR en tiempo real.
6. El procedimiento de la realización 5, en el que la cuantificación de la deleción incluye amplificar en primer lugar una región diana de ADNmt que sea indicativa de la deleción, y cuantificar la cantidad de región diana amplificada.
- 30 7. El procedimiento de la realización 5, en el que se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 2 como parte de un par de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.
8. El procedimiento de la realización 1, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
9. El procedimiento de la realización 1, en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 35 10. El procedimiento de la realización 1, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.
11. El procedimiento de la realización 10, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo consistente en tejido de mama, tejido de próstata, fluido de masaje prostático y orina.
12. El procedimiento de la realización 6, en el que el valor de referencia es un umbral de ciclo.
13. Un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo que comprende:
  - 40 a) obtener una muestra biológica del individuo;
  - b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
  - c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una deleción en la secuencia de ácido nucleico entre los residuos 10743 y 14125 del genoma de ADNmt;
  - d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con la cantidad de deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso;
- 45 en el que una cantidad elevada de deleción en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia es indicativa de cáncer.
14. El procedimiento de la realización 13, en el que la deleción tiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia identificada en SEQ ID NO: 1.
- 50 15. El procedimiento de la realización 13, que comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la deleción con la cantidad de deleción en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
16. El procedimiento de la realización 13, en el que la cuantificación de la deleción incluye amplificar una región diana de ADNmt que es indicativa de la deleción, y cuantificar la cantidad de la región diana amplificada.
- 55 17. El procedimiento de la realización 16, en el que se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 2 como parte de un par de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.
18. El procedimiento de la realización 16, en el que la etapa de cuantificación se realiza usando PCR en tiempo real.
19. El procedimiento de la realización 13, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
- 60 20. El procedimiento de la realización 13, en el que el cáncer es cáncer de mama.
21. El procedimiento de la realización 13, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.
22. El procedimiento de la realización 21, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo consistente en tejido de mama, tejido de próstata, fluido de masaje prostático y orina.
23. Un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo, que comprende;
  - 65 a) obtener una muestra biológica del individuo;
  - b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;

- c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección en la secuencia de ácido nucleico entre los residuos 10743 y 14125 del genoma de ADNmt;
- d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido;
- 5 en el que un nivel similar de delección en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia es indicativo de cáncer.
24. El procedimiento de la realización 23, en el que la delección tiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1.
25. El procedimiento de la realización 23, que comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido.
- 10 26. El procedimiento de la realización 23, en el que la cuantificación de la delección incluye amplificar una región diana del ADNmt que es indicativa de la delección, y cuantificar la cantidad de región diana amplificada.
27. El procedimiento de la realización 26, en el que se usa un cebador de PCR que tiene la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 2 como parte de un par de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.
- 15 28. El procedimiento de la realización 26, en el que se realiza la etapa de cuantificación usando PCR en tiempo real.
29. El procedimiento de la realización 23, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
- 20 30. El procedimiento de la realización 23, en el que el cáncer es cáncer de mama.
31. El procedimiento de la realización 23, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.
32. El procedimiento de la realización 31, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo consistente en tejido de mama, tejido de próstata, fluido de masaje prostático y orina.
33. Un procedimiento de monitorización en un individuo del desarrollo de un cáncer, que comprende:
- 25 a) obtener una muestra biológica;
- b) extraer ADNmt de la muestra;
- c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una delección en la secuencia de ácido nucleico entre los residuos 10743 y 14125 del genoma de ADNmt;
- d) repetir las etapas a) a c) durante un periodo de tiempo;
- 30 en el que un nivel creciente de delección durante el periodo de tiempo es indicativo de cáncer.
34. El procedimiento de la realización 33, en el que la delección tiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1.
35. El procedimiento de la realización 33, que comprende adicionalmente al menos una etapa seleccionada del grupo consistente en: (a) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal no canceroso conocido y (b) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene la delección con la cantidad de delección en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
- 35 36. El procedimiento de la realización 33, en el que la cuantificación de la delección incluye amplificar una región diana de ADNmt que sea indicativa de la delección, y cuantificar la cantidad de región diana amplificada.
- 40 37. El procedimiento de la realización 36, en el que se realiza la etapa de cuantificar usando PCR en tiempo real.
38. El procedimiento de la realización 36, en el que se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 2 como parte de un par de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.
39. El procedimiento de la realización 33, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
- 45 40. El procedimiento de la realización 33, en el que el cáncer es cáncer de mama.
41. El procedimiento de la realización 33, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.
42. El procedimiento de la realización 41, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo consistente en tejido de mama, tejido de próstata, fluido de masaje prostático y orina.
43. El procedimiento según una cualquiera de las realizaciones 6, 16 o 26, en el que se realiza la amplificación de la región diana usando un par de cebadores de amplificación, superponiéndose uno de los pares de cebadores de amplificación con las regiones de inserción de corte y empalme en extremos opuestos de la delección.
- 50 44. Un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo, que comprende:
- 55 a) obtener una muestra biológica del individuo;
- b) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de la muestra;
- c) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una secuencia correspondiente a la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 1;
- d) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra correspondiente a la SEQ ID NO: 1 con al menos un valor de referencia conocido.
- 60 45. El procedimiento de la realización 44, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1 en una muestra de referencia de ADNmt de un tejido o fluido corporal no canceroso.
46. El procedimiento de la realización 44, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1 en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o fluido corporal canceroso conocido.
- 65

47. El procedimiento de la realización 44, en el que la etapa de cuantificación se realiza usando PCR en tiempo real.

48. El procedimiento de la realización 47, en el que la cuantificación de la delección incluye en primer lugar amplificar una región diana de ADNmt que es indicativa de la delección, y cuantificar la cantidad de región diana amplificada.

49. El procedimiento de la realización 44, en el que uno de un par de cebadores de PCR usados en la amplificación de la región de ensayo se superpone con un sitio de reinserción de la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, después de recircularizar la secuencia.

50. El procedimiento de la realización 47, en el que se usa un cebador de PCR que tiene una secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 9 como parte de un par de cebadores de amplificación para amplificar la región diana.

51. El procedimiento de la realización 44, en el que el cáncer es cáncer de próstata.

52. El procedimiento de la realización 44, en el que el cáncer es cáncer de mama.

53. El procedimiento de la realización 44, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.

54. El procedimiento de la realización 53, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo consistente en tejido de mama, tejido de próstata, fluido de masaje prostático y orina.

55. El procedimiento de la realización 47, en el que el valor de referencia es un umbral de ciclo.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genesis Genomics Inc.

<120> Delección de ADN mitocondrial de 34 kb para uso en la detección de cáncer

<130> 102222/00031

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3379

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 539 001 T3

cctaaaccta	ctccaatgct	aaaactaatc	gtcccaacaa	ttatattact	accactgaca	60
tgactttcca	aaaaacacat	aatttgaatc	aacacaacca	cccacagcct	aattattagc	120
atcatccctc	tactatTTTT	taaccaaatc	aacaacaacc	tatttagctg	ttccccaacc	180
ttttcctccg	accccctaac	aacccccctc	ctaatactaa	ctacctgact	cctaccctc	240
acaatcatgg	caagccaacg	ccacttatcc	agtgaaccac	tatcacgaaa	aaaactctac	300
ctctctatac	taatctccct	acaaatctcc	ttaattataa	cattcacagc	cacagaacta	360
atcatatTTT	atatcttctt	cgaaaccaca	cttatcccca	ccttggctat	catcaccoga	420
tgaggcaacc	agccagaacg	cctgaacgca	ggcacatact	tcctattcta	caccctagta	480
ggctcccttc	ccctactcat	cgcactaatt	tacactcaca	acaccctagg	ctcactaac	540
attctactac	tcactctcac	tgcccaagaa	ctatcaaact	cctgagccaa	caacttaata	600
tgactagctt	acacaatagc	ttttatagta	aagatacctc	tttacggact	ccacttatga	660
ctccctaaag	cccatgtcga	agcccccatc	gctgggtcaa	tagtaactgc	cgcagtactc	720
ttaaaactag	gcggtatgg	tataatacgc	ctcacactca	ttctcaacct	cctgacaaaa	780
cacatagcct	acccttctct	tgtactatcc	ctatgaggca	taattataac	aagctccatc	840
tgccctacgac	aaacagacct	aaaatcgctc	attgcatact	cttcaatcag	ccacatagcc	900
ctcgtagtaa	cagccattct	catccaaacc	ccctgaagct	tcaccggcgc	agtcattctc	960
ataatcgccc	acgggcttac	atcctcatta	ctattctgcc	tagcaaactc	aaactacgaa	1020
cgcactcaca	gtcgcacat	aatcctctct	caaggacttc	aaactctact	cccactaata	1080
gctttttgat	gacttctagc	aagcctcgct	aacctcgctt	tacccccac	tattaaccta	1140
ctggggagaac	tctctgtgct	agtaaccacg	ttctcctgat	caaatatcac	tctcctactt	1200
acaggactca	acatactagt	cacagcccta	tactccctct	acatatttac	cacaacacaa	1260
tggggctcac	tcaccaccca	cattaacaac	ataaaaccct	cattcacacg	agaaaacacc	1320
ctcatggtca	tacacctatc	ccccattctc	ctcctatccc	tcaacccoga	catcattacc	1380

gggtttctct cttgtaaata tagttaaacc aaaacatcag attgtgaatc tgacaacaga 1440  
 ggcttacgac cccttattta ccgagaaagc tcacaagaac tgctaactca tgcccccatg 1500  
 tctaacaaca tggctttctc aacttttaaa ggataacagc tatccattgg tcttaggccc 1560  
 caaaaatttt ggtgcaactc caaataaaaag taataacat gcacactact ataaccaccc 1620  
 taaccctgac ttccctaatt cccccatcc ttaccaccct cgtaaacctt aacaaaaaaaa 1680  
 actcataccc ccattatgta aatccattg tgcacccac ctttattatc agtctcttcc 1740  
 ccacaacaat attcatgtgc ctagaccaag aagttattat ctcgaactga cactgagcca 1800  
 caacccaaac aaccagctc tcctaagct tcaaaactaga ctacttctcc ataataattca 1860  
 tcctgttagc attgttcggt acatgggtcca tcatagaatt ctactgtga tatataaact 1920  
 cagaccctaa cattaatcag ttcttcaaat atctactcat cttcctaatt accataactaa 1980  
 tcttagttac cgetaacaac ctattccaac tgttcatcgg ctgagagggc gtaggaatta 2040  
 tatecttctt gctcatcagt tgatgatagc cccgagcaga tgccaacaca gcagccattc 2100  
 aagcaatcct atacaaccgt atcggcgata tcggtttcat cctcgcctta gcatgattta 2160  
 tcctacactc caactcatga gaccacaac aaatagcctt tctaaacgct aatccaagcc 2220  
 tcacccact actaggcctc ctctagcag cagcaggcaa atcagcccaa ttaggtctcc 2280  
 acccctgact cccctcagcc atagaaggcc ccacccagc ctcagcccta ctccactcaa 2340  
 gcactatagt tgtagcagga atcttcttac tcatccgctt ccacccctta gcagaaaata 2400  
 gccactaat ccaaactcta aactatgct taggcgctat caccactctg ttcgcagcag 2460  
 tctgcgccct tacacaaaat gacatcaaaa aaatcgtagc cttctccact tcaagtcaac 2520  
 taggactcat aatagttaca atcggcatca accaaccaca cctagcattc ctgcacatct 2580  
 gtaccacgc cttcttcaaa gccatactat ttatgtgctc cgggtccatc atccacaacc 2640  
 ttaacaatga acaagatatt cgaaaaatag gaggactact caaaaccata cctctcactt 2700  
 caacctcct caccattggc agcctagcat tagcaggaat acctttctc acaggtttct 2760  
 actccaaaga ccacatcctc gaaaccgcaa acatatcata cacaacgcc tgagccctat 2820  
 ctattactct catcgctacc tcctgacaa gcgcctatag cactcgaata attcttctca 2880  
 ccctaacagg tcaacctgc ttcccaccc ttactaacat taacgaaaat aacccaccc 2940  
 tactaaacce cattaacgc ctggcagccg gaagcctatt cgcaggattt ctattacta 3000  
 acaacatttc ccccgcatcc ccttccaaa caacaatccc cctctaccta aaactcacag 3060  
 ccctcgtgt cactttccta ggacttctaa cagccctaga cctcaactac ctaaccaaca 3120  
 aacttaaaat aaaatcccca ctatgcacat tttatttctc caacatactc ggattctacc 3180  
 ctagcatcac acaccgcaca atcccctatc taggccttct tacgagccaa aacctgcccc 3240

ES 2 539 001 T3

	<b>tactcctcct agacctaacc tgactagaaa agctattacc taaaacaatt tcacagcacc</b>	<b>3300</b>
	<b>aaatctccac ctccatcacc acctcaaccc aaaaaggcat aattaaactt tacttcctct</b>	<b>3360</b>
	<b>ctttcttctt cccactcat</b>	<b>3379</b>
	<210> 2	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador de codificación de detección de la delección de 3,4 kb	
	<400> 2	
15	tagactacgt acatactaac cctactccta 30	
	<210> 3	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso de detección de la delección de ADNmt de 3,4	
30	<400> 3	
	gaggtaggat tgggtcgtg 19	
	<210> 4	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de codificación del genoma de ADNmt	
45	<400> 4	
	cgttccagtg agttcacct c 21	
50	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador inverso del genoma de ADNmt	

<400> 5  
 cactctttac gccggcttct att 23  
 5 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador de codificación de gen nuclear de TNF  
 <400> 6  
 cctgccccaa tccctttatt 20  
 20 <210> 7  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador inverso de gen nuclear de TNF  
 <400> 7  
 35 ggtttcgaag tgggtgtctt g 21  
 <210> 8  
 <211> 16569  
 40 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3107)..(3107)  
 50 <223> n es a, c, g, o t  
 <300>  
 55 <308> AC\_000021  
 <309> 07-03-2007  
 <313> (1)..(16569)  
 60 <400> 8



ES 2 539 001 T3

gatcacaggt ctatcacctt	attaaccact cacgggagct	ctccatgcat ttggtat	60
cgtctggggg gtatgcacgc	gatagcattg cgagacgctg	gagccggagc accctatgtc	120
gcagtatctg tctttgattc	ctgcctcacc ctattattta	tcgcacctac gttcaatatt	180
acaggcgaac atacttacta	aagtgtgtta attaattaat	gcttgttagga cataataata	240
acaattgaat gtctgcacag	ccactttcca cacagacatc	ataacaaaaa atttccacca	300
aacccccctt cccccgcttc	tggccacagc acttaaacac	atctctgccca aacccccaaa	360
acaagaacc ctaacaccag	cctaaccaga tttcaaattt	tatcttttgg cggtatgcac	420
ttttaacagt cccccccaa	ctaacacatt attttccctt	cccactccca tactactaat	480
ctcatcaata caacccccgc	ccatcctacc cagcacacac	acaccgctgc taacccccata	540
ccccgaacca accaaacccc	aaagacaccc cccacagttt	atgtagctta cctcctcaaa	600
gcaatacact gaaaatgttt	agacgggctc acatcacccc	ataaacaat aggtttggtc	660
ctagcctttc tattagctct	tagtaagatt acacatgcaa	gcatccccgt tccagtgagt	720
tcaccctcta aatcaccacg	atcaaaagga acaagcatca	agcacgcagc aatgcagctc	780
aaaacgctta gcctagccac	acccccacgg gaaacagcag	tgattaacct ttagcaataa	840
acgaaagttt aactaagcta	tactaacccc agggttggtc	aatttcgtgc cagccaccgc	900

ES 2 539 001 T3

ggtcacacga ttaacccaag tcaatagaag cgggcgtaaa gagtgtttta gatcaccccc 960  
 tccccataa agctaaaact cacctgagtt gtaaaaaact ccagttgaca caaatagac 1020  
 tacgaaagtg gctttaacat atctgaacac acaatagcta agacccaaac tgggattaga 1080  
 taccocacta tgcttagccc taaacctcaa cagttaaatc aacaaaactg ctgcgacaga 1140  
 cactacgagc cacagcttaa aactcaaagg acctggcggg gcttcatatc cctctagagg 1200  
 agcctgttct gtaatcgata aaccccgatc aacctacca cctcttgctc agcctatata 1260  
 ccgccatctt cagcaaacc tgatgaaggc taciaagtaa gcgcaagtac ccacgtaaag 1320  
 acgttaggtc aagggtgtagc ccatgaggtg gcaagaaatg ggctacattt tctaccccag 1380  
 aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaagg gatttagca gtaaactaag 1440  
 agtagagtgc ttagttgaac agggccctga agcgcgtaca caccgccctg caccctctc 1500  
 aagtatactt caaaggacat ttaactaaaa cccctacgca tttatataga ggagacaagt 1560  
 cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgca cttggacgaa ccagagtgtg gcttaacaca 1620  
 aagcacccaa cttacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaacct 1680  
 gccccaaacc cactccacct tactaccaga caaccttagc caaacattt acccaataa 1740  
 agtataggcg atagaaattg aaacctggcg caatagatat agtaccgca gggaaagatg 1800  
 aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaacccc tataccttct gcataatgaa 1860  
 ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga cccccgaaac cagacgagct 1920  
 acctaagaac agctaaaaga gcacaccctg ctatgtagca aatagtgagg aagatttata 1980  
 ggtagaggcg acaaacctac cgagcctggg gatagctggg tgtccaagat agaacttag 2040  
 ttcaacttta aatttgccca cagaaccctc taaatcccct tgtaaattta actgttagtc 2100  
 caaagaggaa cagctctttg gacactagga aaaaacctg tagagagagt aaaaaattta 2160  
 acaccatag taggcctaaa agcagccacc aattaagaaa gcggtcaagc tcaacacca 2220  
 ctacctaaaa aatcccaaac atataactga actcctcaca cccaattgga ccaatctatc 2280  
 accctataga agaactaatg ttagtataag taacatgaaa acattctcct ccgcataagc 2340  
 ctgcgtcaga ttaaaacact gaactgacaa ttaacagccc aatatctaca atcaaccaac 2400  
 aagtcattat taccctcact gtcaacccaa cacaggcatg ctcataagga aagggttaaaa 2460  
 aaagtaaaag gaactcggca aatcttacc cgcctgttta ccaaaaacat cacctctagc 2520  
 atcaccagta ttagaggcac cgcctgccc gtgacacatg ttaacggcc gcggtaccct 2580  
 aaccgtgcaa aggtagcata atcacttgtt ccttaaatag ggacctgtat gaatggctcc 2640  
 acgagggttc agctgtctct tacttttaac cagtgaatt gacctgccg tgaagaggcg 2700  
 gcataaacac agcaagacga gaagacccta tggagcttta attattaat gcaaacagta 2760  
 cctaacaac ccacaggtcc taaactacca aacctgcatt aaaaatttcg gttggggcga 2820

ES 2 539 001 T3

cctcggagca gaaccaacc tccgagcagt acatgctaag acttcaccag tcaaagcgaa 2880  
 ctactatact caattgatcc aataaactga ccaacggaac aagttaccct agggataaca 2940  
 gcgcaatcct attctagagt ccatatcaac aatagggttt acgacctcga tgttggatca 3000  
 ggacatcccg atgggtgcagc cgctattaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac 3060  
 gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctacnttc aaattcctcc 3120  
 ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa ggccttccc ccgtaaataga 3180  
 tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc 3240  
 agagcccggg aatcgcataa aacttaaac ttacagtca gaggttcaat tcctcttctt 3300  
 aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgtac ccattctaata cgcaatggca 3360  
 ttctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac 3420  
 gttgtaggcc octacgggct actacaacc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa 3480  
 gagcccctaa aacccgccac atctaccatc accctctaca tcaccgcccc gaccttagct 3540  
 ctaccatcg ctcttctact atgaaccccc ctcccatac ccaaccccct ggtcaacctc 3600  
 aacctaggcc tcctatztat tctagccacc tctagcctag ccgtttactc aatcctctga 3660  
 tcagggtgag catcaaaactc aaactacgcc ctgatcggcg cactgcgagc agtagcccaa 3720  
 acaatctcat atgaagtcac cctagccatc attctactat caacattact aataagtggc 3780  
 tcctttaacc tctccaccct tatcacaaca caagaacacc tctgattact cctgccatca 3840  
 tgaccottgg ccataatatg atttatctcc aactagcag agaccaaccg aacccccttc 3900  
 gaccttgccg aaggggagtc cgaactagtc tcaggcttca acatcgaata cgccgcaggc 3960  
 cccttogccc tattottcat agccgaatac acaaacatta ttataataaa caccctcacc 4020  
 actacaatct tcctaggaac aacatatgac gcactctccc ctgaactcta cacaacatat 4080  
 tttgtcacca agaccctact tctaacctcc ctgttcttat gaattcgaac agcatacccc 4140  
 cgattocgct acgaccaact catacacctc ctatgaaaaa acttcctacc actcaccta 4200  
 gcattactta tatgatatgt ctccataccc attacaatct ccagcattcc ccctcaaacc 4260  
 taagaaatat gtctgataaa agagttactt tgatagagta aataatagga gcttaaaccc 4320  
 ccttatttct aggactatga gaatcgaacc catccctgag aatccaaaat tctccgtgcc 4380  
 acctatcaca ccccatccta aagtaaggtc agctaaataa gctatcgggc ccataccccg 4440  
 aaaatgttgg ttataccctt cccgtactaa ttaatcccct ggcccaaccc gtcactact 4500  
 ctaccatctt tgcaggcaca ctcatcacag cgctaagctc gcactgattt ttacctgag 4560  
 taggcctaga aataaacatg ctagctttta ttccagttct aaccaaaaaa ataaaccctc 4620  
 gttccacaga agctgccatc aagtatttcc tcacgcaagc aaccgcatcc ataatccttc 4680

ES 2 539 001 T3

taatagctat cctcttcaac aatatactct cgggacaatg aaccataacc aatactacca 4740  
 atcaatactc atcattaata atcataatag ctatagcaat aaaactagga atagccccct 4800  
 ttcacttctg agtcccagag gttacccaag gcacccctct gacatccggc ctgcttcttc 4860  
 tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcatatacca aatctctccc tcaactaaacg 4920  
 taagccttct cctcactctc tcaatcttat ccatcatagc aggcagttga ggtggattaa 4980  
 accaaaccca gctacgcaaa atcttagcat actcctcaat taccacata ggatgaataa 5040  
 tagcagttct accgtacaac cctaacataa ccattcttaa ttttaactatt tatattatcc 5100  
 taactactac cgcattccta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat 5160  
 ctgcgacctg aaacaagcta acatgactaa cacccttaat tccatccacc ctctctccc 5220  
 taggaggcct gccccgcta accggctttt tgcccaaag ggcattatc gaagaattca 5280  
 caaaaaacaa tagcctcatc atccccacca tcatagccac catcacctc cttaacctct 5340  
 acttctacct acgcctaate tactccacct caatcacact actcccata tetaacaacg 5400  
 taaaaataaa atgacagttt gaacatacaa aaccacccc attcctccc aactcatcg 5460  
 cccttaccac gctactccta cctatctccc cttttatact aataatotta tagaaattta 5520  
 ggtaaatac agaccaagag cttcaaagc cctcagtaag ttgcaatact taatttctgt 5580  
 aacagctaag gactgcaaaa cccactctg catcaactga acgcaaatca gccactttaa 5640  
 ttaagctaag cccttactag accaatggga cttaaacca caaacactta gttaacagct 5700  
 aagcacccta atcaactggc ttcaatctac ttctcccgcc gccgggaaa aaggcgggag 5760  
 aagccccggc aggtttgaag ctgcttcttc gaatttgcaa ttcaatatga aatcacctc 5820  
 ggagctggtta aaaagaggcc taaccctgt ctttagattt acagtccaat gcttactca 5880  
 gccattttac ctacccccca ctgatgttcg ccgaccgttg actattctct acaaaccaca 5940  
 aagacattgg aacactatac ctattattcg gcgcatgagc tggagtccca ggcacagctc 6000  
 taagcctcct tattcgagcc gagctgggcc agccaggcaa ccttctaggt aacgaccaca 6060  
 tctacaacgt tatcgtcaca gcccatgcat ttgtaataat cttcttcata gtaataccca 6120  
 tcataatcgg aggctttggc aactgactag ttcccctaata atcgggtgcc cccgatatgg 6180  
 cgtttccccg cataaacaac ataagcttct gactcttacc tccctctctc ctactcctgc 6240  
 tcgcatctgc tatagtggag gccggagcag gaacaggttg aacagtctac cctcccttag 6300  
 caggyaacta ctcccacct ggagcctccg tagacctaac catcttctcc ttacacctag 6360  
 caggtgtctc ctctatctta ggggccatca atttcatcac aacaattatc aatataaac 6420  
 ccctgccat aaccaatac caaacgcccc tcttcgtctg atccgtccta atcacagcag 6480  
 tctacttct cctatctctc ccagtcctag ctgctggcat cactatacta ctaacagacc 6540  
 gcaacctcaa caccaccttc ttcgaccccc cgggaggagg agacccatt ctataccaac 6600

ES 2 539 001 T3

acctattctg atttttcggg caccctgaag tttatattct taccctacca ggcttcggaa 6660  
 taatctccca tattgtaact tactactccg gaaaaaaga accatttgga tacataggta 6720  
 tggctctgagc tatgatatca attggcttcc tagggtttat cgtgtgagca caccatata 6780  
 ttacagtagg aatagacgta gacacacgag catatttcac ctccgctacc ataatcatcg 6840  
 ctatccccac cggcgtcaa gtatttagct gactcgccac actccacgga agcaatatga 6900  
 aatgatctgc tgcagtgtc tgagccctag gattcatctt tcttttcacc gtaggtggcc 6960  
 tgactggcat tgtattagca aactcatcac tagacatcgt actacacgac acgtactacg 7020  
 ttgtagccca cttccactat gtcctatcaa taggagctgt atttgccatc ataggaggct 7080  
 tcattcactg atttccccta ttctcaggct acaccctaga ccaaacctac gccaaaatcc 7140  
 atttcactat catattcatc ggcgtaaata taactttctt cccacaacac tttctcggcc 7200  
 tatccggaat gccccgacgt tactcggact accccgatgc atacaccaca tgaacatcc 7260  
 tatcatctgt aggetcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcattgattt 7320  
 gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaaccctcc ataaacctgg 7380  
 agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaaccctga tacataaaat 7440  
 ctagacaaaa aaggaaggaa tcgaaccccc caaagctggt ttcaagccaa ccccatggcc 7500  
 tccatgactt tttcaaaaag gtattagaaa aaccatttca taactttgtc aaagttaaata 7560  
 tataggctaa atcctatata tcttaatggc acatgcagcg caagtaggtc tacaagacgc 7620  
 tacttcccct atcatagaag agcttatcac ctttcatgat cacgcctca taatcatttt 7680  
 ccttatctgc ttcctagtcc tgtatgcctt tttcctaaca ctcaacaaca aactaactaa 7740  
 tactaacatc tcagacgtc aggaaataga aaccgtctga actatcctgc ccgcatcat 7800  
 cctagtctc atcgccctcc catccctacg catcctttac ataacagacg aggtcaacga 7860  
 tccctccctt accatcaaat caattggcca ccaatggtac tgaacctacg agtacaccga 7920  
 ctacggcgga ctaatcttca actcctacat acttccccca ttattcctag aaccaggcga 7980  
 cctgcgactc cttgacgttg acaatcgagt agtactcccg attgaagccc ccattcgtat 8040  
 aataattaca tcacaagacg tcttgactc atgagctgtc cccacattag gcttaaaaac 8100  
 agatgcaatt cccggacgtc taaaccaaac cactttcacc gctacacgac cgggggtata 8160  
 ctacggtcaa tgctctgaaa tctgtggagc aaaccacagt ttcattgcca tcgtcctaga 8220  
 attaattccc ctaaaaatct ttgaaatagg gcccgattt accctatagc accccctcta 8280  
 cccctctag agcccactgt aaagctaact tagcattaac cttttaagtt aaagattaag 8340  
 agaaccaaca cctctttaca gtgaaatgcc ccaactaaat actaccgtat ggcccacat 8400  
 aattaccccc atactcctta cactattcct catcacccaa ctaaaaatat taaacacaaa 8460

ES 2 539 001 T3

ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga 8520  
 accaaaatga acgaaaatct gttcgcttca ttcattgccc ccacaatcct aggcctaccc 8580  
 gccgcagtac tgatcattct atttccccct ctattgatcc ccacctcaa atatctcatc 8640  
 aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaa acaaatgata 8700  
 accatacaca aactaaagg acgaacctga tctcttatac tagtatcctt aatcattttt 8760  
 attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac cacccaacta 8820  
 tctataaacc tagccatggc catccccctta tgagcgggca cagtgattat aggccttcgc 8880  
 tctaagatta aaaatgccct agcccacttc ttaccacaag gcacacctac accccttatc 8940  
 ccatactag ttattatcga aaccatcagc ctactcattc aaccaatagc cctggccgta 9000  
 cgcctaaccg ctaacattac tgcaggccac ctactcatgc acctaattgg aagcgcacc 9060  
 ctagcaatat caaccattaa ccttccctct acacttatca tcttcacaat tctaattcta 9120  
 ctgactatcc tagaaatcgc tgtcgcctta atccaagcct acgttttcac acttctagta 9180  
 agcctctacc tgcacgacaa cacataatga cccaccaatc acatgcctat catatagtaa 9240  
 aaccagccc atgacccta acaggggccc tctcagccct cctaatagacc tccggcctag 9300  
 ccatgtgatt tcacttccac tccataacgc tcctcactact aggcctacta accaacacac 9360  
 taacatata ccaatgatgg cgcgatgtaa cacgagaaag cacataccaa ggccaccaca 9420  
 caccacctgt ccaaaaaggc cttcgatagc ggataatcct atttattacc tcagaagttt 9480  
 ttttctcgc aggatttttc tgagcctttt accactccag cctagcccct acccccctaat 9540  
 taggagggca ctggcccca acaggcatca ccccgctaaa tcccctagaa gtcccactcc 9600  
 taaacacatc cgtattactc gcctcaggag tatcaatcac ctgagctcac catagtctaa 9660  
 tagaaaacaa ccgaaaccaa ataattcaag cactgcttat tacaatttta ctgggtctct 9720  
 atttaccct cctacaagcc tcagagtact tcgagtctcc cttcaccatt tccgacggca 9780  
 tctacggctc aacatttttt gtagccacag gcttccacgg acttcacgtc attattggct 9840  
 caactttcct cactatctgc ttcacccgcc aactaatatt tcactttaca tccaaacatc 9900  
 actttggctt cgaagccgcc gcctgatact ggcattttgt agatgtgggt tgactatttc 9960  
 tgtatgtctc catctattga tgagggtctt actcttttag tataaatagt accgttaact 10020  
 tccaattaac tagttttgac aacattcaaa aaagagtaat aaacttcgcc ttaattttaa 10080  
 taatcaacac cctcctagec ttactactaa taattattac attttgacta ccacaactca 10140  
 acggctacat agaaaaatcc accccttacg agtgccgctt cgacctata tccccgccc 10200  
 gcgtcccttt ctccataaaa ttcttcttag tagctattac cttcttatta tttgatctag 10260  
 aaattgccct ccttttacc cttaccatgag ccctacaaac aactaacctg ccaactaatag 10320  
 ttatgtcatc cctcttatta atcatcatcc tagccctaag tctggcctat gagtgactac 10380

ES 2 539 001 T3

aaaaaggatt agactgaacc gaattggtat atagtttaa caaaacgaat gatttcgact 10440  
 cattaaatta tgataatcat atttaccaa tgcccctcat ttacataaat attataactag 10500  
 catttaccat ctcaacttcta ggaataactag tatatcgctc acacctcata tectccctac 10560  
 tatgcctaga aggaataata ctatcgctgt tcattatagc tactctcata accctcaaca 10620  
 cccactccct cttagccaat attgtgccta ttgccatact agtctttgcc gcctgcgaag 10680  
 cagcgggtggg cctagcccta ctagtctcaa tctccaacac atatggccta gactacgtac 10740  
 ataacctaaa cctactcaa tgctaaaact aatcgtccca acaattatat tactaccact 10800  
 gacatgactt tccaaaaaac acataatttg aatcaacaca accaccaca gcctaattat 10860  
 tagcatcatc cctctactat tttttaacca aatcaacaac aacctattta gctgttcccc 10920  
 aaccttttcc tccgaccccc taacaacccc cctcctaata ctaactacct gactcctacc 10980  
 cctcacaatc atggcaagcc aacgccactt atccagtga ccactatcac gaaaaaaact 11040  
 ctacctctct atactaatct ccctacaaat ctcttaatt ataacattca cagccacaga 11100  
 actaatcata ttttatatct tottogaaac cacactatc cccaccttgg ctatcatcac 11160  
 ccgatgaggc aaccagccag aacgcctgaa cgcaggcaca tacttctat tctacaccct 11220  
 agtaggctcc ctteccctac tcatcgcaat aatttacact cacaacaccc taggctcact 11280  
 aaacattcta ctactcactc tcaactgcca agaactatca aactcctgag ccaacaactt 11340  
 aatatgacta gcttacacaa tagcttttat agtaaagata cctctttacg gactccactt 11400  
 atgactccct aaagcccatg togaagcccc catcgctggg tcaatagtac ttgccgcagt 11460  
 actcttaaaa ctaggcggct atggtataat acgcctcaca ctcttctca acccctgac 11520  
 aaaacacata gcctaccctc tccttgtact atccctatga ggcataatta taacaagctc 11580  
 catctgccta cgacaaacag acctaaaatc gctcattgca tactcttcaa tcagccacat 11640  
 agccctcgta gtaacagcca ttctcatcca aacccctga agcttcaccg gcgcagtcac 11700  
 tctcataatc gccacgggc ttacatcctc attactatc tgccctagcaa actcaaaacta 11760  
 cgaacgcact cacagtcgca tcataatcct ctctcaagga cttcaaactc tactcccact 11820  
 aatagctttt tgatgacttc tagcaagcct cgctaacctc gccttaccce ccactattaa 11880  
 cctactggga gaactctctg tgctagtaac cacgttctcc tgatcaaata tcaactctct 11940  
 acttacagga ctcaacatac tagtcacagc cctatactcc ctctacatat ttaccacaac 12000  
 acaatggggc tcaactaccc accacattaa caacataaaa ccctcattca cacgagaaaa 12060  
 caccctcatg ttcatacacc tatccccat tctctctcta tccctcaacc ccgacatcat 12120  
 taccgggttt tcctcttgta aatatagttt aaccaaaca tcagattgtg aatctgacaa 12180  
 cagaggctta cgaccctta tttaccgaga aagctcaca gaactgctaa ctcatgcccc 12240

ES 2 539 001 T3

catgtctaac aacatggctt tctcaacttt taaaggataa cagctatcca ttggtcttag 12300  
 gccccaaaaa ttttgggtgca actccaaata aaagtaataa ccatgcacac tactataacc 12360  
 accctaacc tgaacttccct aattcccccc atccttacca ccctcgtaa ccctaacaaa 12420  
 aaaaactcat acccccatta tgtaaaatcc attgtcgcac ccacctttat tatcagtctc 12480  
 ttccccacaa caatattcat gtgcctagac caagaagtta ttatctcgaa ctgacactga 12540  
 gccacaacc aaacaaccca gctctcccta agcttcaaac tagactactt ctccataata 12600  
 ttcattccctg tagcattggt cgttacatgg tccatcatag aattctcact gtgatata 12660  
 aactcagacc caaacattaa tcagttcttc aaatatctac tcattctcct aattaccata 12720  
 ctaatcttag ttaccgctaa caacctattc caactgttca tcggctgaga gggcgttagga 12780  
 attatatcct tcttgctcat cagttgatga tacgcccagag cagatgcaa cacagcagcc 12840  
 attcaagcaa tcctatacaa ccgtatcggc gatatcgggt tcattcctcgc cttagcatga 12900  
 tttatcctac actccaactc atgagaccca caacaaatag cccttctaaa cgctaatacca 12960  
 agcctcacc cactactagg cctcctccta gcagcagcag gcaaatcagc ccaattaggt 13020  
 ctccaccct gactcccctc agccatagaa ggccccacc cagtctcagc cctactccac 13080  
 tcaagcacta tagttgtage aggaatcttc ttactcatcc gottccacc cctagcagaa 13140  
 aatagcccac taatccaaac tctaactacta tgcttaggcg ctatcaccac tctgttcgca 13200  
 gcagtctgcg cccttacaca aatgacatc aaaaaaatcg tagccttctc cacttcaagt 13260  
 caactaggac tcataatagt tacaatcggc atcaaccaac cacacctagc attcctgcac 13320  
 atctgtacc acgccttctt caaagccata ctatttatgt gctccgggtc catcatccac 13380  
 aaccttaaca atgaacaaga tattcgaaaa ataggaggac tactcaaaac catacctctc 13440  
 acttcaacct ccctcaccat tggcagccta gcattagcag gaataccttt cctcacaggt 13500  
 ttctactcca aagaccacat catcgaaacc gcaaacatat catacacaaa cgcctgagcc 13560  
 ctatctatta ctctcatcgc tacctccctg acaagcgcct atagcactcg aataattctt 13620  
 ctcacctaa caggtcaacc tcgcttcccc acccttacta acattaacga aaataacccc 13680  
 accctactaa accccattaa acgcctggca gccggaagcc tattcgcagg atttctcatt 13740  
 actaacaaca tttccccgc atccccctc caaacaacaa tccccctcta cctaaaactc 13800  
 acagccctcg ctgtcacttt cctaggactt ctaacagccc tagacctca ctacctaac 13860  
 aacaaactta aaataaaatc cccactatgc acattttatt tctccaacat actcggattc 13920  
 taccttagca tcacacaccg cacaatcccc tatctaggcc ttcttagcag ccaaaacctg 13980  
 ccctactcc tcctagacct aacctgacta gaaaagctat tacctaaaac aatttcacag 14040  
 caccaaactc ccacctccat catcacctca acccaaaaag gcataattaa actttacttc 14100  
 ctctctttct tcttcccact catcctaacc ctactcctaa tcacataacc tattcccccg 14160



ES 2 539 001 T3

agcaatctca attacaatat atacaccaac aaacaatggt caaccagtaa ctactactaa 14220  
 tcaacgccc a taatcatata aagccccgc accaatagga tcctcccga tcaaccctga 14280  
 cccctctcct tcataaatta ttcagcttcc tacactatta aagtttacca caaccaccac 14340  
 cccatcatac tctttcaccc acagcaccaa tcctacctcc atcgctaacc cactataaac 14400  
 actcaccaag acctcaacc ctgaccccc tgcctcagga tactcctcaa tagccatcgc 14460  
 tgtagtatat ccaaagacaa ccatcattcc ccctaataa attaaaaaa ctattaaacc 14520  
 catataacct cccccaaaat tcagaataat aacacaccgc accacaccgc taacaatcaa 14580  
 tactaaaccc ccataaatag gagaaggctt agaagaaaac ccacaaaacc ccattactaa 14640  
 acccacactc aacagaaaca aagcatacat cattattctc gcacggacta caaccacgac 14700  
 caatgatatg aaaaaccatc gttgtatttc aactacaaga acaccaatga cccaatagc 14760  
 caaaactaac cccctaataa aattaattaa ccactcattc atcgacctcc ccacccatc 14820  
 caacatctcc gcatgatgaa acttcggctc actccttggc gcctgcctga tcctcaaact 14880  
 caccacagga ctattcctag ccatgcacta ctcaccagac gcctcaaccg ccttttcac 14940  
 aatcgccac atcactcgag acgtaaatta tggctgaatc atccgctacc ttcacgcaa 15000  
 tggcgcctca atattcttta tctgcctctt cctacacatc gggcgaggcc tatattacgg 15060  
 atcatttctc tactcagaaa cctgaaacat cggcattatc ctctgcttg caactatagc 15120  
 aacagccttc ataggctatg tcctcccggtg aggcacaata tcattctgag gggccacagt 15180  
 aattacaaac ttactatccg ccatcccata cattgggaca gacctagttc aatgaatctg 15240  
 aggaggctac tcagtagaca gtcccacct cacacgatc tttaccttc acttcatctt 15300  
 gcccttcatt attgcagccc tagcaaacct ccacctccta ttcttgacg aaacgggatc 15360  
 aaacaacccc ctaggaatca cctcccattc cgataaaatc acctccacc ctactacac 15420  
 aatcaaagac gccctcggct tacttctctt ccttctctcc ttaatgacat taacactatt 15480  
 ctcaccagac ctctagggc acccagacaa ttataccta gccaacccct taacacccc 15540  
 tccccacatc aagcccgaat gatatttctt attcgcctac acaattctcc gatccgtccc 15600  
 taacaaacta ggaggcgtcc ttgccctatt actatccatc ctcatcctag caataatccc 15660  
 catcctccat atatccaaac aacaaagcat aatatttgcg cactaagcc aatcacttta 15720  
 ttgactccta gccgcagacc tcctcattct aacctgaatc ggaggacaac cagtaagcta 15780  
 cccttttacc atcattggac aagtagcatc cgtactatac ttcacaacaa tcctaactct 15840  
 aataccaact atctccctaa ttgaaaacaa aatactcaa tgggcctgtc cttgtagtat 15900  
 aaactaatac accagtcttg taaaccggag atgaaaacct tttccaagc acaatcaga 15960  
 gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caagctaag attctaattt aaactattct 16020

ES 2 539 001 T3

ctggttcttc atggggaagc agatttgggt accaccaag tattgactca cccatcaaca 16080  
 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtaoagg taccataaat 16140  
 acttgaccac ctgtagtaca taaaaacca atccacatca aaacccctc cccatgctta 16200  
 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc 16260  
 cctcaccac taggatacca acaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc 16320  
 catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccatgg atgaccccc 16380  
 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgt 16440  
 actctcctcg ctccgggccc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat 16500  
 ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagcccac acgttccct taaataagac 16560  
 atcacgatg 16569

<210> 9

5 <211> 22

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de codificación para la detección de la secuencia eliminada de ADNmt de 3,4 kb

15 <400> 9

cccactcatc acctaaacct ac 22

20 <210> 10

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia eliminada de 3,4 kb

30

<400> 10

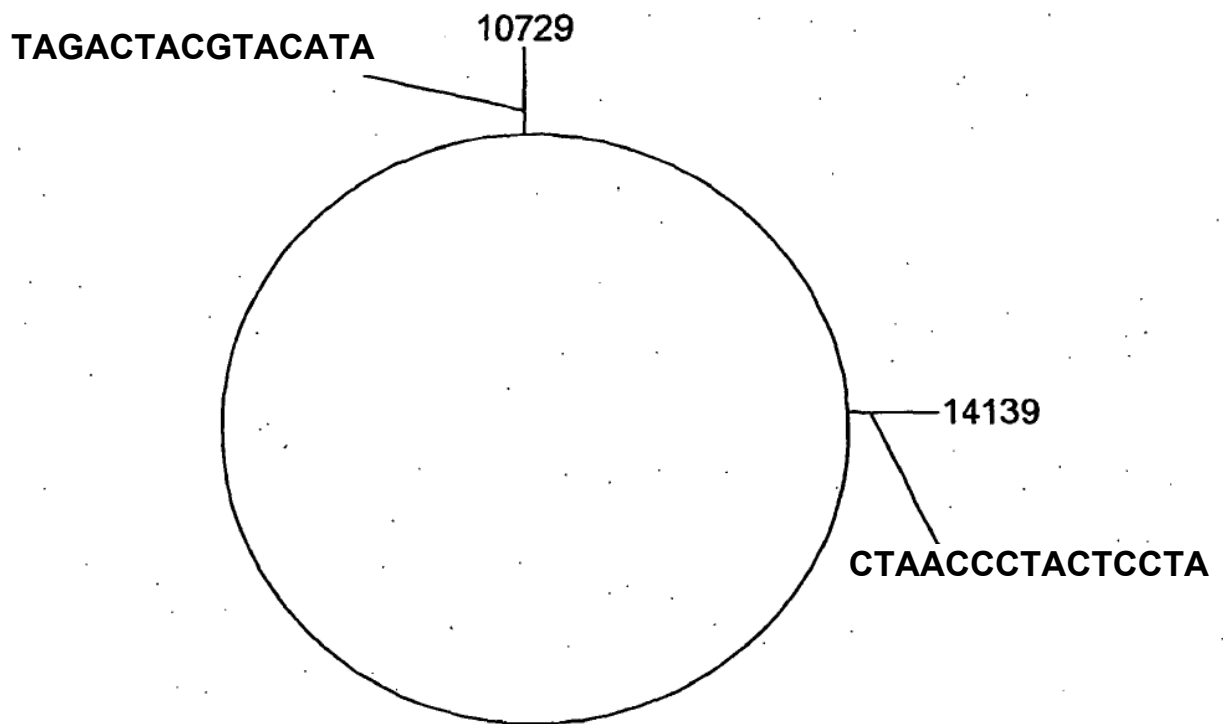
ggtaggagtc aggtagttag 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de detección de un cáncer en un individuo, que comprende:
- 5           a) extraer ADN mitocondrial, ADNmt, de una muestra biológica del individuo;
- b) cuantificar la cantidad de ADNmt en la muestra que tiene una secuencia correspondiente a la secuencia  
10           identificada en la SEQ ID NO: 1 usando un par de cebadores de amplificación, en el que uno del par de  
            cebadores de amplificación usados en la amplificación de la región diana se superpone con un sitio de  
            reinserción de la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, después de recircularizar la secuencia;
- c) comparar la cantidad de ADNmt en la muestra correspondiente a la SEQ ID NO: 1 recircularizada con al  
            menos un valor de referencia conocido.
- 15   **2.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de  
secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1 recircularizada en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o  
fluido corporal no canceroso conocido.
- 20   **3.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el al menos un valor de referencia conocido es la cantidad de  
secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1 recircularizada en una muestra de referencia de ADNmt de tejido o  
fluido corporal canceroso conocido.
- 25   **4.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se realiza la etapa de cuantificación usando PCR en tiempo  
real.
- 5.** El procedimiento de la reivindicación 4, en el que se usa un cebador de amplificación que tiene una secuencia  
            correspondiente a la SEQ ID NO: 9 como uno del par de cebadores de amplificación para amplificar la región  
            diana.
- 30   **6.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
- 7.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 8.** E procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es un tejido corporal o fluido corporal.
- 35   **9.** El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la muestra biológica es tejido de mama, tejido de próstata,  
fluido de masaje prostático u orina.
- 40   **10.** El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el valor de referencia es un umbral de ciclo.

**Figura 1**

**Diseño de cebador para la delección de 3,4 kb**



**CEBADOR FINAL: TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA**

Figura 2

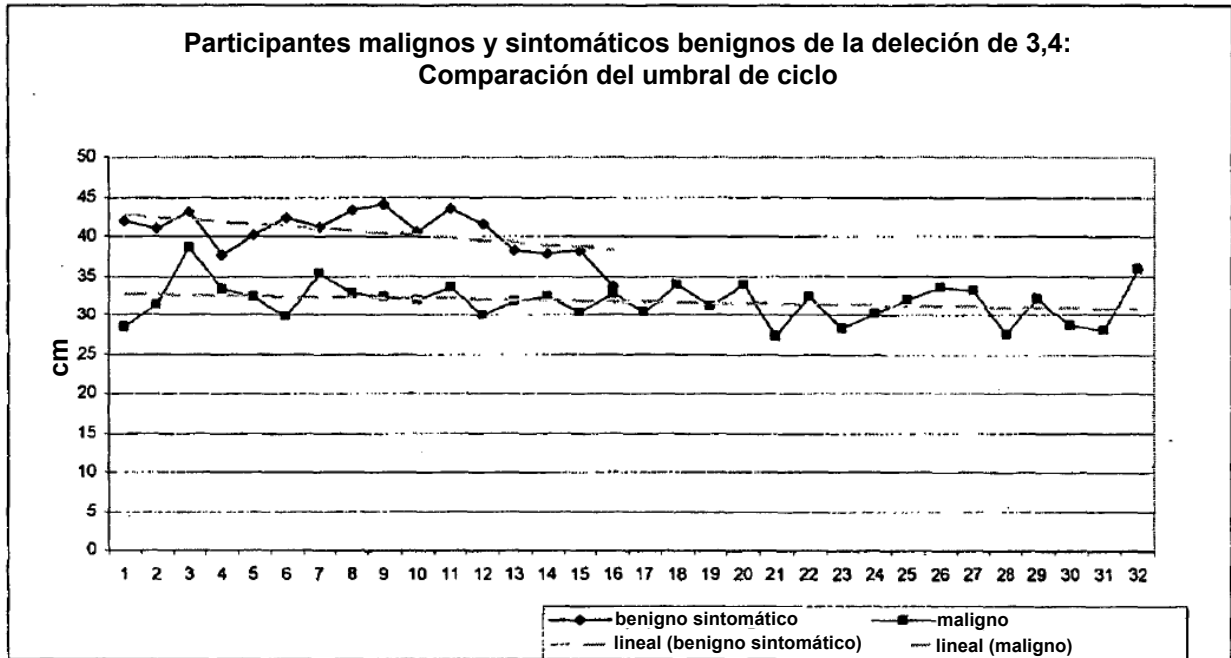


Figura 3

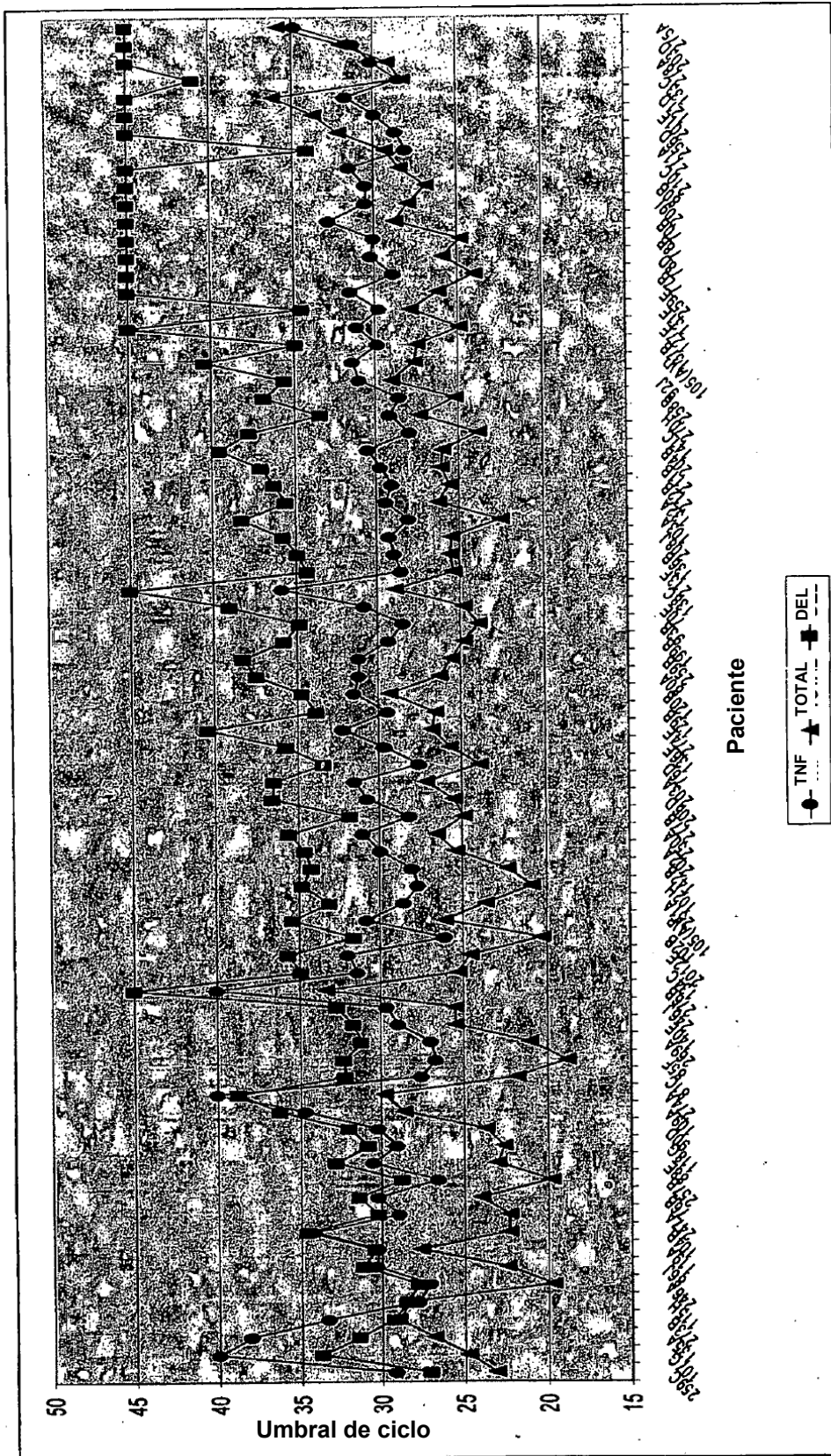


Figura 4

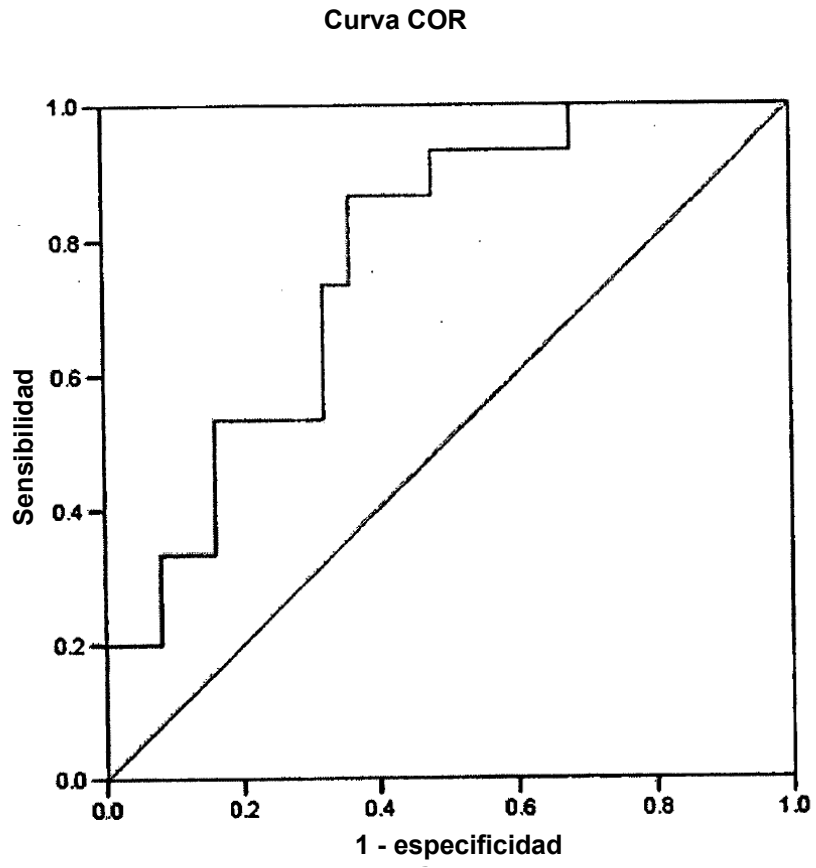


Figura 5

Curva COR

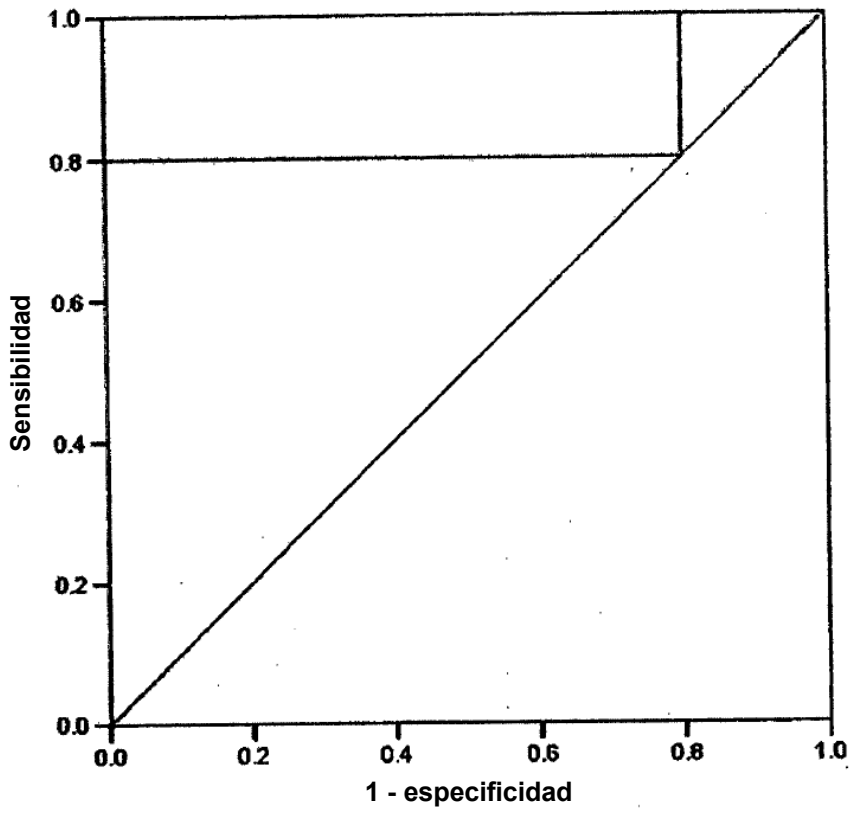
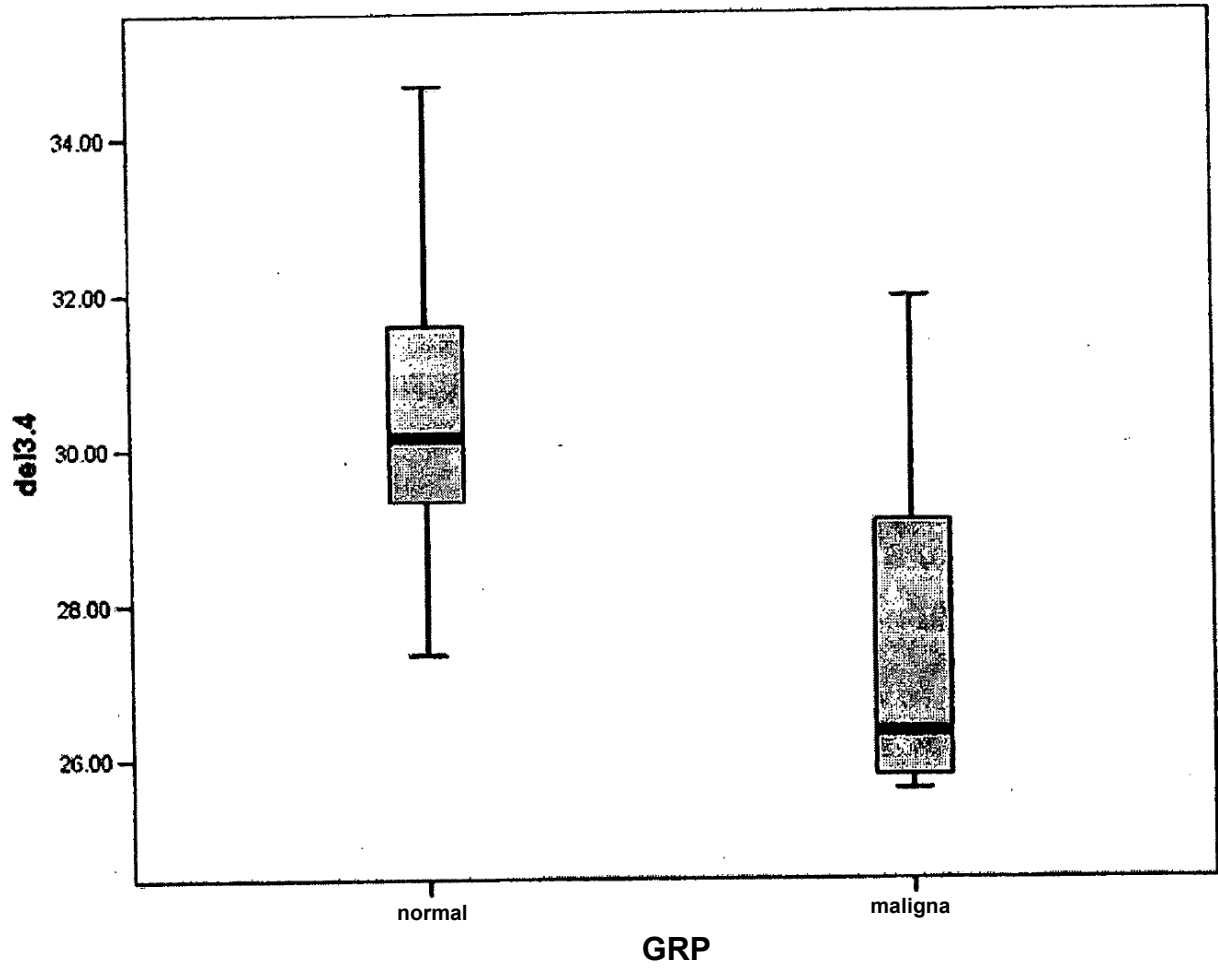




Figura 6



**Figura 7**

**Curva COR**

