

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 199**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2004 E 04713499 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 1594990**

54 Título: **Método de monitorización de la inestabilidad genómica utilizando microscopía y análisis 3D**

30 Prioridad:

21.02.2003 US 448545 P

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

20.04.2016

73 Titular/es:

**3D SIGNATURES INC. (100.0%)
175 Hargrave Street, Suite 211
Winnipeg, MB R3C 3R8, CA**

72 Inventor/es:

**MAI, SABINE;
CHUANG, TONY CHIH YUAN;
MOSHIR, SHARAREH;
GARINI, YUVAL y
VERMOLEN, BARTHOLOMEUS J.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 567 199 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

Método de monitorización de la inestabilidad genómica utilizando microscopía y análisis 3D

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para monitorización y determinación de la inestabilidad genómica de una célula, en particular para la detección, monitorización y diagnóstico de trastornos celulares proliferativos tales como cáncer. Adicionalmente, la invención se refiere al análisis tridimensional, y más específicamente a la caracterización de la organización de telómeros y cromosomas.

Antecedentes de la invención

10 Los telómeros son los extremos de los cromosomas. Por encapsulación de los cromosomas, los mismos son responsables de la integridad cromosómica para prevenir la inestabilidad genómica¹⁻³. Se han encontrado previamente telómeros en el borde nuclear⁴, en la periferia nuclear⁵, a lo largo de todo el núcleo⁶, en asociación no-Rabl⁷, y en asociación con el nucléolo⁸. Análogamente, la organización nuclear de los cromosomas se ha descrito como no-aleatoria⁹⁻¹³ o aleatoria¹⁴, basándose en obtención de imágenes bidimensionales (2D), reconstitución tridimensional (3D) y modelización matemática¹⁵. Territorios organizados de cromosomas individuales han sido observados en humanos¹⁰⁻¹³, pollos¹⁶ y plantas¹⁷. Una organización nuclear regular ha sido descrita también para replicación y transcripción¹⁸⁻²¹. Si bien todo esto apunta a una organización nuclear bien definida, estudios acerca de aberraciones inducidas por radiación han sugerido una organización cromosómica aleatoria¹⁴.

20 En la actualidad, existe conocimiento inexacto acerca de la organización 3D de cualesquiera telómeros o cromosomas en los núcleos de interfase de las células normales, inmortalizadas o tumorales. Sin embargo, este conocimiento es de importancia fundamental para la organización estructural y funcional del núcleo normal y para el enigma de la inestabilidad genómica en las células tumorales.

Sumario de la invención

25 Utilizando microscopía de desconvolución de alta resolución y obtención de imágenes, los presentes inventores han dilucidado la organización y localización tridimensional (3D) de telómeros y cromosomas en núcleos de interfase 3D de células normales, inmortalizadas y tumorales. Se establecido que, con independencia de especies y tipos de célula, los telómeros y cromosomas de los mamíferos están organizados dinámicamente y de modo no aleatorio en el núcleo 3D de las células normales. Por el contrario, los núcleos 3D de las células tumorales presentan un nuevo orden de organización de telómeros y cromosómica que incluye agregaciones de telómeros y, concomitantemente, posicionamiento alterado de telómeros y cromosomas. Esta organización de telómeros nuclear alterada permite reordenamientos cromosómicos. La organización precisa del genoma 3D o alteraciones de la misma refleja las diferencias en estabilidad frente a inestabilidad genómica de las células normales frente a las células de cáncer.

De acuerdo con esto, se describe en esta memoria un método de monitorización o detección de la inestabilidad genómica en una célula de test que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que comprende la célula de test,
- 35 (b) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D), y
- (c) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de inestabilidad genómica en la célula de test.

40 El método puede utilizarse para detectar o monitorizar enfermedad, exposición a radiación y ambiental, y reparación del DNA y respuesta en una célula. En particular, el método puede utilizarse para detectar, monitorizar o diagnosticar cáncer. Adicionalmente, el método puede utilizarse para monitorizar el tratamiento de una enfermedad, en particular tratamiento del cáncer.

45 Adicionalmente, se describe en esta memoria un método y sistema para caracterizar la organización 3D de telómeros y/o cromosomas. El sistema incluye un módulo de entrada para introducir datos de imagen de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas y un módulo característico para encontrar un parámetro de la organización 3D a partir del mismo.

50 Varios parámetros de este tipo pueden utilizarse para caracterizar la organización 3D de telómeros y/o cromosomas. Estos parámetros incluyen un conjunto de distancias de los telómeros y/o cromosomas a un plano más próximo, el valor medio de este conjunto y la desviación estándar de dicho conjunto. Otro parámetro implica la especificación de la forma geométrica que abarca mejor la organización de telómeros y/o cromosomas. El volumen, la intensidad y la forma de cada uno de los telómeros y/o cromosomas pueden utilizarse también para caracterizar la organización 3D.

Cada uno de estos parámetros para caracterizar la organización 3D de telómeros y/o cromosomas puede utilizarse

para varios propósitos, que incluyen monitorizar o detectar la inestabilidad genómica en una célula, monitorizar, detectar o diagnosticar una enfermedad, tal como cáncer, y monitorizar tratamientos de enfermedad, tales como el tratamiento del cáncer.

5 Otras características y ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir la descripción detallada que sigue. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la descripción, se dan únicamente a modo de ilustración.

La invención se define por las reivindicaciones 1-16.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 ilustra una placa en metafase preparada a partir de células hepáticas fetales aisladas directamente de embriones de ratón de 10 días de edad. Se prepararon e hibridaron cromosomas y extensiones en metafase con una sonda telomérica-PNA que estaba marcada con Cy3.

15 La Figura 2 describe el volumen abarcado por los telómeros en un núcleo de interfase como un elipsoide. En general, los ejes principales del elipsoide a lo largo de los ejes x' y' z' no coinciden con el plano de la platina y los ejes ópticos de xyz . Asimismo, en la mayoría de los casos los ejes x' y' del elipsoide son aproximadamente iguales, $a = b$. Por tanto, la ratio a/c es una buena medida del nivel de achatamiento del elipsoide y de la organización de telómeros en el interior del núcleo.

20 La Figura 3 ilustra la resolución de señal a ruido y espacial de los instrumentos utilizados por los inventores. La intensidad de fluorescencia en las medidas es brillante y significativamente mayor que el ruido de fondo (ratio típica de señal a ruido de 10:1 o mayor). Esta alta ratio de señal a ruido hace posible un análisis fiable de la posición y las intensidades de los telómeros. Se clasificó un par de telómeros de un núcleo de interfase a partir de un solo plano de la pila de ~80 secciones. **Arriba:** muestra un par de telómeros que están distanciados 1200 nm y pueden separarse fácilmente. **Abajo:** muestra un par de telómeros que están distanciados 400 nm. Los recuadros muestran la imagen real de los pares.

25 La Figura 4 ilustra la organización de telómeros en núcleos de interfase de células primarias de ratón y humanas. **4A.** Organización de telómeros en linfocitos primarios de ratón. **a-c** Localización de los telómeros en linfocitos **B** primarios esplénicos BALB/c mantenidos en presencia (**b**, **c**) o ausencia (**a**) de lipopolisacárido (LPS) durante **a** 0 horas, **b** 24 horas, **c** 69 horas. Como se indica, cada uno de los 5 paneles ilustra; una representación esquemática de la localización de los telómeros, seguida por la imagen 2D del núcleo de interfase y sus telómeros, seguida por la vista frontal 3D del núcleo con contratinción DAPI (azul) (dapi3DF), 3DF sin DAPI (3DF), y la vista lateral 3D de los telómeros en el interior del núcleo (3DS). Los telómeros están teñidos en rojo (sonda telomérica de PNA marcada con Cy3). En cada uno de los paneles, la localización de la interfase 3D de los telómeros puede visualizarse como films 3D (disponibles del Dr. Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, CancerCare Manitoba, University of Manitoba, 675 McDermot Ave., Winnipeg, Manitoba). Abreviaturas: 3DF significa vista frontal tridimensional, y 3DS significa vista lateral tridimensional. **4B.** Organización de telómeros en células humanas primarias. **a-c** Localización de telómeros en linfocitos humanos primarios estimulados con fitohemaglutinina (PHA) y en fibroblastos humanos primarios (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Como se indica, cada uno de los paneles muestra imágenes representativas en 2D, 3DFdapi, 3DF, y 3DS para telómeros descondensados (**a**), menos descondensados (**b**) y condensados (**c**) (rojo). Abreviaturas como en Fig. 4A. En cada uno de los paneles, la localización en interfase 3D de los telómeros puede visualizarse como films 3D (disponibles del Dr. Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, CancerCare Manitoba, University of Manitoba, 675 McDermot Ave., Winnipeg, Manitoba).

45 La Figura 5 ilustra la distribución de telómeros en el núcleo de interfase de tres células típicas clasificadas de la fase G0/G1 (fila superior), fase S (fila media) y fase G2 tardía (fila inferior). Cada distribución telomérica se muestra desde una vista superior (el plano XY) observada a lo largo del eje óptico Z (columna izquierda), desde una vista lateral (plano XZ) como se observa a lo largo del eje Y (columna central) y como una imagen 3D de los telómeros en un núcleo abierto (columna derecha). Cuando se muestran desde las vistas superior y lateral, los telómeros se presentan encima de la imagen proyectada del núcleo. Esta proyección demuestra la extensión de la cromatina (y por tanto de los cromosomas) y define el área y los límites del núcleo.

50 La Figura 6 ilustra fracciones de células en función del tiempo que muestra el TD (línea negra y círculos), entrando en mitosis (línea de guiones y cuadrados) y entrando en G1 (línea punteada y triángulos). El tiempo se mide desde que la población se cosechó después de ser clasificada. A partir del gráfico de barras puede observarse que la mayoría de las células (90%) forman un disco telomérico (TD) 3,5 horas después de la incorporación de BrdU. La fracción de células en metafase alcanza el máximo a las 7,5 horas (65%) y el número de células en interfase que no

55 tienen un TD (y se interpretan como estando en fase G1) alcanza el máximo después de 8,5 horas (57%). El aumento en el número de metafases a las 9,5 horas no puede explicarse y probablemente está dentro de los límites de los errores experimentales. Esto demuestra que se forma un TD en la fase G2 tardía. A medida que las células progresan desde G2 a M, los telómeros comienzan a dispersarse y la organización de telómeros en el TD ya no se observa. Al final de la fase M, los inventores comienzan a observar núcleos en conformación G1 de telómeros con

distribución amplia de los telómeros a todo lo largo de un núcleo más pequeño.

La Figura 7 ilustra la organización de telómeros en núcleos de interfase de linajes de células inmortalizadas y tumorales de ratón y humanas. Para ilustrar mejor la localización de los telómeros, los mismos se representan en el estado de disco telomérico (TD) (para detalles, véase el texto). Como se indica, los telómeros se muestran en 2D y 3DS. Abreviaturas como en la Fig. 4A. **a** linaje de linfocitos Pre-B de ratón inmortalizados con v-abl²⁶. **b** células BAF3 tetraploides de ratón inmortalizadas espontáneamente²⁷. **c** Organización telomérica en células HaCaT tetraploides inmortalizadas espontáneamente²⁵. **d** Organización telomérica en linajes de células tumorales humanas en Colon320DM²⁸ y **e** en SH-EP²⁹. Las agregaciones de telómeros y los discos distorsionados se indican por flechas.

La Figura 8 ilustra la organización de telómeros en núcleos de interfase de tumores de ratón y humanos. 8A. Organización de telómeros en células tumorales y de control de ratón. **a**. Esplenocitos normales y **b** plasmacitoma de ratón DCPC21³⁰. Los telómeros se muestran en 2D y 3D respectivamente; para abreviaturas, véase Fig. 4A. Las agregaciones de telómeros y los discos distorsionados se indican por flechas. 8B. Organización telomérica en tejidos humanos tumorales y de control. Los telómeros se muestran en 2D y 3D para **a** tejido epitelial de control, revisión y **b** imágenes de recuadro, y **c** tejido de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, revisión y **d** imágenes de recuadro. Las agregaciones de telómeros y los discos distorsionados se indican por flechas.

La Figura 9 ilustra la distribución de telómeros en núcleos de interfase de células de cáncer comparadas con una célula normal. Las imágenes se representan como se explica en la Figura 5. **Normal**: Un glóbulo rojo normal. **RAJI**: Un linaje de células de linfoma de Burkitt. **PCT**: Una célula de plasmacitoma primario de ratón. **HNSCC**: Un carcinoma primario humano de células escamosas de cabeza y cuello (fase IV). Se forman agregados de telómeros y el disco telomérico esta distorsionado.

La Figura 10 ilustra la organización de telómeros en núcleos de interfase de células de ratón y humanas normales, inmortalizadas y tumorales. Los telómeros se muestran en 2D y 3D, para abreviaturas véase la Figura 4A. Se muestran los tipos de células siguientes: **a** y **b** fibroblastos embrionarios de ratón; **c** fibroblasto; **d** fibroblasto humano primario VH; **e** linaje de células queratinocitos humanas HaCaT; **f**, linaje de células de neuroblastoma SH-EP; **g**, cáncer cervical; y **h**, linaje de células de linfoma de Burkitt RAJI.

La Figura 11 ilustra la organización de telómeros y cromosomas en núcleos de interfase 3D de ratón y humanos de células normales, inmortalizadas y tumorales. Abreviaturas como en Fig. 4A. **chr**: cromosomas, **t**: telómeros. **11A**. Organización de telómeros y cromosomas en núcleos 3D de ratón de células normales, inmortalizadas y tumorales. La tinción de los cromosomas se realizó con tinte del cromosoma 11, y las imágenes se adquirieron y analizaron en 2D y 3D para células primarias de bazo **a**, células Pre-B inmortalizadas con trisomía 11. **b**, y células tumorales (plasmacitoma DCPC21). **c** Adicionalmente, se visualizó el genoma entero después de SKY de ratón, mostrando la disposición de todos los cromosomas en el espacio nuclear 3D. Sin embargo, únicamente estaban disponibles filtros Cy3 y FITC para la desconvolución. **d** Muestra el mismo análisis realizado para el plasmacitoma DCPC21. Obsérvese el cambio en el espacio 3D ocupado por el cromosoma 11 en células Pre-B trisómicas para el cromosoma 11 y en plasmacitoma de ratón y un telómero desplazado (3DSt). La hibridación de los telómeros se realizó para las células idénticas y se muestra para cada una de las imágenes presentadas. **11B**. Organización de telómeros y cromosomas en núcleos humanos 3D de células normales y tumorales. La tinción de los cromosomas se realizó con cromosoma 1 (verde) y cromosoma 21 (rojo), y las imágenes se adquirieron y analizaron en 2D y 3D para linfocitos humanos primarios **a**, y para el linaje de carcinoma de colon humano Colo320DM **b**. Obsérvese que sólo se simplificaron 11 imágenes para 11A y todas imágenes daban resultados similares. Las flechas representan reordenamientos cromosómicos entre los cromosomas 1 y 21. La hibridación de los telómeros se realizó para las células idénticas y se muestra para cada una de las imágenes presentadas. Las agregaciones y discos distorsionados de los telómeros se indican por flechas.

La Figura 12 ilustra la organización de telómeros en núcleos de interfase bidimensionales y tridimensionales de linfocitos B de ratón primarios e inmortalizados. **a**: núcleo de linfocito BALB/c primario en fase G0/G1 del ciclo celular. La ratio *a/c* es 1. **b**: núcleo de linfocito Pre-B de ratón, inmortalizado y no tumorígeno en organización de telómeros de fase G1/S. La ratio *a/c* es 8,8. **c**: linfocito Pro-B de ratón Baf3 en organización de telómeros de fase G1/S, inmortalizado y no tumorígeno. La ratio *a/c* es: 5,5. 2D: análisis bidimensional de telómeros en el núcleo de interfase. 3DF: análisis tridimensional de los telómeros en el núcleo de interfase, vista frontal. 3DS: análisis tridimensional de los telómeros en el núcleo de interfase, vista lateral. Las hibridaciones de los telómeros y la formación de imágenes en 2D y 3D fueron como se reseña en esta memoria.

La Figura 13 ilustra la organización de telómeros y cromosomas en núcleos de interfase de linfocitos B de ratón (Pre-B) activados con MycER. Los núcleos idénticos se han sondado para cromosomas y telómeros. Los paneles de la izquierda muestran las imágenes bidimensionales (2D) de FISH con tinciones de cromosoma a las 0 horas, 72 horas, y 10 días. Azul: DAPI, rojo: cromosoma 11, verde: cromosoma 15. El segundo panel de la izquierda muestra la misma imagen después de análisis tridimensional (3D). El canal DAPI se ha desactivado a fin de visualizar las señales roja (cromosoma 11) y verde (cromosoma 15) dentro del núcleo. Obsérvese las firmas de color mixto de los cromosomas 11 y 15 a las 72 horas. Los dos paneles subsiguientes a la derecha muestran hibridaciones teloméricas en 2D y 3D respectivamente. 2D t: muestra las señales teloméricas (rojo) observadas en núcleos 2D a las 0 horas, 72 horas y 10 días. 3D t: muestra las señales teloméricas (rojo) observadas en núcleos 3D a las 0 horas,

72 horas y 10 días. Obsérvese los agregados teloméricos a las 72 horas. Se tuvieron resultados similares con células BAF3. 2D chr: imagen bidimensional de los cromosomas; 3D chr: imagen tridimensional de los cromosomas. 2D t: imagen bidimensional de telómeros; 3D t: imagen tridimensional de telómeros.

5 La Figura 14 ilustra la organización de telómeros en núcleos de interfase de linfocitos B de ratón activados con MycER (Pre-B). La medida de las señales teloméricas en los núcleos de interfase de linfocitos B de ratón activados con MycER (Pre-B) se representa en Fig. 13. Obsérvese el aumento en la intensidad normalizada a las 72 horas después de disregulación de c-Myc. Esto corresponde a la formación de agregados teloméricos. Este pico en la formación de agregados (véase también **Tabla 9**) es reversible después del cese de la disregulación de c-Myc. A los

10 10 días, el orden telomérico es casi idéntico al medido a las 0 horas. 0 horas: negro, 72 horas: gris oscuro, 10 días: gris. Las medidas se realizaron con un software nuevo que fue desarrollado por los presentes inventores.

La Figura 15 ilustra el análisis FACS de linfocitos Pro-B de ratón activados con MycER (BAF3). Las células se analizaron por FACS y la viabilidad del cultivo se evaluó a los 0, 1, y 3-10 días. El crecimiento de las células sub-G1 en los cultivos en ausencia o presencia de 4HT era idéntico.

15 La Figura 16 ilustra la organización de cromosomas y telómeros en plasmacitoma primario de ratón. Las imágenes 2D y 3D muestran la organización de los telómeros (t) y del cromosoma 11 (chr) en los núcleos de interfase (azul) de plasmacitoma primario de ratón y células B primarias de control. Panel a: células B primarias de ratón, panel b: células de plasmacitoma primario de ratón. Las abreviaturas son como se dan en Fig. 13.

20 La Figura 17 ilustra que la organización de telómeros en los núcleos de interfase se altera como resultado de exposición a radiación. **a**: organización de telómeros 3D en un linaje de linfocitos sin exposición a radiación. **b** y **c**: organización de telómeros 3D después de 12 y 24 horas de exposición a radiación (6Gy) respectivamente.

25 La Figura 18 ilustra imágenes bidimensionales y tridimensionales de núcleos de interfase de tejido mamario de control y cáncer de mama. Las reconstrucciones 3D para cada una de las pacientes se muestran en los paneles inferiores (3DR) (véase también la **Tabla 8**). Obsérvese que no existen agregaciones de telómeros en el tejido de mama normal. Los telómeros se muestran en rojo. Los núcleos se muestran en azul. Las imágenes 3D muestran únicamente telómeros. 3DF: vista tridimensional frontal; 3DS: vista tridimensional lateral. 3DR: reconstitución 3D por YG. Aumento de las imágenes 2D: 63x/1,4 aceite Planapo (Zeiss). Las imágenes 3D se obtuvieron como se ha descrito (Chuang et al. 2004).

La Figura 19 es un diagrama de bloques de un sistema para la caracterización de una organización 3D de telómeros y/o cromosomas en núcleos de interfase.

30 Las Figuras 20A y 20B muestran gráficas de intensidades de telómeros de núcleos de interfase que pueden utilizarse para caracterizar una organización 3D de telómeros.

Descripción detallada de invención

(i) Método de determinación de la inestabilidad genómica

35 Los datos presentados en esta memoria muestran que el proceso multietápico de transformación celular es un mecanismo que desencadena la reorganización de la composición ordenada de telómeros y cromosomas dentro del espacio nuclear 3D. Esto es debido a la disfunción de los telómeros asociada con el desarrollo tumoral y la inestabilidad genómica^{22,23}. La inestabilidad genómica es un proceso complejo por el cual el genoma de la célula afectada se hace propenso a la transformación y finalmente se transforma, e implica la reorganización genética del genoma celular. Como se establece en esta memoria, dicha reorganización genética se observa fácilmente en el

40 núcleo de interfase 3D, con indiferencia de la célula y el tipo de tumor. La misma es claramente visible cuando se analiza la organización de telómeros 3D. Además, la inestabilidad genómica se hace visible también cuando se examinan los territorios ocupados por cromosomas individuales y el alineamiento cromosómico a lo largo del disco telomérico (véase más adelante). El espacio intranuclear 3D y la organización de telómeros y cromosomas se anulan claramente en las células tumorales. En su lugar, se genera un orden nuevo de complejidad en donde se

45 hacen factibles los reordenamientos genéticos por la yuxtaposición ilegítima de material genético que se encuentra en caso contrario en diferentes regiones del núcleo. Así, basándose en los presentes hallazgos, es posible ahora examinar fiablemente la presencia o ausencia de inestabilidad genómica en núcleos de interfase y examinar la generación de inestabilidad genómica a lo largo del tiempo. Dichas nuevas rutas impactarán en la biología del cáncer, la genética y las innovaciones diagnósticas en medicina.

50 Los presentes inventores han utilizado microscopía de desconvolución de alta resolución y obtención de imágenes para elucidar la organización tridimensional (3D) de telómeros y cromosomas en los núcleos de interfase de células normales, inmortalizadas y tumorales. Se ha encontrado que los telómeros y cromosomas de las células tumorales forman una organización alterada, que ocupa un espacio 3D que difiere de sus homólogos normales.

55 Conforme a ello, se describe en esta memoria un método de monitorización o detección de inestabilidad genómica en una célula de test que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que comprende la célula de test;
- (b) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (c) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de inestabilidad genómica en la célula de test.

Como se utiliza en esta memoria, el término "célula" incluye más de una célula o una pluralidad de células o porciones de células. La muestra puede ser de cualquier animal, en particular de humanos, y puede ser fluidos biológicos (tales como sangre, suero, saliva o fluido cerebroespinal), tejido, pelo u órgano. Una ventaja del método es que puede utilizarse en el mismo un corte o sección muy delgado de un tejido (incluso más delgado que la anchura de una célula).

En algunas realizaciones, la "célula de test" es una célula que se sospecha padece un trastorno de proliferación celular tal como cáncer. En una realización de este tipo, la célula de test incluye, pero sin carácter limitante, una célula de cáncer. El término cáncer incluyen cualquier cáncer que incluye, sin limitación, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama (tal como carcinoma, ductal, lobular, y de pezón), cáncer de próstata, cáncer pulmonar no microcítico, linfoma No-Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, y leucemia mielógena crónica), cáncer de cerebro, neuroblastoma, sarcomas, cáncer de colon, plasmacitoma, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, linfoma, y tumores dependientes de cMyc. En una realización preferida, el cáncer incluye, sin limitación, cáncer de colon, neuroblastoma, plasmacitoma, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, linfoma, cáncer de mama y tumores dependientes de cMyc. Cuando se utilizan células de cáncer como la célula de test, la muestra puede ser cualquier muestra que contenga las células cancerosas tal como una biopsia del tumor o sangre.

Como se utiliza en esta memoria, el término "célula de control" se refiere a una célula normal sana.

El término "análisis tridimensional (3D)" como se utiliza en esta memoria se refiere a cualquier técnica que permita la visualización 3D de las células, por ejemplo microscopía de desconvolución de alta resolución. En una realización de la descripción, el análisis 3D se realiza utilizando el sistema descrito más adelante en esta memoria.

El término "organización de telómeros y/o cromosomas" como se utiliza en esta memoria se refiere a la disposición 3D de los telómeros y/o cromosomas durante cualquier fase de un ciclo celular, e incluye parámetros tales como tamaño del telómero y/o cromosoma, alineamiento, estado de agregación y tamaño del espacio 3D que ocupan los telómeros y/o cromosomas. "Organización telomérica" se refiere también al tamaño y la forma del disco telomérico que es la estructura organizada formada cuando los telómeros se condensan y alinean durante la fase G2 tardía del ciclo celular.

El "cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control" puede determinarse, por ejemplo, por conteo del número de telómeros en la célula, medición del tamaño de cualquier telómero o agregado de telómeros, o caracterización de la organización cromosómica 3D durante cualquier fase del ciclo celular. Si cualquier telómero en la célula de test es mayor (es decir forma más agregados), por ejemplo duplica el tamaño, de los de la célula de control, ello indica la presencia de inestabilidad genómica en la célula de test. Los telómeros en una célula de test con inestabilidad genómica pueden estar también fragmentados y aparecer por tanto más pequeños que los de la célula de control. En realizaciones adicionales, el cambio en la organización de los telómeros de la célula de test comparada con la célula de control se determina por monitorización del alineamiento de los telómeros en el disco telomérico durante la fase G2 tardía del ciclo celular así como el tamaño del disco telomérico durante la fase G2 tardía. Los telómeros en una célula con inestabilidad genómica no estarán alineados a la manera en la que lo están los de una célula de control, y por tanto el disco telomérico en las células con inestabilidad genómica estará distorsionado y ocupará un espacio mayor comparado con los controles. En otras realizaciones adicionales, un cambio en organización, posicionamiento o alineamiento de los cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de inestabilidad genómica en la célula de test. Por ejemplo, el entremezclado de material genético es indicativo de inestabilidad genómica. En otra realización, un cambio en la organización de telómeros y/o cromosómica en la célula de test comparada con la célula de control puede determinarse por comparación de los parámetros utilizados para caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas. En una realización adicional, tales parámetros se determinan u obtienen utilizando un sistema y/o método descrito más adelante en esta memoria.

Los resultados obtenidos en los presentes estudios demuestran que la inestabilidad genómica en una célula está correlacionada con enfermedad. En una realización, la presencia de inestabilidad genómica en una célula, como se determina utilizando el método de la presente invención, indica la presencia de un trastorno proliferativo celular en la célula. Por tanto, en una realización del método, la presencia de inestabilidad genómica en una célula es indicativa de un trastorno proliferativo celular. En particular, la presencia de inestabilidad genómica en una célula, como se determina utilizando el método descrito en esta memoria, indica que la célula es una célula de cáncer. Por

consiguiente, en una realización del método, la presencia de inestabilidad genómica en una célula es indicativa de cáncer.

Conforme a ello, la presente descripción incluye también el método de detección, monitorización de enfermedad en una célula de test que comprende:

- 5 (a) proporcionar una muestra que comprende la célula de test;
- (b) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (c) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de enfermedad la célula de test.
- 10

En una realización, la enfermedad es un trastorno celular proliferativo, por ejemplo, cáncer. El cáncer incluye cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, leucemia, sarcoma, melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer endometrial.

- 15 El método puede utilizarse también para monitorizar el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, muestras que comprenden una o más células de test de un paciente con un trastorno celular proliferativo pueden tomarse en diversos momentos, por ejemplo antes, durante y después de la quimio- u otras formas de terapia, y determinarse la presencia de inestabilidad genómica. La disminución de la inestabilidad genómica en las células de test a lo largo del tiempo sería indicativa de una terapia exitosa. Inversamente, un aumento en o la ausencia de cambio en la inestabilidad genómica de las células de test a lo largo del tiempo sería indicativo de terapia infructuosa.

- 20 Conforme a ello, la presente descripción se refiere adicionalmente a un método de monitorización del tratamiento de una enfermedad en una célula de test que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que comprende la célula de test;
- (b) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- 25 (c) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control está correlacionado con el tratamiento de la enfermedad en la célula de test.

Adicionalmente, el método puede utilizarse para monitorizar radiación, impacto ambiental, lesión y proteínas clave en la reparación del DNA en una célula.

- 30 Conforme a ello, se describe adicionalmente un método de monitorización de radiación, impacto ambiental, lesión y proteínas clave en la reparación del DNA en una célula de test que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que comprende la célula de test;
- (b) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- 35 (c) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control está correlacionado con radiación, impacto ambiental, lesión o reparación del DNA en la célula de test.

- 40 Como se utiliza en esta memoria, y como es bien entendido en la técnica, "tratamiento" es un enfoque para obtención de resultados beneficiosos o deseados, con inclusión de resultados clínicos. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero sin carácter limitante, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (parcial o total), sea detectable o indetectable.

- 45 "Tratamiento" puede significar también prolongación de la supervivencia comparada con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento.

"Paliación" de una enfermedad o trastorno significa que la extensión y/o las manifestaciones clínicas indeseables de un trastorno o un estado de enfermedad son menores y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o se prolonga, en comparación con la ausencia de tratamiento del trastorno.

- 50 Adicionalmente, la presente descripción se refiere a un método de monitorización o detección de inestabilidad genómica en una célula de test que comprende:

- (a) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (b) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de inestabilidad genómica en la célula de test.

5

La presente descripción incluye también el método de detección, monitorización de una enfermedad en una célula de test que comprende:

- (a) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (b) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de enfermedad en la célula de test.

10

La presente descripción se refiere adicionalmente a un método de monitorización del tratamiento de una enfermedad en la célula de test que comprende:

- (a) caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (b) comparar la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test con la de una célula de control, en donde un cambio en la organización de telómeros y/o cromosomas en la célula de test comparada con la célula de control está correlacionado con el tratamiento de la enfermedad en la célula de test.

15

20 (ii) *Sistema para caracterización de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas*

Se describen en esta memoria métodos y sistemas para caracterización de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas.

La Figura 19 muestra un diagrama de bloques de un sistema 100 para caracterización de una organización 3D de telómeros y/o cromosomas. El sistema 100 incluye un módulo de entrada 102, un procesador de datos de imagen 104, un optimizador 106 y un módulo característico 108.

25

El módulo de entrada 102 introduce datos de imagen de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas. El módulo de entrada 102 incluye hardware y/o software apropiados, tales como un CD-ROM y lector de CD-ROM, u otros medios de almacenamiento y lectura de los datos. La introducción realizada por el módulo de entrada 102 no precisa ser desde el exterior del sistema 100 al interior del sistema 100. En lugar de ello, en algunas realizaciones, la introducción de los datos puede describir la transferencia de datos desde un medio de almacenamiento permanente en el interior del sistema 100, tal como un disco duro del sistema 100, a un medio de almacenamiento volátil de sistema 100, tal como una RAM.

30

Los datos de imagen pueden obtenerse utilizando microscopía regular o confocal y pueden incluir las intensidades de uno o más colores en píxeles (totalizando, por ejemplo, 300×300 o 500×500) que comprenden una imagen de un núcleo. Los datos de imagen pueden ser también datos de imagen de nivel gris de un núcleo que ha sido teñido adecuadamente para resaltar los telómeros y/o cromosomas. Se obtienen varias imágenes (del orden de 100) correspondientes a cortes a lo largo de un eje particular. Así, los datos de imagen pueden corresponder a un total de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ píxeles. En una realización, los cortes pueden estar distanciados del orden de 100 nm. Adicionalmente, el microscopio confocal es capaz de obtener la intensidad de dos colores, por ejemplo azul y verde, del núcleo para cada píxel convertido en imagen, duplicando con ello la cantidad de puntos de datos.

35

40

Para obtener una imagen de telómeros y/o cromosomas, puede utilizarse un tinte tal como DAPI para marcar preferentemente el material de heterocromatina que comprende DNA. Un segundo tinte, tal como cy3, junto con un marcador apropiado, tal como una sonda telomérica de PNA, puede utilizarse para marcar la porción telomérica del material de heterocromatina.

45

Para mejorar la calidad de los datos de imagen, pueden ponerse en práctica diversas técnicas conocidas por quienes poseen experiencia ordinaria tales como desconvolución iterativa restringida de los datos de imagen para mejorar la resolución. Dicha desconvolución iterativa restringida puede no ser necesaria si se utiliza microscopía confocal en lugar de la regular, dado que los datos de imagen pueden ser de resolución superior. Adicionalmente, pueden utilizarse otros instrumentos, tales como un apotomo para mejorar la calidad de la imagen.

50

El procesador de datos de imagen 104 procesa los datos de imagen para encontrar un conjunto de coordenadas $\{(x_i, y_i, z_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde (x_i, y_i, z_i) es una posición del telómero i -ésimo. Para este propósito, el procesador de datos de imagen 104 identifica manchas ("blobs") en los datos de imagen que pueden identificarse como un telómero y/o cromosoma utilizando un proceso de segmentación. Cada blob identificado como un telómero y/o

cromosoma tiene un volumen no despreciable (por ejemplo, un telómero pequeño puede tener un volumen de $4 \times 4 \times 4$ píxeles, y uno grande un volumen de $10 \times 10 \times 10$, donde el tamaño del núcleo puede ser aproximadamente $200 \times 200 \times 100$ píxeles). Por consiguiente, existe cierta libertad en la elección de "la posición" del telómero y/o cromosoma. Una posibilidad es elegir para esta posición el centro de gravedad del telómero y/o cromosoma, o más generalmente, la organización del telómero y/o cromosoma.

5 El optimizador 106 encuentra un plano F^{\min} que está más próximo al conjunto de coordenadas. Para encontrar el plano más próximo, se considera la distancia D_i entre la localización de telómero i -ésimo, (x_i, y_i, z_i) , y el plano dado por $ax + by + cz = 0$:

$$D_i = \frac{ax_i + by_i + cz_i}{\sqrt{a^2 + b^2 + c^2}}$$

$$\sum_{i=1}^N D_i(a, b, c, d)$$

10 El optimizador 106 encuentra los parámetros a, b, c, d que minimizan la función

El módulo característico 108 prosigue para encontrar al menos un parámetro que puede utilizarse para caracterizar la organización 3D de telómeros y/o cromosomas. "Parámetros utilizados para caracterizar la organización de telómeros y/o cromosomas" incluyen:

1) Un conjunto de distancias $\{d_i\}$, $i = 1, \dots, N$, donde d_i es la distancia entre (x_i, y_i, z_i) , y el plano F^m .

15 2) d y σ , la distancia media y la desviación estándar del conjunto de distancias $\{d_i\}$:

$$\bar{d} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i, \quad y$$

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(d_i - \bar{d})^2}{N}$$

, respectivamente.

3) Una forma geométrica tridimensional que abarca mejor la organización 3D. Por ejemplo, la forma geométrica puede el elipsoide, que tiene ejes principales a_1, a_2 , y a_3 , que abarca mejor la organización 3D de los telómeros y/o cromosomas. Pueden utilizarse varias definiciones de "abarca mejor". Por ejemplo, el elipsoide que abarca mejor los telómeros puede definirse como el elipsoide de volumen mínimo que encierra una cierta fracción (v.g., 100%) de los telómeros. Si un conjunto de más de un elipsoide satisface esta condición, pueden utilizarse otras restricciones para reducir el conjunto a un solo elipsoide, exigiendo por ejemplo adicionalmente que el elipsoide tenga la ratio mínima mayor de los ejes principales (es decir, el elipsoide "más circular"). Debe entenderse que pueden utilizarse otras definiciones de "abarca mejor" los telómeros y/o cromosomas.

20

25

Se ha observado que el elipsoide que abarca mejor los telómeros se aproxima en muchos casos a un esferoide achatado con a_1 aproximadamente igual a a_2 . En tal caso, es suficiente especificar sólo a_2 y a_3 . Alternativamente, puede utilizarse una ratio de achatamiento a_3/a_1 o a_1/a_3 para caracterizar el esferoide achatado que describe la organización de los telómeros.

30 4) Un conjunto de volúmenes $\{V_i\}$, donde V_i es el volumen del telómero i -ésimo.

5) Un conjunto de tres dimensiones $\{(Dx_i, Dy_i, Dz_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde (Dx_i, Dy_i, Dz_i) son los ejes principales de un elipsoide que describe el telómero i -ésimo

6) un conjunto de intensidades $\{I_i\}$, $i = 1, \dots, N$, donde I_i es la intensidad total del telómero i -ésimo. (En otras realizaciones, en lugar de la intensidad total, puede computarse la intensidad media de cada telómero.) Es decir, si el telómero i -ésimo está asociado con K píxeles, entonces

35

$$I_i = \sum_{j=1}^K I_{i,j}$$

donde $I_{i,j}$ es la intensidad del píxel j -ésimo del telómero i -ésimo.

La Figura 20A muestra una gráfica de i , donde i denota el telómero i -ésimo, frente a I_i , donde la ordenación de los telómeros, de izquierda a derecha, es desde la intensidad total mínima a la intensidad total máxima. La Figura 20B

muestra una gráfica similar excepto que el eje vertical es I_i dividido por la intensidad total media a lo largo de un conjunto de células muestra.

En los tres últimos casos, los conjuntos pueden utilizarse para calcular medidas estadísticas tales como una media, una mediana o una desviación estándar.

5 Los parámetros 1-5 arriba reseñados caracterizan la organización 3D de los telómeros y/o cromosomas poniendo el foco en la estructura geométrica de los telómeros y/o cromosomas. Los parámetros 1 y 2 están motivados por el hallazgo de que, especialmente durante la fase G2 tardía del ciclo celular, los telómeros tienden a estar situados en un plano. Los parámetros 1 y 2 miden desviaciones de los telómeros respecto a una disposición plana.

10 El parámetro 3 intenta describir, con rasgos, tales como los tres ejes principales de un elipsoide o la ratio de achatamiento, la forma global de la organización 3D. Mientras que los parámetros 1-3 son características geométricas globales, que guardan relación con la forma global de la organización, los parámetros 4 y 5 son características geométricas locales el sentido de que implican la geometría de cada telómero individual.

El parámetro final es también local, implicando la intensidad de cada telómero individual.

15 Como se ha expuesto anteriormente, las caracterizaciones de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas pueden utilizarse para varios propósitos. Por ejemplo, por comparación de un parámetro con un valor estándar, pueden monitorizarse o diagnosticarse enfermedades, como se ha descrito arriba. Los valores estándar (de control) pueden proceder de estudios de población, de modelos teóricos, o de la caracterización de células de control. Adicionalmente, las caracterizaciones de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas pueden utilizarse para monitorizar o detectar inestabilidad genómica en una célula.

20 Los ejemplos no limitantes siguientes son ilustrativos de la presente invención:

Ejemplos

Ejemplo 1: Organización 3D de telómeros y cromosomas en el núcleo de las células de mamífero

Métodos

Células

25 La Tabla 1 resume las células que se utilizaron en este estudio. Se aislaron directamente células primarias de ratón de ratones BALB/c. Se obtuvieron células primarias humanas a partir de donantes sanos. Los linajes de células y las condiciones de cultivo se describen en otro lugar (HaCaT²⁵, Pre-B²⁶, BAF3²⁷, Colo320DM²⁸, SH-EP²⁹). El plasmacitoma primario DCPC21 se aisló de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello de ratón BALB/c³⁰. Se obtuvo un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y tejido de control de un paciente en CancerCare Manitoba bajo aprobación ética y consentimiento informado.

30 *Técnicas de fijación.*

Las células se fijaron de cuatro maneras: i) después de preparaciones Citospín, las células se fijaron en formaldehído al 3,7% (1 x PBS/MgCl₂ 50 mM), ii) se dejó que las células crecieran en portaobjetos de vidrio y se fijaron en formaldehído al 3,7%, iii) se dejó que las células crecieran en suspensión con formaldehído al 3,7%, y iv) se fijaron las células en metanol:ácido acético (3:1) conforme a protocolos estándar³¹. El tejido se fijó después de criosección (se utilizaron secciones de 5 mm) en formaldehído al 3,7% (1 x PBS/MgCl₂ 50 mM).

35 *Análisis con el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).*

Para el análisis FACS, se fijaron linfocitos primarios en etanol al 70% y se tiñeron con yoduro de propidio (1 µg/ml) después de digestión con RNAsa (20 µg/ml). Los perfiles FACS se obtuvieron a las 0, 24, 48, y 69 horas después de la estimulación.

40 *Clasificación de las células.*

Las células se tiñeron con Hoechst 33.342 (Molecular Probes) a una concentración final de 1 µg/ml durante 90 minutos a 37° y 5% de CO₂. Las células se clasificaron conforme a su contenido de DNA (G0/G1, fases S y G2 tardía).

45 *Marcación con BrdU.*

Las células se marcaron in vivo con 10 µM de BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina, SIGMA ALDRICH, Lyon, Francia) durante 1 hora a 37 °C en atmósfera humidificada (5% CO₂). Se detectó luego la BrdU con 5 µl/1x10⁶ células de anticuerpo anti-BrdU-FITC (TEBU, Le Perray-en-Yvelines, Francia) en las mismas condiciones durante 30 minutos. Después de ello, todas las células BrdU (es decir FITC)-positivas se clasificaron in vivo, se dejaron en cultivo durante tiempos diferentes y se cosecharon al cabo de 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 8,5, 9 y 10 horas después de marcación y

50

clasificación. A continuación, las células se fijaron para análisis 3D. Se obtuvo la imagen de un mínimo de 20 núcleos, los cuales se analizaron para cada momento. Se midió la fracción de núcleos con un TD, tanto en los núcleos que se encontraban en mitosis como en los de interfase sin TD y figuras mitóticas que se evaluaron como células en fase G1 y fase S.

- 5 FISH de los telómeros utilizando sondas teloméricas de PNA marcadas con Cy3 (DAKO, Dinamarca).

Se realizó la FISH de los telómeros como se ha descrito³² utilizando una sonda telomérica de PNA marcada con Cy3 (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Las hibridaciones de los telómeros eran específicas, como se demostró por hibridaciones en metafase y el número correcto de las señales teloméricas observadas en los extremos de los cromosomas preparadas a partir de células primarias (Figura 1).

- 10 Tinción cromosómica y cariotipado espectral.

La tinción de los cromosomas se llevó a cabo de acuerdo con protocolos estándar³¹ utilizando una tinción de cromosoma 11 de CedarLane (Hornby, ON, Canadá), y tinciones de los cromosomas 1 y 21 de MetaSystems Group Inc. (Boston, MA, USA). El cariotipado espectral se realizó como se ha descrito³⁰ utilizando el kit SKY de ratón de Applied Spectral Imaging Inc. (Carlsbad, CA, USA).

- 15 Adquisición de imágenes y análisis 3D.

Si no se indica otra cosa, se analizaron un mínimo de 20 células y un máximo de 30 células por obtención de imágenes 3D utilizando Axioplan 2 (Zeiss) con fluorescencia de 100W, una AxioCam HR B&W enfriada con adaptador 1x (Zeiss). Se utilizaron DAPI, FITC y filtros Cy3 (Zeiss) en combinación con aceite Planapo 63x/1.4 (Zeiss). Se utilizaron software Axiovision 3.1 con módulo de desconvolución y módulo de conversión ("rendering module") (Zeiss). Se adquirieron 80 y 160 secciones a 100 y 200 nm respectivamente. Se empleó la opción de algoritmo iterativo restringido³³ y las superficies se convirtieron en los ejes x,z y x,y. El volumen nuclear total (esfera) se calculó utilizando la fórmula siguiente $v = (4\pi/3)r^3 = (\pi/6)d^3$. El volumen del segmento de la esfera nuclear 3D se calculó utilizando la fórmula siguiente: $v = (\pi/6)(3r_1^2 + 3r_2^2 + h^2)h$, con radio de la esfera: r, radios de las bases: r₁, r₂, altura: h, volumen: v, diámetro: d.

- 25 Organización de los telómeros en el núcleo 3D.

Para análisis cuantitativo de la organización de los telómeros en el interior del núcleo, era conveniente describir el volumen ocupado por los telómeros como un elipsoide (3 ejes principales diferentes, Figura 2) pero se encontró que las organizaciones eran, casi sin excepción, achatadas o esféricas (es decir, los 2 ejes principales a lo largo del plano principal x' y' del esferoide son similares). El volumen puede describirse convenientemente como un elipsoide que tiene dos ejes de longitud igual³⁴. Por consiguiente, es más sencillo describir el grado de variación del esferoide respecto a una esfera perfecta por la ratio a/c, donde a = b son los semiejes similares y c es el tercer eje. Dicha descripción refleja el grado en el que está achatado el volumen del telómero. Como ejemplo, una esfera perfecta tendrá una ratio a/c = 1, mientras que un volumen achatado tendrá una ratio de a/c >1. El plano x' y' del esferoide no debería ser necesariamente paralelo al plano de la platina del microscopio (descrito por xy), especialmente en aquellos casos en que se analizan secciones de tejido.

Resultados

Resolución.

- 40 La resolución óptica y la ratio de señal a ruido (SNR) se muestran en la Figura 3A. Las imágenes de dos telómeros vecinos que están distanciados 1200 nm y 400 nm y la intensidad correspondiente a lo largo de la línea que conecta el par indica la distancia telomérica más pequeña que puede distinguirse todavía inequívocamente. Esta resolución óptica es suficientemente buena para estudiar la organización nuclear de los telómeros, incluso si son indistinguibles los telómeros próximos.

Tipos de células.

- 45 Los hallazgos para células primarias (Fig. 1), células inmortalizadas (Fig. 2), y células y tejido tumorales (Figs. 3 y 4) se resumen a continuación. Para todos los datos, se utilizó desconvolución iterativa restringida de imágenes fluorescentes adquiridas en secciones de 200 nm a lo largo de todo el núcleo. Se examinaron tipos de células y tejido diferentes originarios de ratón y humanos (Tabla 1). Fig. 1, con un modelo simplificado de localización dinámica de los telómeros, ilustra los datos para linfocitos primarios de ratón y humanos en ambos formatos 2D y 3D. Las imágenes 3D se presentan desde la vista frontal tridimensional (3DF) y la vista lateral tridimensional (3DS).
50 Se obtuvieron films 3D que ilustran adicionalmente los hallazgos 3D. Los films 3D están disponibles fácilmente a solicitud del Dr. Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, CancerCare Manitoba, University of Manitoba, 675 McDermot Ave., Winnipeg, Manitoba).

La organización de telómeros y el ciclo celular.

Como se muestra en Figs. 4A y B, la organización de telómeros es un proceso dinámico dependiente del ciclo celular. El análisis 2D utilizado comúnmente no permite una localización precisa de los telómeros en los núcleos de interfase. En contraste, el análisis 3D define su localización nuclear exacta. Los datos 3D demuestran que los telómeros están sumamente ordenados en el espacio nuclear de las células primarias. En reposo, linfocitos primarios de ratón y humanos no sometidos a ciclo (G0/G1) los telómeros están descondensados. En este momento, el segmento de la esfera nuclear que ocupan los telómeros se halla consistentemente dentro de una región nuclear de 680 nm^3 en un volumen nuclear total de 905 nm^3 (Fig. 4A, panel a, y en films 3D). Los telómeros se condensan con anterioridad a la fase G2 tardía y se localizan entonces en un volumen de 410 nm^3 (Fig. 4A, panel b, y en films 3D). Los telómeros están totalmente condensados en la fase G2 tardía y se alinean con precisión, formando una estructura organizada que ha sido designada como el disco telomérico (TD) (Fig. 4A, panel c, y en films 3D). En el TD, los telómeros están distribuidos uniformemente en todo el disco. El TD ocupa un volumen de 190 nm^3 del espacio nuclear central (Fig. 4A, panel c, y en films 3D). Resultados similares en cuanto a la organización telomérica se registraron en linfocitos humanos primarios (Fig. 4B), fibroblastos humanos primarios (datos no presentados), y en tejido epitelial humano normal (Fig. 5B, paneles a y b). En suma, este proceso dinámico de organización de telómeros se encuentra en el espacio nuclear 3D de tipos y especies celulares diferentes y por tanto parece ser la regla común que gobierna la dinámica de la organización nuclear durante el ciclo celular normal.

Un parámetro específico del método es la ratio a/c , que describe el nivel hasta el cual está achatado el volumen ocupado por los telómeros. Cuanto mayor es ésta, tanto más achatada (o discoidal) es la forma del volumen ocupado por los telómeros, mientras que $a/c = 1$ significa que este volumen es esférico.

Al analizar linfocitos primarios de ratón clasificados del ciclo celular, los inventores encontraron que la organización 3D de los telómeros cambia durante el ciclo celular. Los telómeros están distribuidos ampliamente por todo el núcleo en las fases G0/G1 y S, con una ratio a/c calculada de $0,9 \pm 0,4$, lo que significa un volumen semejante a una esfera. Sin embargo, durante G2, no se observan telómeros a lo largo de todo el núcleo. Su organización 3D cambia, asumiendo todos los telómeros una estructura central que se denomina aquí disco telomérico (TD). Este disco no ha sido consignado nunca con anterioridad. En esta estructura ordenada, todos los telómeros están alineados en el centro del núcleo a medida que las células progresan a la fase G2 tardía. La ratio a/c que asumen las mismas es $6,0 \pm 2,0$.

Células típicas de fases diferentes se muestran en la Figura 5. La ratio a/c de estas células en las fases G0/G1, S y G2 tardía es 0,8, 0,8 y 6 respectivamente, y muestra con claridad la correlación de la ratio a/c con la distribución de los telómeros y la organización del TD que se han encontrado en la fase G2. El alargamiento de los telómeros a lo largo del eje Z con relación al plano XY tiene la misma ratio que la función de dispersión de punto del sistema presente y por consiguiente es resultado de la resolución óptica más pobre a lo largo del eje óptico. Sin embargo, esto tiene un efecto muy pequeño en cuanto a la forma del núcleo entero.

Para estudiar adicionalmente la temporización de la transición de fase a lo largo del ciclo celular, se utilizó el método de clasificación sincrónico con BrdU. La Figura 6B muestra las fracciones celulares en función del tiempo. La mayoría de las células (90%) forman un TD 3,5 horas después de la incorporación de BrdU. La fracción de células en metafase alcanza el máximo a las 7,5 horas (65%) y la fracción celular de células en interfase que no tienen un TD (y se interpretan como en fase G1) es máxima a las 8,5 horas (57%).

Organización telomérica en células inmortalizadas y células tumorales.

Se abordó a continuación la cuestión de si esta organización 3D estaba presente o no en las células inmortalizadas no tumorígenas. Se observó que la organización de telómeros de las células normales se mantiene en las células inmortalizadas diploides, como se documenta en la posición 3DS que ilustra óptimamente la organización de los telómeros (Fig. 7a). Sin embargo, existen alteraciones consistentes de la organización de telómeros en líneas de células tetraploides inmortalizadas de ratón y humanas (Fig. 7b, Fig. 10 y datos no presentados). Tales células tetraploides presentan un disco telomérico doble, constituido por dos TDs individuales, con telómeros que se descondensan o se condensan sincrónicamente en el espacio 3D del núcleo.

En contraste con los datos anteriores, se encuentra una nueva organización de telómeros compleja en los linajes de células tumorales (Fig. 7c y d, y Fig. 10). Y lo que es más importante, esta nueva organización de telómeros no es un artefacto del cultivo de tejidos, sino que es intrínseca a las células tumorales, como se demuestra en Fig. 8, panel b, y Fig. 8B, paneles c y d, flechas. Linajes de células de carcinoma de colon y neuroblastoma (Fig. 7c y d, y Fig. 10) así como el plasmacitoma primario de ratón y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano (fase IV) (Fig. 8A y B, y Fig. 10) muestran una reorganización similar del espacio nuclear 3D. Todas las células tumorales exhiben grandes agregados o agregaciones de telómeros de diversos niveles de complejidad, por lo que los telómeros no logran alinearse adecuadamente en el TD (Figs. 7 y 8). Esta alteración estructural coincide con la distorsión del TD (Figs. 7 y 8). Además, los telómeros agregados o fusionados sobresalen fuera del espacio TD, aumentando así considerablemente el espacio TD (Figs. 7 y 8, véanse recuadros y flechas). Adicionalmente, es llamativo que los telómeros individuales no agregados o fusionados no se integran tampoco adecuadamente en el TD (Figs. 7 y 8). El nuevo TD de las células tumorales está alargado irregularmente de 2 a 4 veces, con variaciones

de tamaño de célula tumoral a célula tumoral que reflejan la naturaleza policlonal de la inestabilidad genómica progresiva. En contraste, los esplenocitos primarios de control de ratón y el tejido epitelial humano de control, tomado este último a 2 cm de distancia del tumor primario, revelan la estructura regular y organizada de los telómeros (Fig. 8A, panel a, y Fig. 8B, paneles a y b, y Fig. 10). En conclusión, los telómeros de las células tumorales forman una organización de telómeros alterada, que ocupa un espacio 3D que difiere de sus homólogos normales.

Se observó la distribución de los telómeros en otras células cancerosas. Imágenes típicas construidas a partir de núcleos normales (Figuras 9 y 10) y de un linaje de células de linfoma de Burkitt (Figuras 9 y 10, Raji) así como de plasmacitoma primario de ratón y carcinoma primario de células escamosas de cabeza y cuello humano (fase IV) (Figuras 9 y 10, PCT y HNSCC) muestran que los telómeros forman agregados y por tanto un TD parcialmente alterado. Tales agregados teloméricos se caracterizan a la vez por un volumen mayor y una intensidad integrada mayor que sus homólogos normales no solapantes y no agregados. Los mismos no se observan en las células normales. Resultados similares en cuanto a organización de telómeros alterada se encontraron también en linajes de células tumorales humanas de neuroblastoma y carcinoma de colon.

Las Tablas 2 a 8 muestran el número de agregados y el número de telómeros en dirección en controles normales, linajes de células inmortalizadas, linajes de células de cáncer y muestras de cáncer.

Organización cromosómica

Estos datos incitaron a los inventores a examinar si los agregados o agregaciones de los telómeros y el alineamiento distorsionado de los telómeros están asociados con cambios en la organización cromosómica dentro del núcleo 3D idéntico. Consistentemente con la localización ordenada de los telómeros en las células primarias humanas y de ratón, los cromosomas presentan una localización ordenada en el espacio nuclear 3D (Fig. 11A, panel a y Fig. 11B, panel a). Ambos cromosomas 11 de ratón se ven consistentemente en dos territorios distintos en las células normales y alineadas adecuadamente en el TD (Fig. 11A, panel a). Sorprendentemente, el TD se mantiene en las células B de ratón con trisomía 11 inmortalizadas (Fig. 11A, panel b). Aunque el cromosoma 11 adicional ocupa un espacio intranuclear 3D distinto que difiere de la organización del cromosoma 11 en las células diploides (Fig. 11A, panel a), los telómeros y cromosomas de estas células se alinean perfectamente a lo largo del TD (Figs. 11A, panel b). Así, el espacio nuclear de la interfase 3D parece tolerar un cromosoma adicional por alineamiento del mismo lo largo del TD. De hecho, utilizando cariotipado espectral de ratón para las mismas células, se encontró que todos los cromosomas están alineados adecuadamente a lo largo del TD (Fig. 11A, panel c). Se examinó a continuación la organización 3D del cromosoma 11 en las células tumorales de ratón. Como se ilustra en Fig. 11A (panel d), el orden de posicionamiento del cromosoma 11 está alterado. Los cromosomas 11 están dispersados ampliamente a lo largo del espacio 3D del núcleo (Fig. 11A, panel b, cromosomas (chr) 3DF). Concomitantemente, los cromosomas 11 están también alineados inadecuadamente a lo largo del TD (Fig. 11A, panel d, chr 3DS). Asimismo, este TD muestra agregaciones o agregados teloméricos, y un telómero no está integrado en el TD (Fig. 11A, panel d, telómeros 3DS (t) (flecha)).

Basándose en estos hallazgos, se estudió el posicionamiento 3D de 2 cromosomas en el espacio intranuclear 3D. Se investigó la localización de los cromosomas 1 (verde) y 21 (rojo) en células humanas primarias y tumorales (Fig. 11B). Existe una organización espacial clara de los cromosomas 1 y 21 en las células primarias humanas. Ambos cromosomas ocupan territorios distintos y se alinean adecuadamente a lo largo del disco telomérico (Fig. 11B, panel a, chr 3DF y chr 3DS). Significativamente, como se resalta en las células humanas de cáncer de colon, este orden está alterado en las células tumorales humanas (Fig. 11B, panel b). Los cromosomas 1 y 21 han dejado sus distintos territorios de tal modo que estos dos cromosomas se encuentran en proximidad estrecha ilegítima uno a otro. Se observó que su material genético está entremezclado, como resulta evidente por las firmas de color mixtas de ambos cromosomas (Fig. 11B, panel b, chr 3DF y chr 3DS). Así, parece ser que las células tumorales pueden reorganizar fácilmente sus genomas por intercambio de material genético a medida que sus telómeros se agregan y los cromosomas alteran sus posiciones 3D. Esta es la primera vez que los reordenamientos cromosómicos y teloméricos pueden ligarse estructuralmente unos a otros en el compartimiento 3D del núcleo.

Ejemplo 2: Las disregulaciones c-Myc alteran la organización 3D de telómeros y cromosomas del núcleo de interfase.

50 Métodos

Células

Linajes de células, condiciones de cultivo, e inducción de c-Myc para las células Pre-B y BAF3 se han descrito en otro lugar (BAF3²⁷, Pre-B²⁸). El plasmacitoma primario DCPC21 se aisló de un ratón BALB/c³⁰. Se recogieron plasmacitomas inducidos por v-abl/myc a partir de ratones BALB/c. MycER se activó como se ha descrito anteriormente^{27,28}.

FISH de los telómeros.

Células BAF3, Pre-B y de plasmacitoma se fijaron en suspensión con formaldehído al 3,7% (fijación 3D). La FISH de

los telómeros se realizó como se ha descrito³² utilizando una sonda telomérica de PNA marcada con Cy3 (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Las hibridaciones de los telómeros eran específicas, como se muestra por hibridaciones en metafase y el número correcto de las señales teloméricas observadas en los extremos de los cromosomas preparados a partir de células primarias.

5 *Tinción cromosómica.*

La tinción de los cromosomas se realizó conforme a protocolos estándar³¹ utilizando tinciones de un cromosoma 11 (Cy3) y 15 (FITC) de ratón de CedarLane (Hornby, ON, Canadá).

Cariotipado espectral (SKY)

10 Se llevó a cabo el cariotipado espectral (SKY) de ratón como se ha descrito³⁰. Se realizó el SKY a lo largo de un periodo de 10 días. Los valores significativos para los reordenamientos cromosómicos por cromosoma individual se indican con activación de Myc así como sin activación de Myc. La media total de cromosomas, así como los números de cada uno de los cromosomas específicos observados para las células de control y las activadas en Myc se compararon a lo largo del tiempo por análisis de la varianza de 2 vías. Para otras aberraciones cromosómicas, tales como agregaciones, translocaciones y deleciones, las incidencias comunes (como mínimo 10%) en 15 cromosomas específicos se compararon también para ambos grupos de células a lo largo del tiempo con el análisis estratificado de Mantel-Haenzsel.

Adquisición de imágenes 3D.

20 Se analizaron un mínimo de 20 y un máximo de 30 núcleos por obtención de imágenes 3D utilizando Axioplan 2 (Zeiss) con fluorescencia de 100W, una AxioCam HR B&W enfriada con adaptador 1x (Zeiss). Se utilizaron DAPI, FITC y filtros Cy3 (Zeiss) en combinación con aceite Planapo 63x/1.4 (Zeiss). Se utilizaron software Axiovision 3.1 con módulo de desconvolución y módulo de conversión ("rendering module") (Zeiss). Se adquirieron 80-100 secciones para cada fluorocromo a 100 y 200 nm respectivamente. Se empleó la opción de algoritmo iterativo restringido y las superficies se convirtieron en los ejes x,z y x,y.

Análisis 3D de los telómeros.

25 Para definir los parámetros teloméricos y la distribución de los telómeros dentro del volumen del núcleo, se desarrolló un programa de análisis de imágenes 3D especial. El programa segmenta el núcleo, recuenta los telómeros y analiza el tamaño, la forma y la intensidad de cada uno. Finalmente, se analizó la distribución de telómeros en el interior del núcleo. Ello comparaba el volumen del núcleo propiamente dicho (calculado a partir de la imagen DAPI 3D) con el volumen y la forma del volumen que estaba ocupado por los telómeros.

30 Resultados

Territorios teloméricos distintos y no solapantes en células B normales e inmortalizadas no tumorigénicas.

35 En el presente estudio, los inventores examinaron si la disregulación del oncogén c-Myc afectaba a la organización 3D de los telómeros en el núcleo de interfase. A este fin, se examinó el efecto de una activación transitoria de c-Myc utilizando 2 linajes independientes de células inmortalizadas BAF3³⁷ y Pre-B²⁸ transfectadas de manera estable con MycER^{TM35}. Adicionalmente, se estudió un modelo de tumorigénesis en ratones dependiente de c-Myc, el plasmacitoma (PCT) de ratón³⁶. El primer paso de este estudio fue el análisis de la organización nuclear 3D de telómeros en las células BAF3 y Pre-B no activadas con MycER, así como en linfocitos B primarios BALB/c que servían como control para todas las PCT de ratón BALB/c.

40 Los telómeros de las células B BALB/c primarias exhibían territorios teloméricos (TTs) no solapantes como se determinó por análisis de imágenes 3D y matemático (Fig. 12, panel a). En ausencia de activación de MycERTM, tanto los núcleos de interfase pre- B como BAF3 exhibían también TTs distintos y no solapantes (Fig. 12, paneles b y c) indistinguibles de los TTs de los núcleos de células B primarias de ratón. Esto permitió el estudio de los efectos de la activación regulable de Myc sobre la organización de telómeros 3D.

Disrupción dependiente de c-Myc de la organización nuclear 3D de los territorios teloméricos.

45 Para testar el impacto potencial de c-Myc's sobre la organización nuclear telomérica 3D, se analizó el efecto de una activación transitoria de c-Myc sobre la organización de telómeros 3D de núcleos de interfase BAF3 y Pre-B. Después de una activación transitoria de MycER con 4-hidroxi-tamoxifeno (4HT), ambos linajes de células exhibían alteraciones en su organización de telómeros formando agregados teloméricos (Tablas 9 y 10, Fig. 13 y 14). Los agregados teloméricos aparecen tan pronto como 24 horas después de la activación de c-Myc. El número de 50 agregaciones teloméricas alcanzaba el máximo a las 72 horas con significación estadística máxima ($p = 0,0012$; Tablas 9 y 10, Fig. 13 y 14).

c-Myc remodela transitoriamente la organización nuclear 3D de los telómeros.

Después que disminuyeron los efectos de una disregulación transitoria de c-Myc, dentro de un periodo de 6 a 10

días, se observó la reorganización de los TTs hacia su configuración telomérica 3D aparentemente normal que no exhibía TTs solapantes ni agregados teloméricos (Tablas 9 y 10, Fig. 13, panel c, t 3d). Fig. 14 resume gráficamente estos hallazgos. Estos datos indican que los telómeros pueden alterar su organización y formar agregados transitoriamente y de una manera dependiente de c-Myc. Y lo que es más importante, la inversión del orden telomérico a un estado casi original no se debía a detención del crecimiento o a muerte celular, como se confirmó por citometría de flujo (Fig. 15). Por tanto, parece ser que la carencia de la disregulación de c-Myc permite un restablecimiento de una organización de telómeros 3D sin TTs agregados. Se deduce que la disregulación de c-Myc puede desencadenar transitoriamente la organización aberrante del espacio telomérico 3D.

Disminución dependiente de c-Myc de la organización nuclear 3D de los territorios cromosómicos (CTs).

10 Dado que los datos demostraban que la disregulación de c-Myc remodela la organización de telómeros intranuclear 3D, se examinó luego la organización de CTs. Los inventores analizaron si la formación de TTS compartidos dependiente de c-Myc estaba asociada con cambios en la organización cromosómica dentro de los núcleos 3D. A este fin, células Pre-B activadas con MycER se hibridaron con dos tinciones de cromosomas para el cromosoma 11 (rojo) y 15 (verde) implicados en la mayoría de los casos en la oncogénesis de linajes de células B dependiente de c-Myc^{36,37}.

15 La organización 3D de cromosomas y telómeros se estudió a lo largo de un transcurso de tiempo de 10 días, de una manera dependiente de c-Myc (Fig. 13 y 14). A las 0 horas, los cromosomas 11 y 15 se encontraban en sus CTs no solapantes respectivos (Fig. 13, panel a, chr (cromosomas) 3D). Análogamente, los telómeros de células inmortalizadas no exhibían solapamientos o alteraciones (Fig. 13, panel a, t 3D). A las 72 horas después de la disregulación de Myc, se observaron los cromosomas 11 y 15 en territorios alterados en los cuales aquéllos compartían territorios ilegítimos solapantes como se documentaba por las firmas de color mixtas que representaban estos dos cromosomas (Fig. 13, panel b, chr 3D). Como se ilustra en un ejemplo representativo, el núcleo 3D idéntico exhibía agregaciones teloméricas dentro del mismo espacio 3D que abarca los cromosomas 11 y 15 en territorios alterados (Fig. 13, panel b, t 3D). El día 10, ambos cromosomas 11 y 15 y las organizaciones teloméricas asumían espacios nucleares 3D desprovistos de CTs y TTs compartidos (Fig. 13, panel c). Así pues, una disregulación transitoria de c-Myc conduce a remodelación reversible tanto de CTs como de TTs.

El cariotipado espectral confirma las reordenamientos cromosómicos y la remodelación del núcleo de interfase 3D.

20 Se examinó luego una visión global de reordenamientos cromosómicos en células BAF3 y Pre-B activadas con MycERTM a lo largo de un período de 10 días. Se activó MycER por 4HT³⁰ una sola vez, y se cosecharon las células al cabo de 0, 24, 48, 72 horas, y 10 días. Utilizando cariotipado espectral (SKY) que permite la visualización simultánea de todos los cromosomas en una sola metafase, se encontraron un aumento de aberraciones cromosómicas durante 72 horas, y una disminución durante 10 días. Por ejemplo, el 60% de las metafases exhibían aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas claras a las 72 horas, y estos números disminuían hasta 43% a los 10 días, como se calculó a partir de 20 metafases por punto temporal. En cuanto al cromosoma 15, el mismo se reordenaba de modo no aleatorio a lo largo del tiempo y en función de la disregulación de c-Myc ($p = 0,001$, Tabla 11). Se observaron también cambios numéricos para este cromosoma. Ocurrían aberraciones numéricas y estructurales del cromosoma 11, pero no eran estadísticamente significativas (Tabla 11). A partir de los datos de SKY anteriores, se demostró que tanto los datos de interfase 3D como SKY 2D siguen una tendencia similar: ambos conjuntos de experimentos se complementan uno a otro y confirman que la disregulación de c-Myc induce reordenaciones cromosómicas. Además, las alteraciones nucleares 3D de las posiciones de telómeros y cromosomas observadas aquí por primera vez como resultado de la disregulación de c-Myc reflejan inestabilidad cromosómica como se documentó por SKY.

Organización 3D aberrante de telómeros y cromosomas en plasmacitomas primarios.

45 Utilizando tumores primarios de ratón con sobreexpresión de c-Myc, se examinó luego la existencia de aberraciones de la organización nuclear 3D dependientes de c-Myc de TTs y CTs in vivo. El plasmacitoma de ratón (PCT) en donde c-Myc está activado constitutivamente por translocación cromosómica o extracromosómica a uno de los loci de inmunoglobulina fue el modelo in vivo utilizado^{36,30}. Los PCTs inducidos por myc viral no transportan estas translocaciones porque myc está activado ya constitutivamente debido a la sobreexpresión de myc activada viralmente³⁷.

50 Se analizaron PCTs primarios de BALB/c por obtención de imágenes 3D, y se examinó la organización de telómeros de núcleos de interfase PCT. Sirvieron como control linfocitos BALB/c primarios (Fig. 12, panel a, Fig. 16, panel a). El espacio intranuclear 3D de los núcleos PCT exhibía un orden telomérico aberrante, en el que los telómeros formaban agregaciones y por tanto TDs parcialmente alterados (Fig. 16, panel b, flechas). Esto demostraba que se observa consistentemente una organización nuclear 3D aberrante de los telómeros en los PCTs primarios, pero está ausente en las células B normales.

55 Para examinar alteraciones 3D potenciales en los CTs de los mismos PCTs primarios, se eligió el cromosoma 11 de ratón, dado que éste constituye la aberración cromosómica más frecuente en los PCTs inducidos por v-abl/myc³⁷. Cuando se comparaba con la organización de los territorios del cromosoma 11 en linfocitos BALB/c normales, la

organización 3D de los cromosomas 11 en los PCTs primarios de ratón^{36,37} estaba alterada (Fig. 16 a y b). Como se ilustra en Fig. 16, panel b, un PCT representativo con trisomía 11 exhibía posicionamiento alterado de un cromosoma 11 así como agregaciones teloméricas. En contraste, los cromosomas 11 exhibían una localización ordenada en el espacio nuclear 3D de las células B primarias (Fig. 16).

- 5 Estos datos confirman alteraciones en CTs y TTs cuando c-Myc está disregulado en los tumores primarios. Por primera vez, los reordenamientos cromosómicos y teloméricos están enlazados estructuralmente unos a otros en el compartimiento 3D del núcleo, de una manera dependiente de c-Myc.

Ejemplo 3: Dosimetría biológica

- 10 La dosimetría biológica está basada en investigaciones de efectos biológicos inducidos (biomarcadores) que están correlacionados con la dosis de radiación. En particular, el registro de aberraciones cromosómicas inducidas de los linfocitos periféricos ha evolucionado en una herramienta dosimétrica valiosa en protección radiológica. Los biomarcadores pueden definirse como puntos finales biológicos (tales como cambios celulares y moleculares) utilizados para indicar una exposición a radiación ionizante (IR), representando un evento precoz que ocurre como resultado de la interacción de la IR con los tejidos vivos. Los inventores han demostrado que la irradiación gamma altera la organización 3D de los telómeros dentro de periodos de tiempo cortos (12 horas) (Fig. 17).

Ejemplo 4: Organización telomérica en tejido de cáncer de mama.

- 20 Se compararon las agregaciones teloméricas en seis pacientes de cáncer de mama coincidentes en edad y grado, siendo todas ellas de grado 3. Fig. 18 es un resultado representativo para las pacientes de cáncer de mama. Fig. 18 y Tabla 8 muestran que existe una diferencia significativa en los volúmenes teloméricos y las agregaciones teloméricas 3D entre las células de cáncer de mama y los controles.

En experimentos ulteriores, se ha demostrado también que la ausencia de reparación del genoma coincide con alteraciones en el disco.

Los estudios anteriores muestran que:

- 25 - los estados de estrés en la célula quedan potencialmente como resultado malignidad conducen también a agregaciones de los telómeros;
- la disregulación de un solo oncogén puede conducir a iniciación de malignidad y conduce también a agregaciones de los telómeros;
- en las lesiones preneoplásticas (plasmacitoma de ratón, día 14 y 19) se presentan agregaciones de los telómeros; y se encuentran en lesiones cervicales neoplásticas precoces;
- 30 - las agregaciones de los telómeros representa inestabilidad genómica en una etapa muy precoz; y
- el estudio del plasmacitoma de ratón c-myc demuestra que las aberraciones de telómeros y cromosomas ocurren también in vivo.

- 35 Donde se encuentra en la presente solicitud que un término se define de modo diferente en un documento citado en esta memoria por referencia, la definición proporcionada en esta memoria debe servir como definición para el término.

Citas completas de las referencias mencionadas en la memoria descriptiva

1. Hackett JA and Greider CW. Balancing instability: dual roles for telomerase
5 and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* **21**, 619-26
(2002).
2. Harrington L and Robinson MO. Telomere dysfunction: multiple paths to the
same end. *Oncogene* **21**, 592-7 (2002).
3. Maser RS and DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer.
10 *Science* **297**, 565-569 (2002).
4. Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke EK, Sperling K, Teuber V, Zorn
C. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in
Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and
laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet.* **60**, 46-56 (1982).
- 15 5. Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhorn R, Bradbury
EM. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus.
Chromosoma **103**, 577-90 (1995).
6. Vourc'h C, Taruscio D, Boyle AL, Ward DC. Cell cycle-dependent
20 distribution of telomeres, centromeres and chromosome-specific
subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes.
Exp Cell Res **205**, 142-151 (1993).
7. Cerda MC, Berrios S, Fernandez-Donoso R, Garagna S, Redi C.
Organisation of complex nuclear domains in somatic mouse cells.
Biology of the Cell **91**, 55-65 (1999).
- 25 8. Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH. Nucleolus-associated telomere
clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in
Arabidopsis thaliana. *J Cell Science* **114**, 4207-4217 (2001).
9. Rabl C. Über Zellteilung. *Morphologisches Jahrbuch* Gegenbaur C (ed) **10**,
214-330 (1885).
- 30 10. Tanabe H, Muller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, Cremer M,
Solovei I, Cremer C, Cremer T. Evolutionary conservation of

- chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4424-9 (2002).
11. Cremer M, von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, Fischer C, Solovei I, Cremer C, Cremer T. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res.* **9**, 541-67 (2001).
- 5
12. Popp S, Scholl HP, Loos P, Jauch A, Stelzer E, Cremer C, Cremer T. Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Exp Cell Res.* **189**, 1-12
- 10 (1990).
13. Ferguson M and Ward DC. Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* **101**, 557-565 (1992).
14. Holley WR, Mian IS, Park SJ, Rydberg B, Chatterjee A. A Model for Interphase Chromosomes and Evaluation of Radiation-Induced Aberrations. *Radiat Res.* **158**, 568-580 (2002).
- 15
15. Parada LA and Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends in Cell Biology* **12**, 425-432 (2002).
16. Haberman FA, Cremer M, Kreth WJ, von Hase J, Bauer K, Wienberg J, Cremer C, Cremer T, Solovei I. Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res* **9**, 569-84 (2001).
- 20
17. Haaf T and Ward DC. Rabl orientation of CENP-B box sequences in *Tupaia belangeri* fibroblasts. *Cytogenet Cell Genet* **70**, 258-62 (1995).
- 25
18. Hozak P, Jackson DA, Cook PR. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Science* **107**, 2191-2202 (1994).
19. Jackson DA and Cook PR. Replication occurs at a nucleoskeleton. *The EMBO J* **5**, 1403-1410 (1986).
- 30
20. Getzenberg RH, Pienta KJ, Ward WS, Coffey DS. Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J Cell Biochem.* **47**, 289-99 (1991).

21. Bradbury EM. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* **14**, 9-16 (1992).
22. Artandi SE, Chang S, Lee S-L, Alson S, Gootlieb G, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**, 641- 645 (2000).
5
23. O'Hagan RC, Chang S, Maser RS, Mohan R, Artandi SE, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. *Cancer Cell* **2**, 149-155 (2002).
24. Pienta KJ, Partin AW, Coffey DS. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res.* **49**, 2525-2532
10 (1989).
25. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* **106**, 761-71 (1988).
- 15 26. Mai S, Hanley-Hyde J, Rainey GJ, Kuschak TI, Paul JT, Littlewood TD, Mischak H, Stevens LM, Henderson DW, Mushinski JF. Chromosomal and extrachromosomal instability of the cyclin D2 gene is induced by Myc overexpression. *Neoplasia* **1**, 241-52 (1999).
27. Fest T, Mougey V, Dalstein V, Hagerty M, Milette D, Silva S, Mai S. c-MYC overexpression in Ba/F3 cells simultaneously elicits genomic instability and apoptosis. *Oncogene* **21**, 2981-90 (2002).
20
28. Mai S, Hanley-Hyde J, Fluri M. c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene* **12**, 277-88 (1996).
- 25 29. Baker DL, Reddy UR, Pleasure D, Thorpe CL, Evans AE, Cohen PS, Ross AH. Analysis of nerve growth factor receptor expression in human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cancer Res.* **49**, 4142-6 (1989).
- 30 30. Wiener F, Kuschak TI, Ohno S, Mai S. Deregulated expression of c-Myc in a translocation-negative plasmacytoma on extrachromosomal elements that carry IgH myc genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13967-72 (1999).

31. Beatty B, Mai S, Squire J. (Eds) FISH: A practical Approach. Oxford University Press (2002).
32. Figueroa R, Lindenmaier H, Hergenhausen M, Nielsen KV, Boukamp P. Telomere erosion varies during in vitro aging of normal human fibroblasts from young and adult donors. *Cancer Res.* **60**, 2770-4 (2000).
- 5
33. Schaeffer LH, Schuster D, Herz H. Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J. Microscopy* **204**, 99-107. 2001.
- 10
34. Tietze, H. Famous problems of mathematics: solved and unsolved mathematics problems from antiquity to modern times. New York: Graylock Press, pp.28 and 40-41 (1965).
35. Littlewood, TD et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 1686-90.
- 15
36. Potter, M. et al. (1992) *Carcinogenesis* **13**, 1681-97.
37. Weiner, F. et al. (1995) *Cancer Res.* **55**, 1181-8.

Tabla 1

Tipo de célula	Nombre	Especie	Características de las células
linfocito	SPL (bazo)	Ratón, BALB/c	Primaria, diploide
Linfocito PreB	Pre-B	Ratón, BALB/c	Linaje de células, cuasi-diploide
Linfocito Pro B	BAF3	Ratón, BALB/c	Linaje de células, cuasi-tetraploide
Plasmacitoma	DCPC21	Ratón, BALB/c	Tumor primario, cuasi-tetraploide
Plasmacitoma	<i>v-abl/myc 1</i>	Ratón, BALB/c	Tumor primario, trisomía 11
Plasmacitoma	<i>v-abl/myc 2</i>	Ratón, BALB/c	Tumor primario, diploide
Linfocito	Hu Ly	Humano	Primaria, diploide
Fibroblasto	GL85/89W	Humano	Primaria, diploide
Fibroblasto	VH	Humano	Primaria, diploide
Queratinocito	HaCaT	Humano	Linaje de células, cuasi-tetraploide
Carcinoma de colon	Colo320HSR	Humano	Linaje de células tumorales, aneuploide
Neuroblastoma	SH-EP	Humano	Linaje de células tumorales, aneuploide
Tejido epitelial	cRTL/HNSCC (tejido de control)	Humano	Tejido epitelial primario, control para HNSCC
Tejido de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	HNSCC	Humano	Tejido tumoral primario
Biopsias cervicales (tejidos)	Biopsias cervicales	Humano	Tejido primario
Tejido de cáncer de mama		Humano	Tejido primario
-Linfoma de Burkitt	Raji	Humano	Linaje de células tumorales

Células analizadas en este estudio. Sumario de las células primarias, inmortalizadas y tumorales, su designación, tiempo de célula y origen de la especie. Referencias a las condiciones de cultivo se dan en Métodos. La estimulación de los linfocitos primarios de ratón y humanos se realizó con lipopolisacárido (LPS) (100 mg/mL) y con fitohemaglutinina (PHA) (10 mg/mL) respectivamente. Secciones congeladas de 5 mm de tejidos de carcinoma primario epitelial humano y de células escamosas de cabeza y cuello se realizaron utilizando Microm HM 560.

ES 2 567 199 T3

Tabla 2

FOCO 1919 (14 DÍAS)				
ÁREA	# CÉLULAS ANALIZADAS	# TOTAL DE AGREGADOS TELOMÉRICOS	# TOTAL DE TRANSLOCACIONES	HISTOLOGÍA
1	85	12	0	Hiperplasia Difusa de Células Plasmáticas
2	95	19	0	Agregados de Células Plasmáticas (Manchas Lechosas)
3	62	7	2	Agregados de Células Plasmáticas (Manchas Lechosas)
4	119	18	4	Agregados de Células Plasmáticas (Manchas Lechosas)
5	168	14	11	Agregados de Células Plasmáticas (Manchas Lechosas)
	TOTAL: 529	TOTAL: 70	TOTAL: 17	

FOCO 1937 (19 DÍAS)				
ÁREA	# CÉLULAS ANALIZADAS	# TOTAL DE AGREGADOS TELOMÉRICOS	# TOTAL DE TRANSLOCACIONES	HISTOLOGÍA
1	Autofluorescencia–No Analizada			
2	123	1	2	Foco Típico de Células Plasmáticas
3	219	16	3	Agregados de Pequeños Linfocitos Asociados con Acumulaciones de Células Plasmáticas
4	247	26	0	Agregados de Pequeños Linfocitos Asociados con Acumulaciones de Células Plasmáticas
5	112	25	0	Agregados de Pequeños Linfocitos Asociados con Acumulaciones de Células Plasmáticas
	TOTAL: 701	TOTAL: 68	TOTAL: 5	Agregados de Pequeños Linfocitos Asociados con Acumulaciones de Células Plasmáticas

ES 2 567 199 T3

Continuación de la Tabla 2

FOCO 1938 (19 DÍAS)				
ÁREA	# CÉLULAS ANALIZADAS	# TOTAL DE AGREGADOS TELOMÉRICOS	# TOTAL DE TRANSLOCACIONES	HISTOLOGÍA
1	31	0	25	Focos plasmacitóticos
2				
3	122	1	0	Focos plasmacitóticos
4	165	0	0	Focos plasmacitóticos
5	114	6	10	Focos plasmacitóticos
6	39	2	13	Focos plasmacitóticos
	TOTAL: 471	TOTAL: 9	TOTAL: 48	

Valor p de los agregados teloméricos: 0,8031

Valor p de las células en división: 0,0077

Valor p de las translocaciones: 0,0102

Diferencias Inter-Ratones en los Agregados Teloméricos

	1919	1937	1938
1919		0,5664	0,9799
1937	0,5664		0,5806
1938	0,9799	0,5806	

Diferencias Inter-ratones en las Células en División

	1919	1937	1938
1919		0,0082	0,7857
1937	0,0082		0,007
1938	0,7857	0,007	

Diferencias Inter-ratones en las Translocaciones

	1919	1937	1938
1919		0,355	0,0083
1937	0,355		0,0061
1938	0,0083	0,0061	

Tabla 3

Cáncer de Colon Humano: Telómeros				
Paciente#	Imagen#	Agregados#	Telómeros en división#	Disco
Colo 320 HSR	1	4	2	Sí
	2	5	1	Sí
	3	5	1	No
	4	3	1	No
	5	2	1	Sí
	6	1	1	Sí
	7	2	2	Sí
	8	3	0	No
	9	5	2	No
	10	3	1	No
	11	7	1	Sí
	12	8	1	No
	13	5	3	Sí
	14	5	2	No
	15	3	3	No
	16	2	1	No
	17	4	2	Sí
	18	4	0	No
	19	3	2	Sí
	20	4	2	Sí
	21	5	1	Sí
	Total	# Total de agregados	# Total de telómeros en división	Disco
	21	83	30	11
		100% de las células tienen agregados (21/21)	90,48% de las células tienen telómeros en división (19/21)	
Cáncer de Colon Humano: Cromosoma de la célula Colo con Chr1:Chr2				
Paciente#	Imagen #	Huella de cromosoma mixta		
Colo 320 HSR	1	No		
	2	Sí		
	3	Sí		
	4	Sí		
	5	Sí		
	6	Sí		
	7	Sí		
	8	Sí		
	9	Sí		
	10	Sí		
	11	Sí		
	12	Sí		
	13	Sí		
	14	Sí		
	15	Sí		

Tabla 4

Shep-cito-telo			
Imagen #	# Agregado(s)	# Telómero(s) en División	Disco
1	2	2	No
2	1	0	Sí
3	3	1	Sí
4	4	1	No
5	3	2	No
6	5	2	Sí
7	2	5	Sí
8	0	0	No
9	1	1	Sí
10	3	2	Sí
11	1	0	Sí
12	1	0	No
13	1	0	Sí
14	2	1	Sí
15	3	1	Sí
16	2	0	No
17	1	0	Sí
18	1	3	No
19	1	1	No
20	0	0	No
Total	# Total de agregados	# Total de telómeros en división	Disco
20	37	22	11
	90% de las células tienen agregados (18/20)	60% de las células tienen telómeros (12/20)	

Tabla 5

Diagnóstico: HNSCC					
Imagen #	# Células/imagen	# Células con agregado	# Agregados/célula	# Agregados/	# Telómeros
2	1	0	Sin agregados	0	0
3	1	0	Sin agregados	0	0
4	1	0	Sin agregados	0	1
5	1	2	1 célula con 2 agregados	4	2
6	2	1	1 célula con 1 agregado	1	1
7	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
8	0	0	Sin agregados	0	1
9	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
10	1	0	Sin agregados	0	0
11	1	1	1 célula con 2 agregados	2	4
12	1	0	Sin agregados	0	1
13	1	0	Sin agregados	0	2
14	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
15	1	0	Sin agregados	0	1
16	2	1	1 célula con 1 agregado	1	4
17	1	0	Sin agregados	0	1
18	1	0	Sin agregados	0	3
19	1	0	Sin agregados	0	0
20	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
21	1	0	Sin agregados	0	0
22	2	0	Sin agregados	0	1
23	4	1	1 célula con 1 agregado	1	3
24	1	0	Sin agregados	0	1

Continuación de Tabla 5

Diagnosis: HNSCC					
Imagen #	# Células/imagen	# Células con agregado	# Agregados/célula	# Agregados/imagen	# Telómer en divisi
25	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
26	2	1	1 célula con 1 agregado	1	2
27	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
28	1	1	1 célula con 1 agregado	1	0
29	1	0	Sin agregados	0	1
31	1	1	1 célula con 2 agregados	2	0
1	1	0	Sin agregados	0	2
2	1	1	1 célula con 4 agregados	4	1
3	2	1	1 célula con 1 agregado	1	1
5	1	0	Sin agregados	0	5
7	1	1	1 célula con 1 agregado	1	1
9	2	1	1 célula con 1 agregado	1	2
10	2	1	1 célula con 1	1	1
11	1	0	Sin agregados	0	6
12	1	0	Sin agregados	0	2
13	1	1	1 célula con 1 agregado	1	3
14	1	1	1 célula con 1 agregado	1	5
15	1	0	Sin agregados	0	2
16	1	2	1 célula con 2 agregados	4	2
17	1	0	Sin agregados	0	2
18	1	0	Sin agregados	0	0
19	1	0	Sin agregados	0	0
20	1	1	1 célula con 1 agregado	1	0

ES 2 567 199 T3

Continuación de Tabla 5

-	# Total de células	# Total de células con agregado	# Total de agregados		# Total de telómeros en división
	55	25	18 células con 1 agregado		70
			6 células con 2 agregados		
			1 célula con 4 agregados		
		45,45% células con agregado			

Tabla 6

RAJI			
Imagen #	# agregados	# telómeros en división	Disco
1	1 agregado gigante	3	Número de telómeros demasiado bajo
2	1	5	No
3	2	4	No
4	1	5	No
5	0	1	No
6	0	0	No
7	1	0	No
8	0	5	No
9	1	1	No
10	1	2	No
11	0	3	No
12	1 agregado grande	0	Número de telómeros demasiado bajo
13	0	4	No
14	1	2	No
15	0	2	No
16	2	0	No
17	1	2	No
18	3 agregados grandes	0	No
19	2	3	No
20	2	7	No
21	0	8	No
22	1	1	No
23	1	2	No
24	0	4	No
25	3	1	No
26	7	3	No

ES 2 567 199 T3

27	2	3	No
28	1	4	No
29	0	3	No
30	2	2	No
31	1	8	No
32	1	1	No
33	1	1	No
34	2	2	No
35	1	3	No
Total	# Total de agregados	# Total de telómeros en división	Disco
35	43	95	-
	74,29% de las células tienen agregados (26/35)	85,71% de las células tienen telómeros en división (30/35)	

Tabla 7

Paciente 2087-03 (Gradación de Displasia Cervical: CIN III, Carcinoma In Situ)						
Imagen#	#Células/ imagen	#Células con agregado	#Agregados/ célula	#Agregados/ Imagen	# Telómeros en división	Disco
1	2	1	1 célula con 1 agregado	1	1	No
2	3	0	Sin agregados	0	3	No
3	1	1	1 célula con 1 agregado	1	3	No
4	1	0	Sin agregados	0	2	No
5	7	0	Sin agregados	0	4	No
6	3	0	Sin agregados	0	3	No
7	4	1	1 célula con 1 agregado	1	4	No
8	1	1	1 célula con 2 agregados	2	2	No
	# Total de células	# Total de células con agregados	# Total de agregados		# Total de telómeros en división	# Total de Disco
	22	4	tres células con 1 agregado		22	-
			1 célula con 2 agregados			
		13,79% células con agregados				

Tabla 8

	# de Células Analizado	# de Células con TA	# de TA por Célula
Control			
Paciente 1	33	0	0
Paciente 2	27	0	0
Cáncer de Mama			
Paciente 1	492	134 (27,2%)	78 células con 1 TA
			3tres células con 2 TA
			1tres células con 3 TA
			7 células con 4 TA
			tres células con 6 TA
Paciente 2	257	72(28,0%)	57 células con 1 TA
			8 células con 2 TA
			4 células con 3 TA
			1 célula con 4 TA
			2 células con 5 TA
Paciente 3	388	27 (6,7%)	26 células con 1 TA
			1 célula con 2 TA
Paciente 4	72	55 (76,4%)	55 células con 1 TA
Paciente 5	398	132 (33,2%)	129 células con 1 TA
			tres células comparten 1 TA
Paciente 6	62	49 (79,0%)	2x2 células comparten 1 TA
			2xtres células comparten 1 TA
			2x4 células comparten 1 TA
			1x5 células comparten 1 TA

Tabla 9

Tiempo	-4HT			+4HT			Valor p
	# de núcleos con agregaciones teloméricas	# de núcleos con agregaciones teloméricas simples	# de núcleos con agregaciones teloméricas múltiples	# de núcleos con agregaciones teloméricas	# de núcleos con agregaciones teloméricas simples	# de núcleos con agregaciones teloméricas múltiples	
0 horas	2/21 (9,5%)	2	0	2/21 (9,5%)	2	0	0,8839
24 horas	2/20 (10%)	2	0	6/23 (26,1%)	4	2	0,1607
48 horas	0/20 (0%)	0	0	6/122 (28,5%)	4	2	0,0129
72 horas	0/14 (0%)	0	0	8/14 (57,1)	4	4	0,0012
6 días	1/14 (7,1%)	1	0	4/19 (21,1%)	2	2	0,229
10 días	0/20 (0%)	0	0	1/21 (4,8%)	1	0	0,407

ES 2 567 199 T3

Tabla 10

Chro11 telo-v-alb-myc PCT			
Imagen #	# Agregado(s)	# Telómero(s) en división	Disco
2	11	1	Sí
3	4	3	Sí
4	2	2	Sí
5	8	2	Sí
6	4	3	Sí
7	7	2	Sí
8	10	2	No
9	9	2	Sí
10	4	3	Sí
11	5	1	No
12	8	3	Sí
13	7	3	Sí
14	8	1	Sí
15	5	2	Disco distorsionado
16	5	2	Disco distorsionado
17	5	2	Disco distorsionado
18	4	3	Sí
19	6	1	Sí
20	5	1	Sí
21	5	2	Sí
Total	# Total de agregados	# Total de telómeros en división	Disco
20	122	41	18
	100% de las células tienen agregados (20/20)	100% de las células tienen telómeros en división (20/20)	

Tabla 11

Cromosoma	+4HT/-4HT	[t]	Ambos
1			
2		0,015	<0,001
3			
4		0,015	
5	0,001		
6			
7		0,0063	
8		0,0003	
9			
10	0,018		
11			
12			
13	0,011	0,0118	
14		0,0001	0,0094
15		0,001	
16			
17		0,0156	
18		0,0284	0,0349
19			
X			
Y			0,014

REIVINDICACIONES

1. Un método de monitorización o detección de cáncer en una célula de test obtenida de una muestra que comprende la célula de test, comprendiendo el método:

- 5 (a) caracterizar la organización de telómeros 3D en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (b) comparar la organización de telómeros 3D en la célula del test con la de una célula de control no cancerosa, en donde un cambio en la organización de telómeros 3D en la célula de test comparada con la célula de control indica la presencia de cáncer en la célula de test,

donde la caracterización de la organización de telómeros 3D comprende al menos uno de:

- 10 A.
 - (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de los telómeros;
 - (ii) procesar los datos de imagen para encontrar un conjunto de coordenadas $\{(x_i, y_i, z_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, en donde (x_i, y_i, z_i) es una posición del telómero y/o cromosoma i-ésimo;
 - (iii) encontrar un plano que está más próximo al conjunto de coordenadas; y
 - 15 (iv) encontrar un conjunto de distancias $\{d_i\}$, $i = 1, \dots, N$, donde d_i es la distancia entre (x_i, y_i, z_i) y el plano, en donde se utiliza el conjunto $\{d_i\}$ para caracterizar la organización 3D;
- B.
 - (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de estructuras de los telómeros; y
 - 20 (ii) encontrar un elipsoide que tiene ejes principales a_1 , a_2 , y a_3 en donde el elipsoide es un esferoide achatado con a_1 aproximadamente igual a a_2 y en donde se utiliza una ratio de achatamiento, a_3/a_1 o a_1/a_3 para caracterizar la organización 3D; y/o
- C.
 - (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de telómeros; y
 - 25 (ii) obtener a partir de los datos de imagen al menos uno de un conjunto de intensidades $\{I_i\}$, un conjunto de volúmenes $\{V_i\}$ y un conjunto de tres dimensiones $\{(Dx_i, Dy_i, Dz_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde I_i es una intensidad total o media, V_i es un volumen, y (Dx_i, Dy_i, Dz_i) son los ejes principales de un elipsoide que describe el telómero y/o cromosoma i-ésimo, respectivamente, en donde el al menos uno se utiliza para caracterizar la organización 3D.
 - 30

2. Un método de monitorización del tratamiento del cáncer en una célula de test obtenida a partir de una muestra que comprende la célula de test, comprendiendo el método:

- 35 (a) caracterizar la organización de telómeros 3D en la célula de test utilizando análisis tridimensional (3D); y
- (b) comparar la organización de telómeros 3D en la célula de test con la de una célula de control no cancerosa, en donde un cambio en la organización de telómeros 3D en la célula de test comparada con la célula de control está correlacionado con el tratamiento del cáncer en la célula de test,
- 40 en donde la caracterización de la organización de telómeros 3D comprende al menos uno de:

- A.
 - (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de los telómeros,
 - 45 (ii) procesar los datos de imagen para encontrar un conjunto de coordenadas $\{(x_i, y_i, z_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde (x_i, y_i, z_i) es una posición del telómero y/o cromosoma i-ésimo;
 - (iii) encontrar un plano que está más próximo al conjunto de coordenadas; y
 - (iv) encontrar un conjunto de distancias $\{d_i\}$, $i = 1, \dots, N$, donde d_i es la distancia entre (x_i, y_i, z_i) y el plano, en donde se utiliza el conjunto $\{d_i\}$ para caracterizar la organización 3D;
 - 50
- B.

- (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de las estructuras de los telómeros; y
- (ii) encontrar un elipsoide que tiene ejes principales a_1 , a_2 , y a_3 en donde el elipsoide es un esferoide achatado con a_1 aproximadamente igual a a_2 y en donde se utiliza una ratio de achatamiento, a_3/a_1 o a_1/a_3 para caracterizar la organización 3D; y/o
- 5
- C.
- (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de telómeros; y
- (ii) obtener a partir de los datos de imagen al menos uno de un conjunto de intensidades $\{I_i\}$, un conjunto de volúmenes $\{V_i\}$ y un conjunto de tres dimensiones $\{(Dx_i, Dy_i, Dz_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde I_i es una intensidad total o media, V_i es un volumen, y (Dx_i, Dy_i, Dz_i) son los ejes principales de un elipsoide que describe el telómero y/o cromosoma i -ésimo, respectivamente, en donde el al menos uno se utiliza para caracterizar la organización 3D.
- 10
3. El método conforme a la reivindicación 1 ó 2, en donde la organización de telómeros se caracteriza por un método que comprende:
- (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de los telómeros;
- (ii) procesar los datos de imagen para encontrar un conjunto de coordenadas $\{(x_i, y_i, z_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde (x_i, y_i, z_i) es una posición del telómero y/o cromosoma i -ésimo;
- 20 (iii) encontrar un plano que está más próximo al conjunto de coordenadas; y
- (iv) encontrar un conjunto de distancias $\{d_i\}$, $i = 1, \dots, N$, donde d_i es la distancia entre (x_i, y_i, z_i) , y el plano, en donde se utiliza el conjunto $\{d_i\}$ para caracterizar la organización 3D.
4. El método conforme a la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde la organización 3D se caracteriza por especificar al menos uno de d y σ , donde d es la distancia media del conjunto de distancias, y σ es la desviación estándar del conjunto de distancias.
- 25
5. El método conforme a la reivindicación 4, en donde la comparación comprende comparar el al menos uno de d y σ con un valor de control correspondiente.
- 30
6. El método conforme a la reivindicación 1 ó 2 en donde la organización de telómeros se caracteriza por un método que comprende
- (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de estructuras teloméricas; y
- 35 (ii) encontrar un elipsoide que tiene ejes principales a_1 , a_2 , y a_3 en donde el elipsoide es un esferoide achatado con a_1 aproximadamente igual a a_2 y en donde se utiliza una ratio de achatamiento, a_3/a_1 o a_1/a_3 para caracterizar la organización 3D.
- 40
7. El método conforme a la reivindicación 1 ó 2 en donde la organización de telómeros se caracteriza por un método que comprende
- (i) introducir datos de imagen de la organización 3D de telómeros y/o cromosomas; y
- 45 (ii) obtener a partir de los datos de imagen al menos uno de un conjunto de intensidades $\{I_i\}$, un conjunto de volúmenes $\{V_i\}$ y un conjunto de tres dimensiones $\{(Dx_i, Dy_i, Dz_i)\}$, $i = 1, \dots, N$, donde I_i es una intensidad total o media, V_i es un volumen, y (Dx_i, Dy_i, Dz_i) son los ejes principales de un elipsoide que describe el telómero y/o cromosoma i -ésimo, respectivamente, en donde el al menos uno se utiliza para caracterizar la organización 3D.
- 50
8. El método conforme a la reivindicación 1, 2 ó 7, en donde dicha comparación comprende comparar una cantidad obtenida de al menos uno con un valor de control.
9. El método conforme a la reivindicación 8, en donde la cantidad es un valor medio de los miembros de $\{I_i\}$, $\{V_i\}$ o $\{(Dx_i, Dy_i, Dz_i)\}$.
- 55
10. El método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el análisis 3D es microscopía 3D de alta resolución.
- 60
11. El método conforme a las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la organización de telómeros se caracteriza por uno o más de alineamiento de los telómeros, tamaño y forma de un agregado telomérico, y/o espacio 3D ocupado

por los telómeros.

12. El método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 11, en donde el cambio en la organización de telómeros en la célula de test comparada con la célula de control se caracteriza por comparación de uno o más de:

- (i) el número de telómeros;
- (ii) el tamaño y la forma de un agregado telomérico;
- (iii) el alineamiento de los telómeros; y
- (iv) el espacio 3D ocupado por los telómeros en la célula de test y la célula de control.

13. El método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cambio en la organización de telómeros en la célula de test comparada con la célula de control se determina durante cualquier fase de un ciclo celular.

14. El método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la organización de telómeros se caracteriza por comparación de uno o más de (i) alineamiento de los telómeros en un disco telomérico; y (ii) tamaño de un disco telomérico, en donde el disco telomérico es la estructura organizada formada cuando los telómeros se condensan y se alinean durante la fase G2 tardía del ciclo celular.

15. El método conforme a la reivindicación 14, en donde, si uno o más de:

- (i) el alineamiento de los telómeros en el disco telomérico de la célula de test está distorsionado comparado con el alineamiento de los telómeros en el disco telomérico de la célula de control; y
- (ii) el disco telomérico en la célula de test ocupa un espacio mayor o menor comparado con el disco telomérico en la célula de control, entonces la célula de test es una célula de cáncer.

16. El método conforme a la reivindicación 12, en donde un cambio en el tamaño y la forma de los agregados teloméricos en la célula de test comparado con la organización de telómeros en la célula de control, indica que la célula de test es una célula de cáncer.

Figura 1

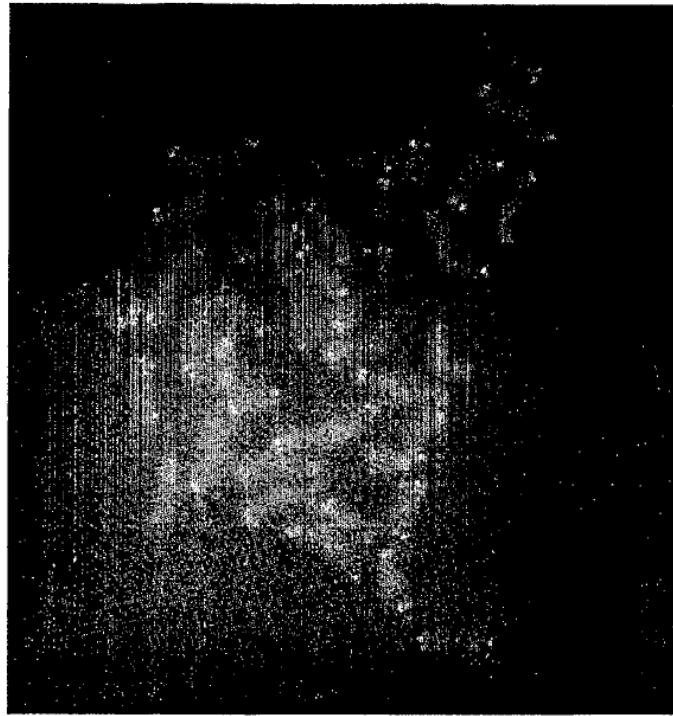


Figura 2

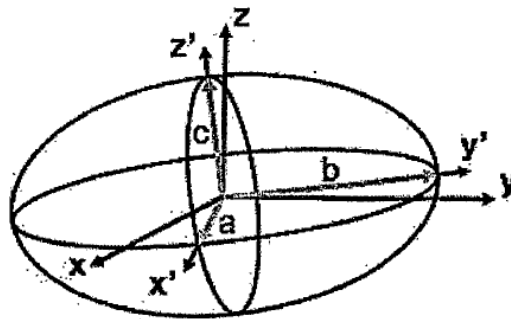


Figura 3

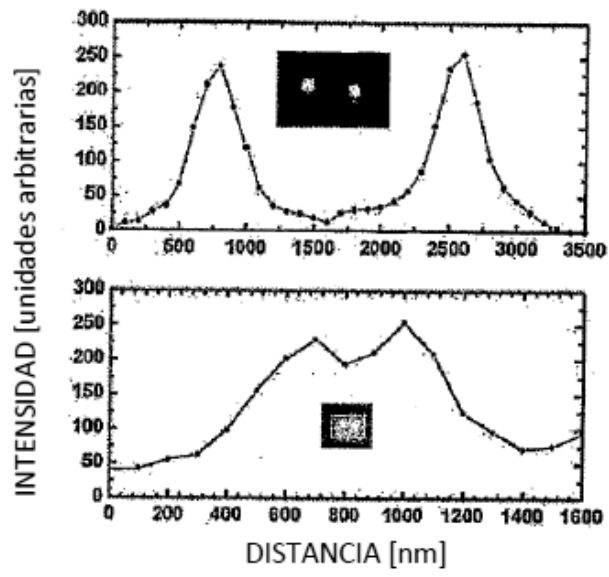


Figura 4

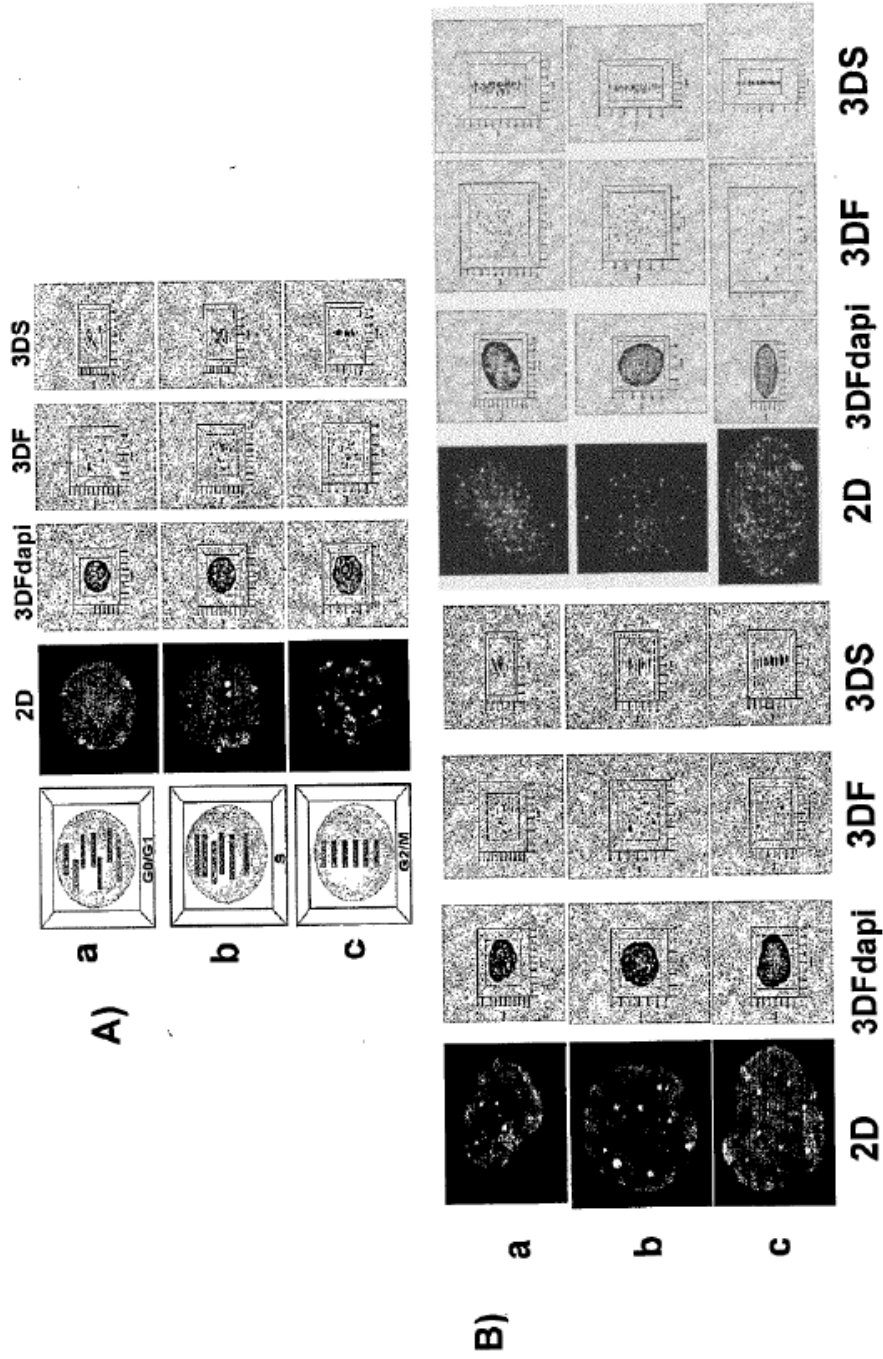


Figura 5

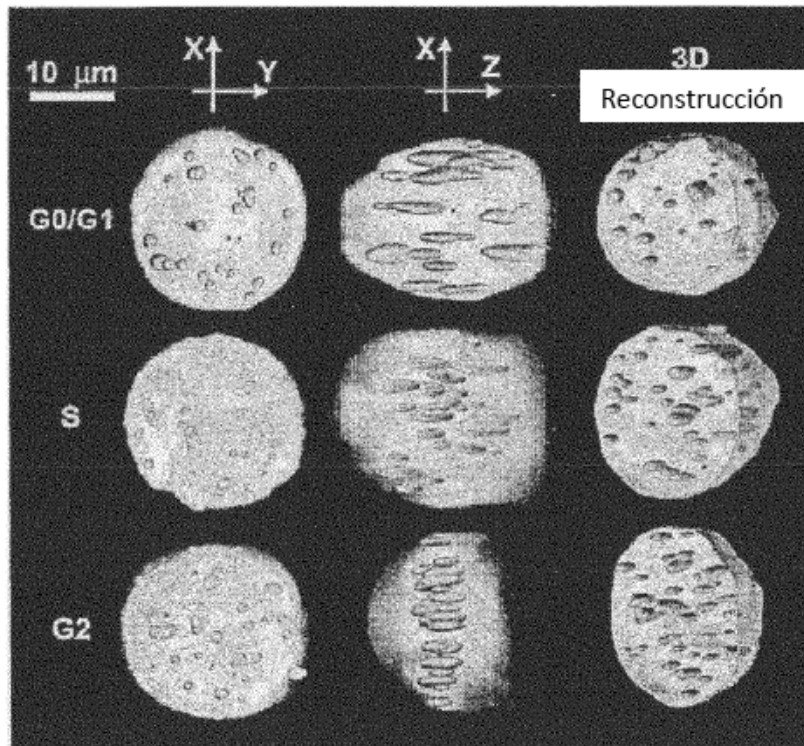


Figura 6

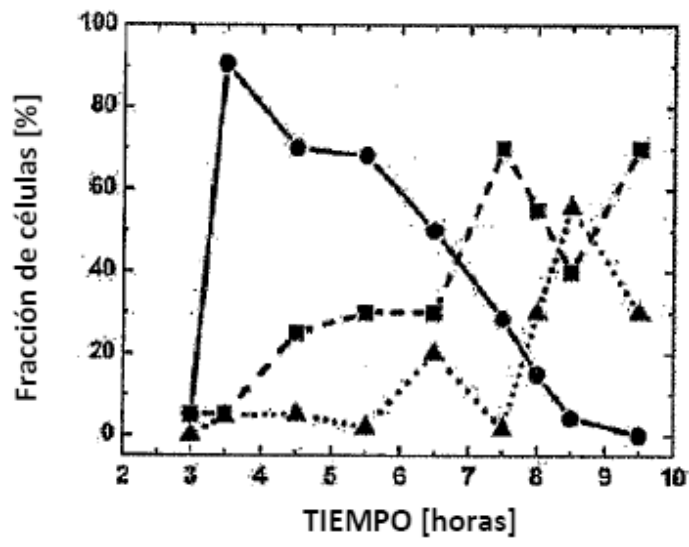


Figura 7

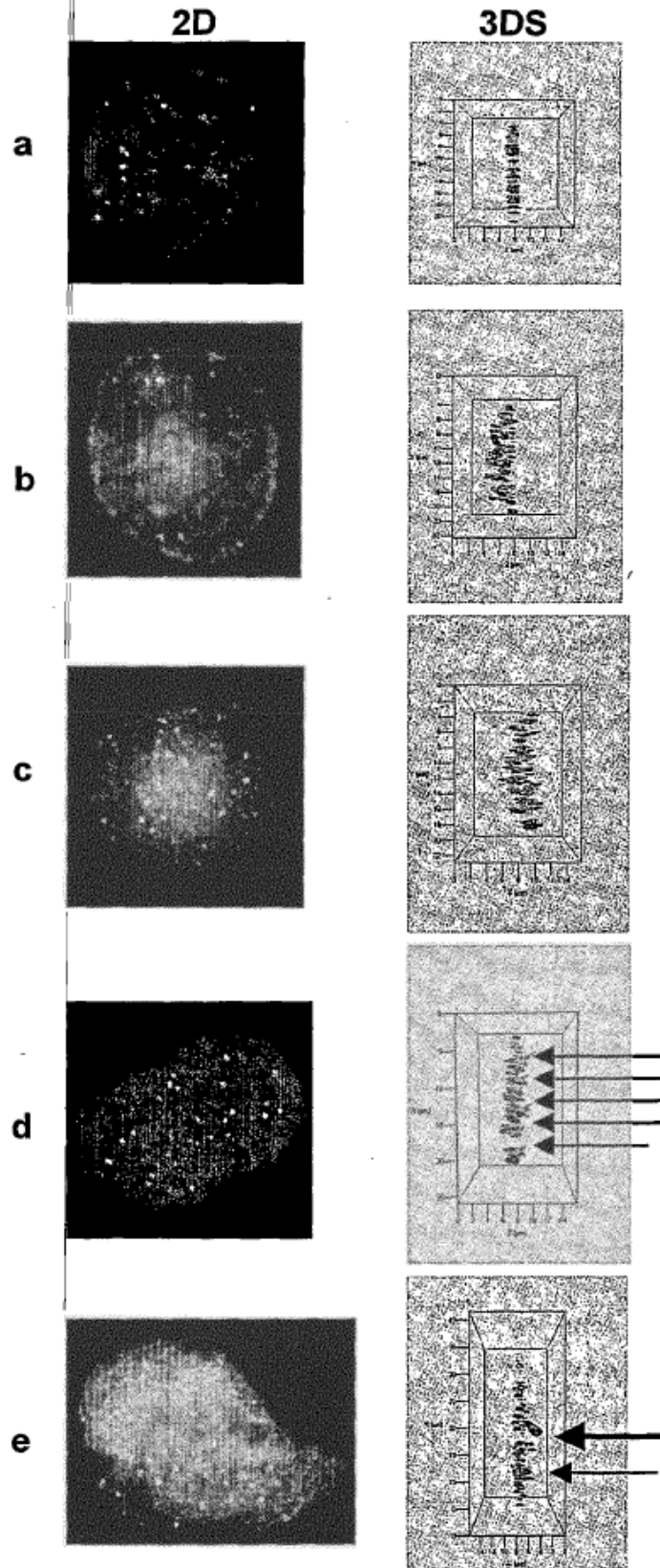


Figura 8

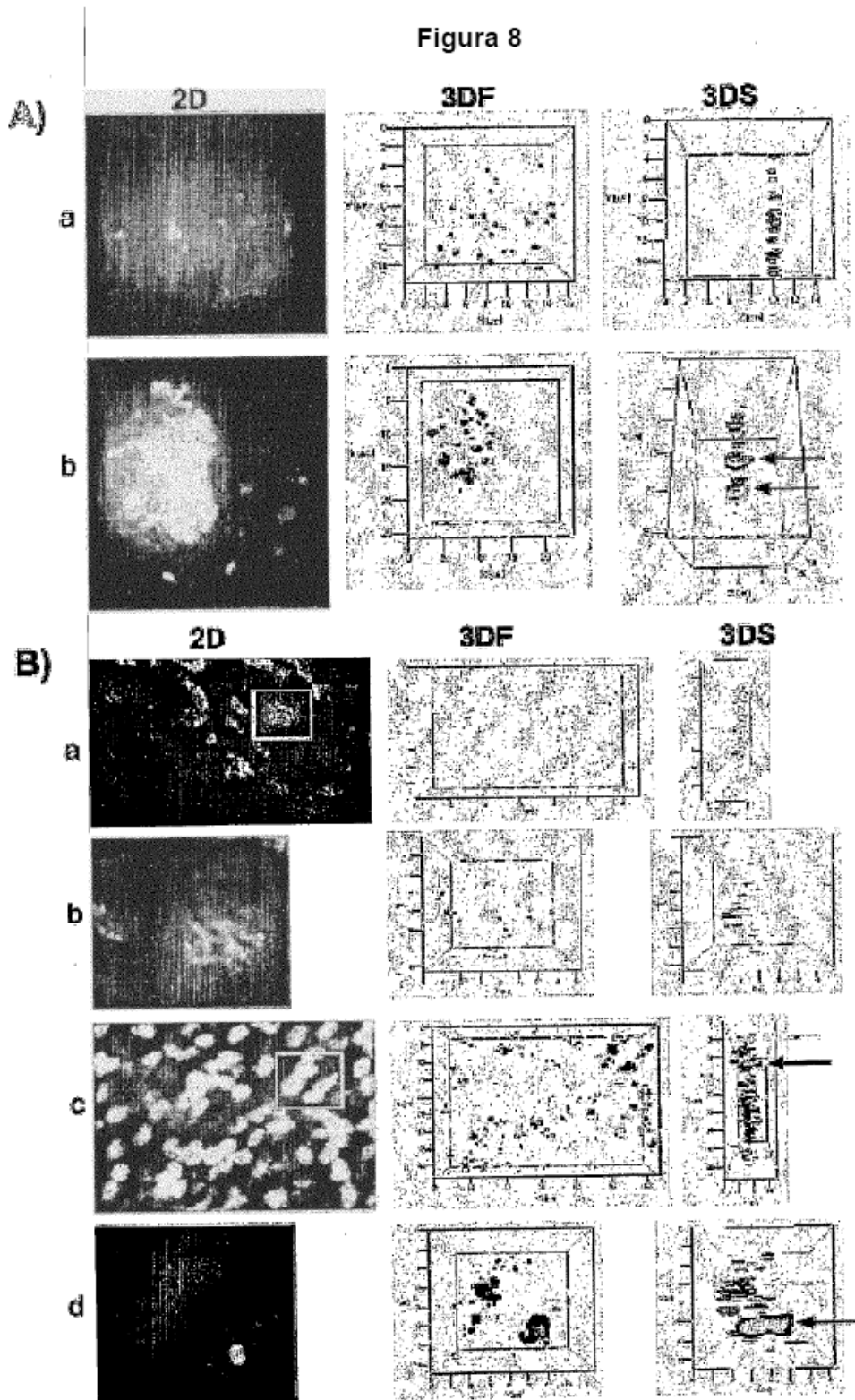


Figura 9

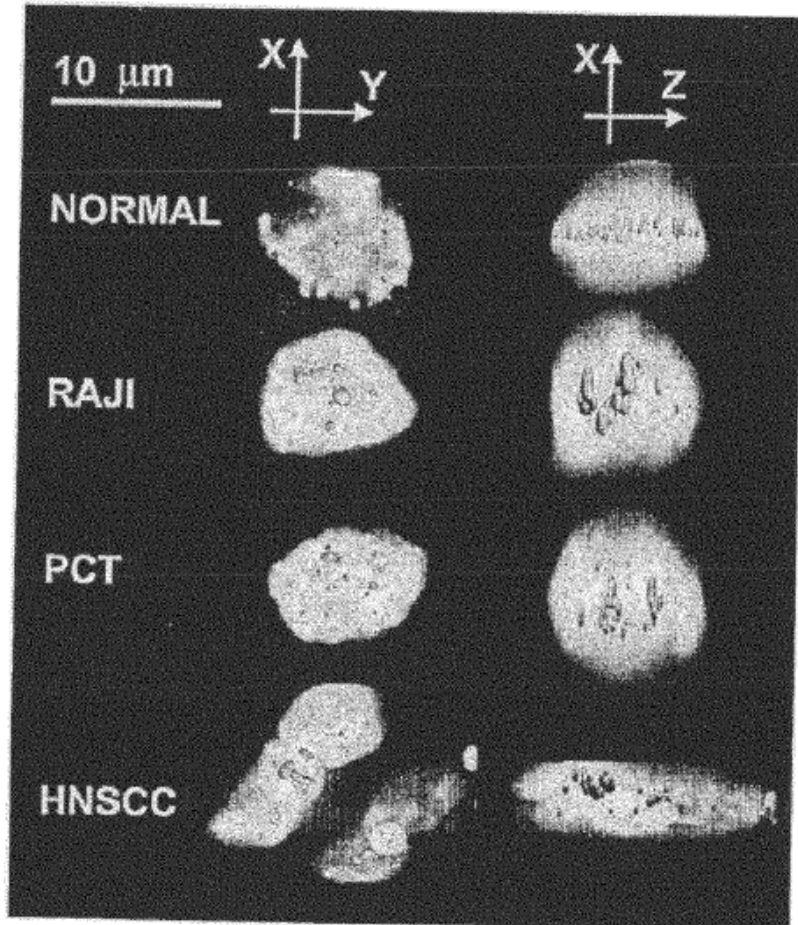


Figura 10

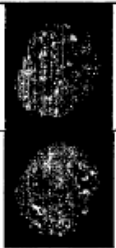
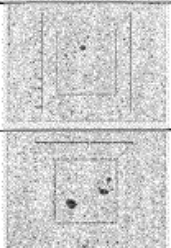
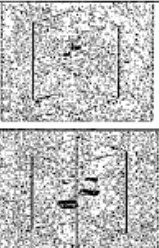

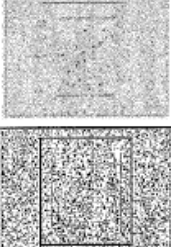



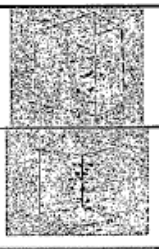

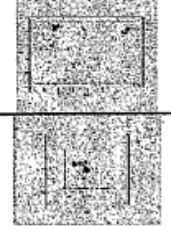








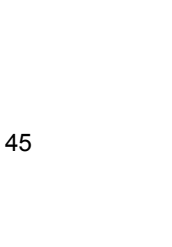

	2D	3DF	3DS
a			
b			
c			
d			
e			
f			
g			
h			

Figura 11

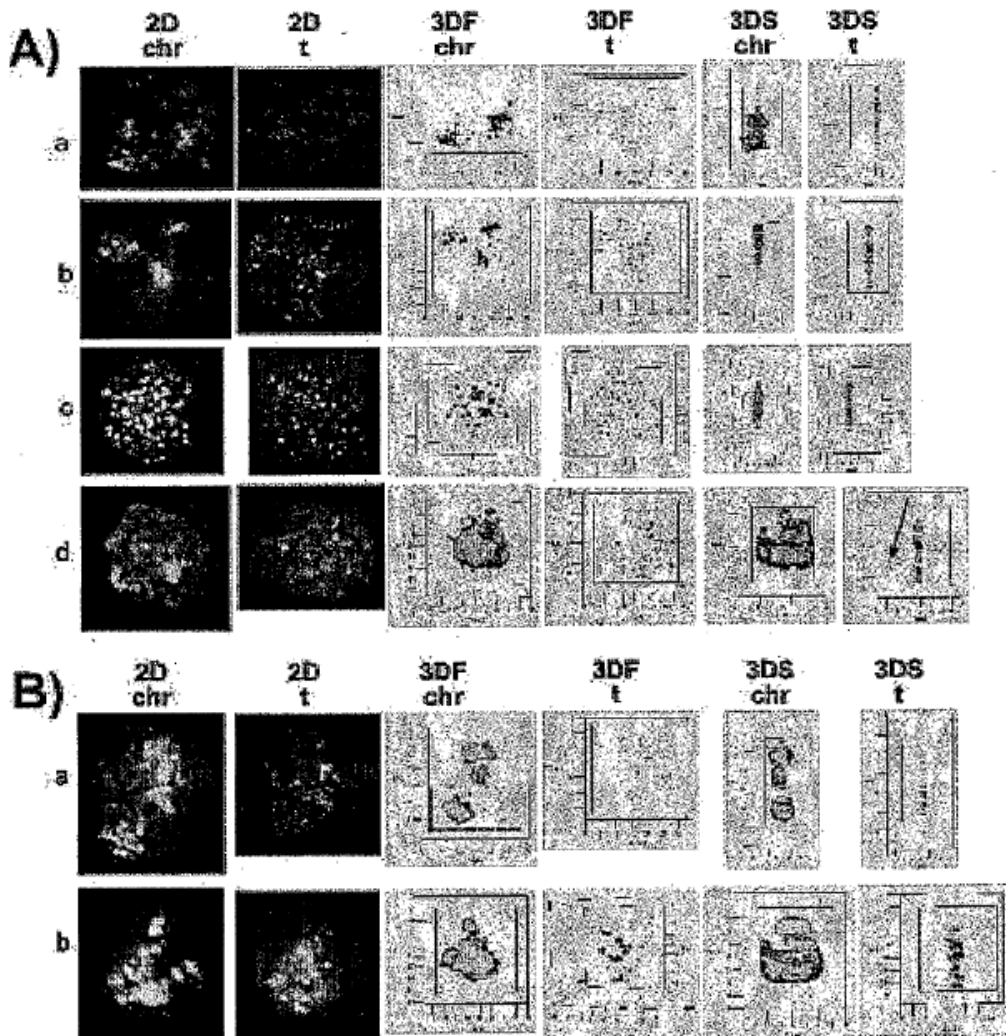


Figura 12

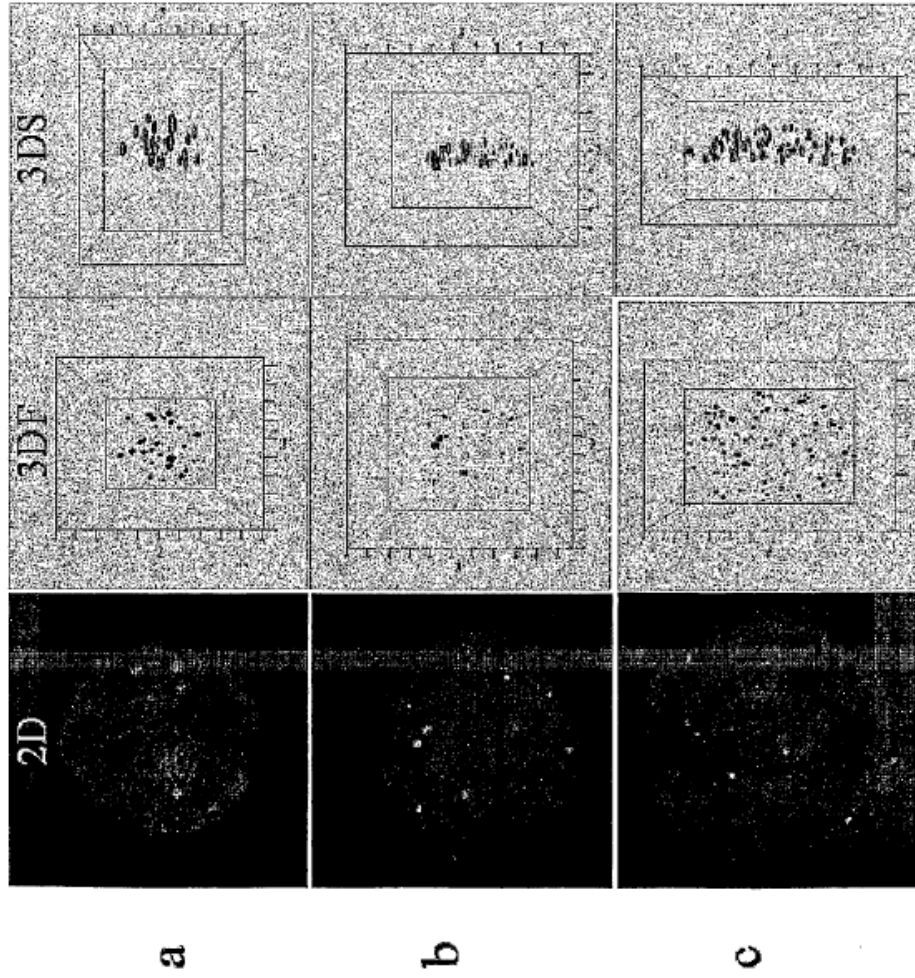


Figura 13

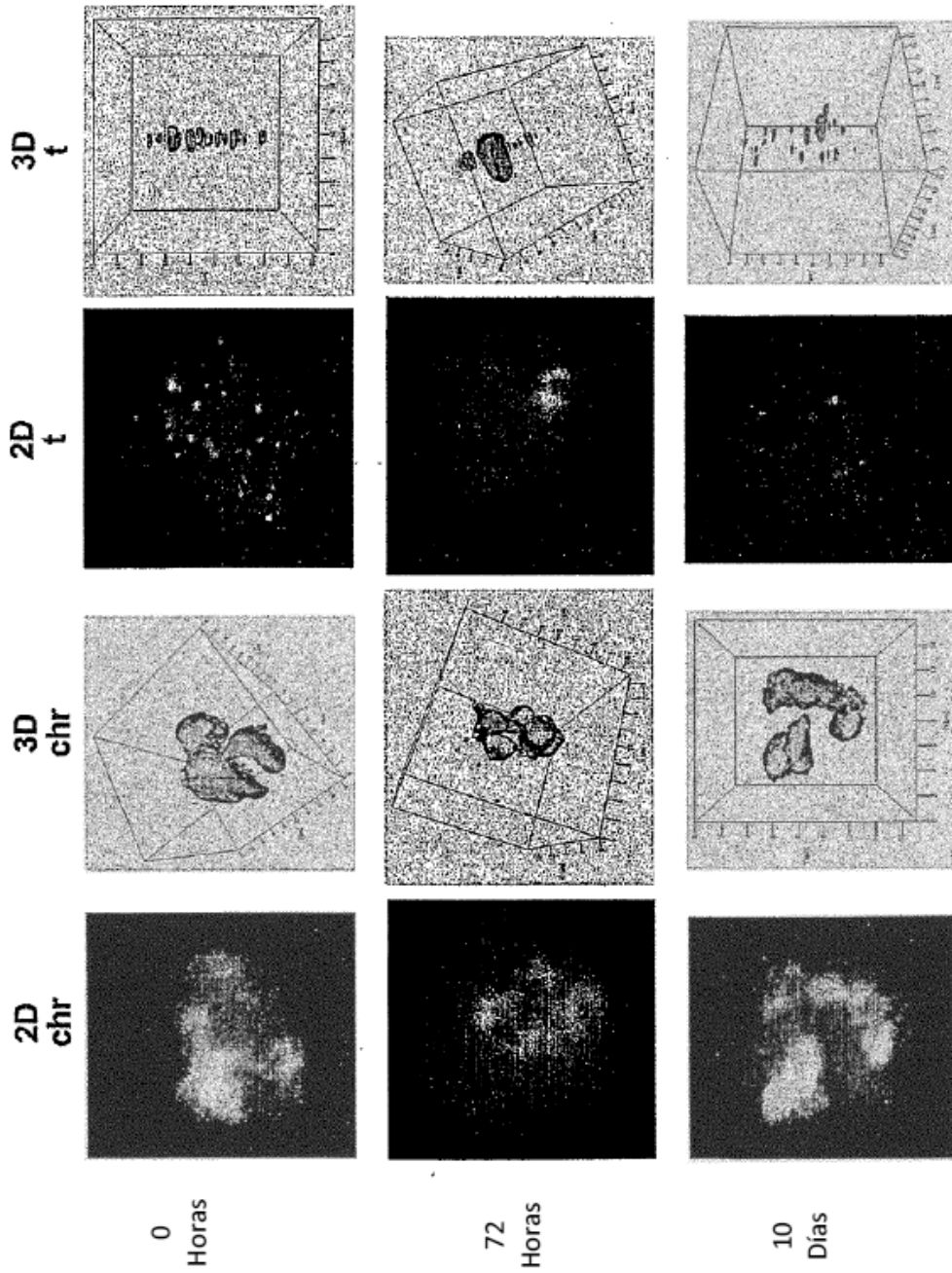


Figura 14

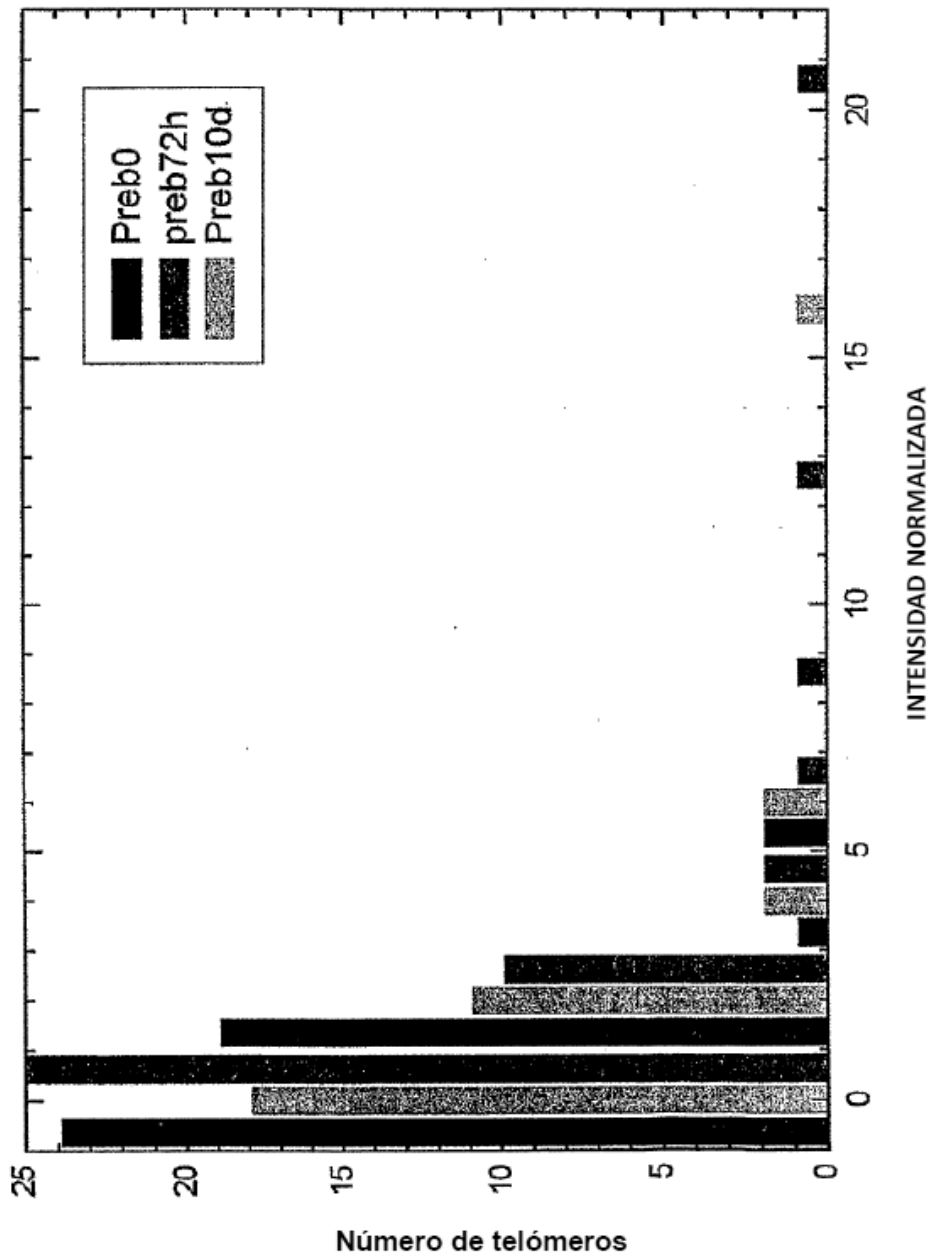


Figura 15

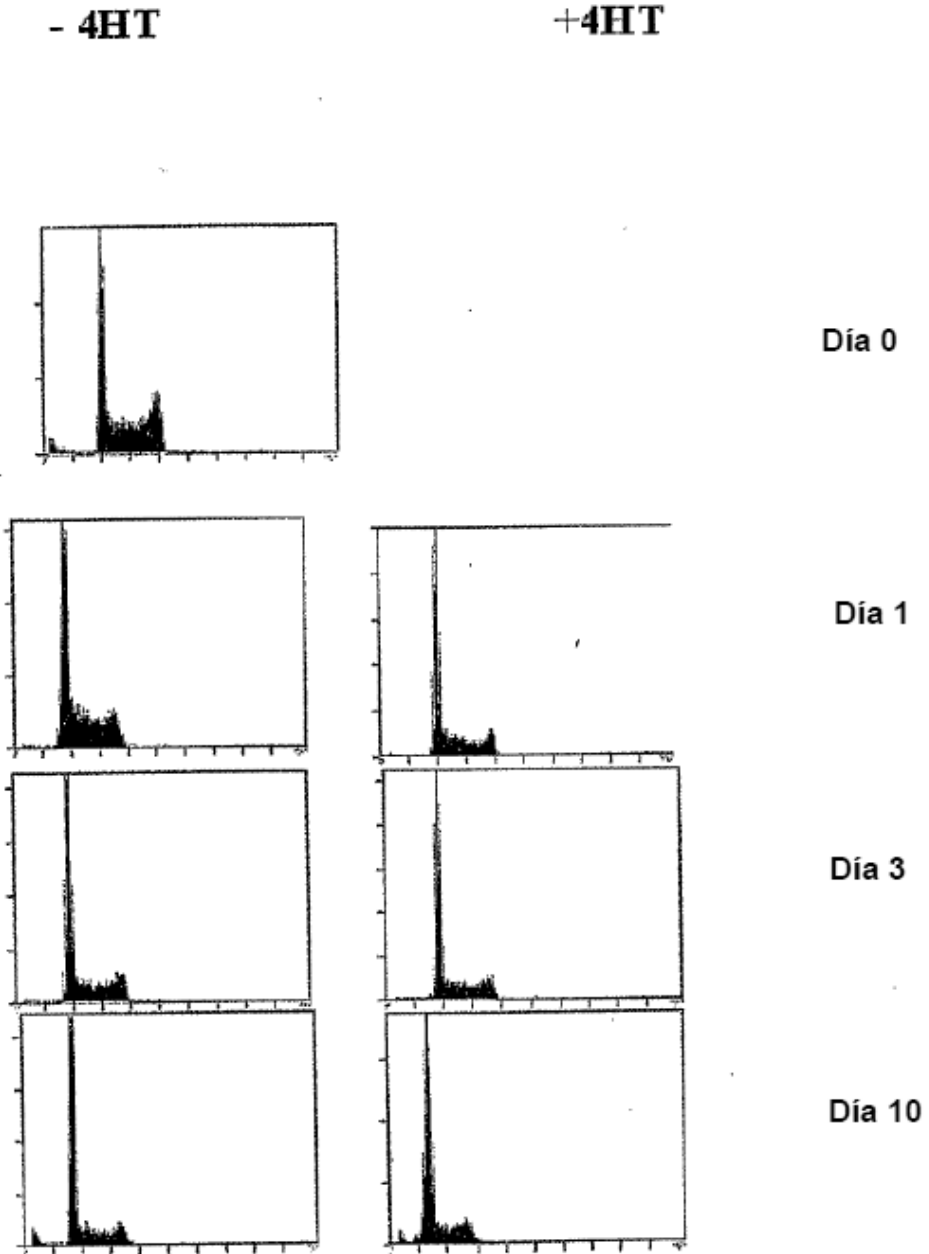


Figura 16

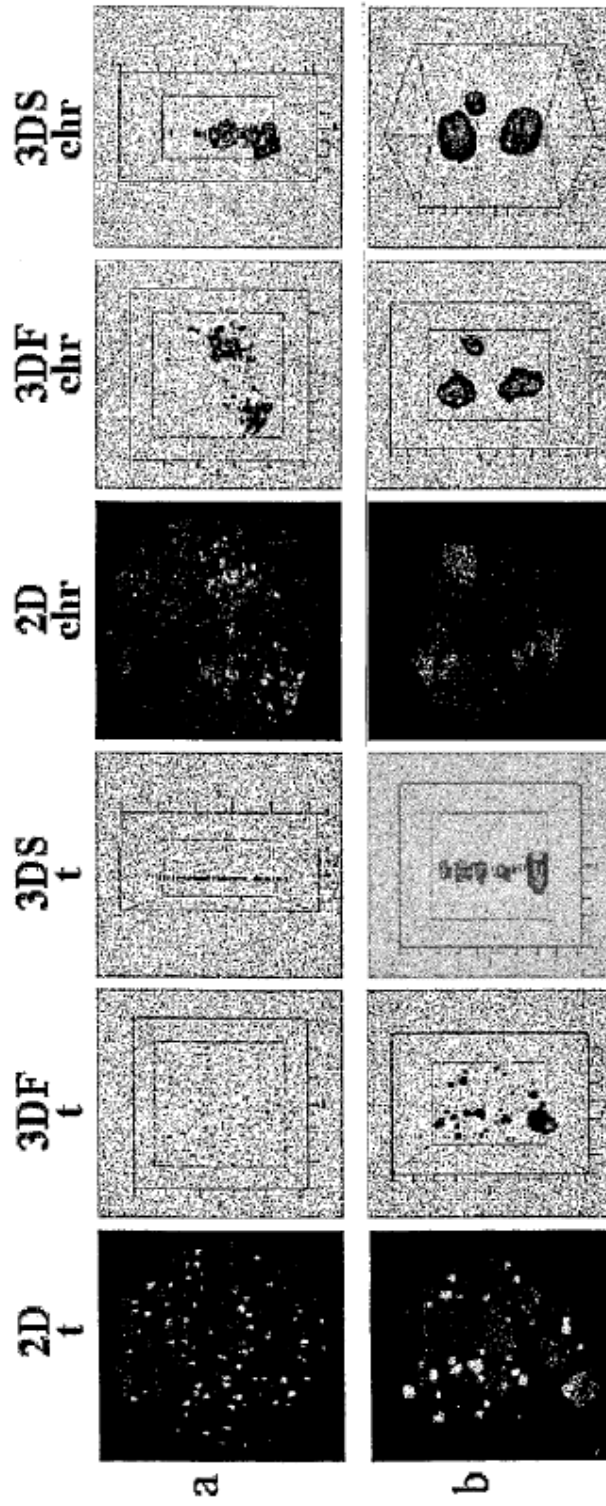


Figura 17

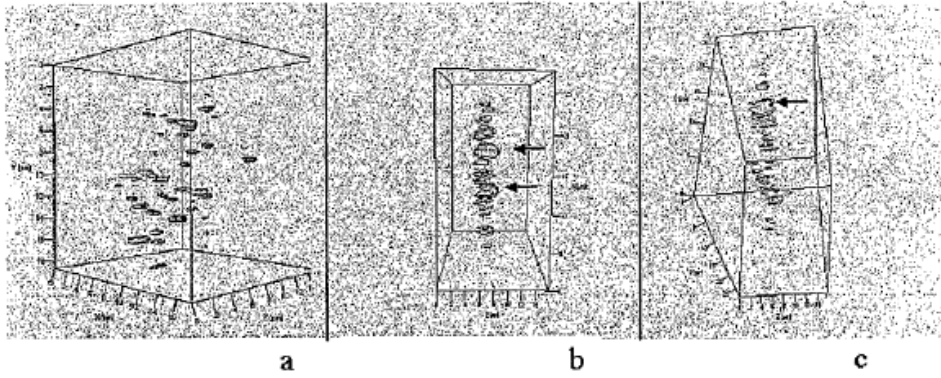


Figura 18

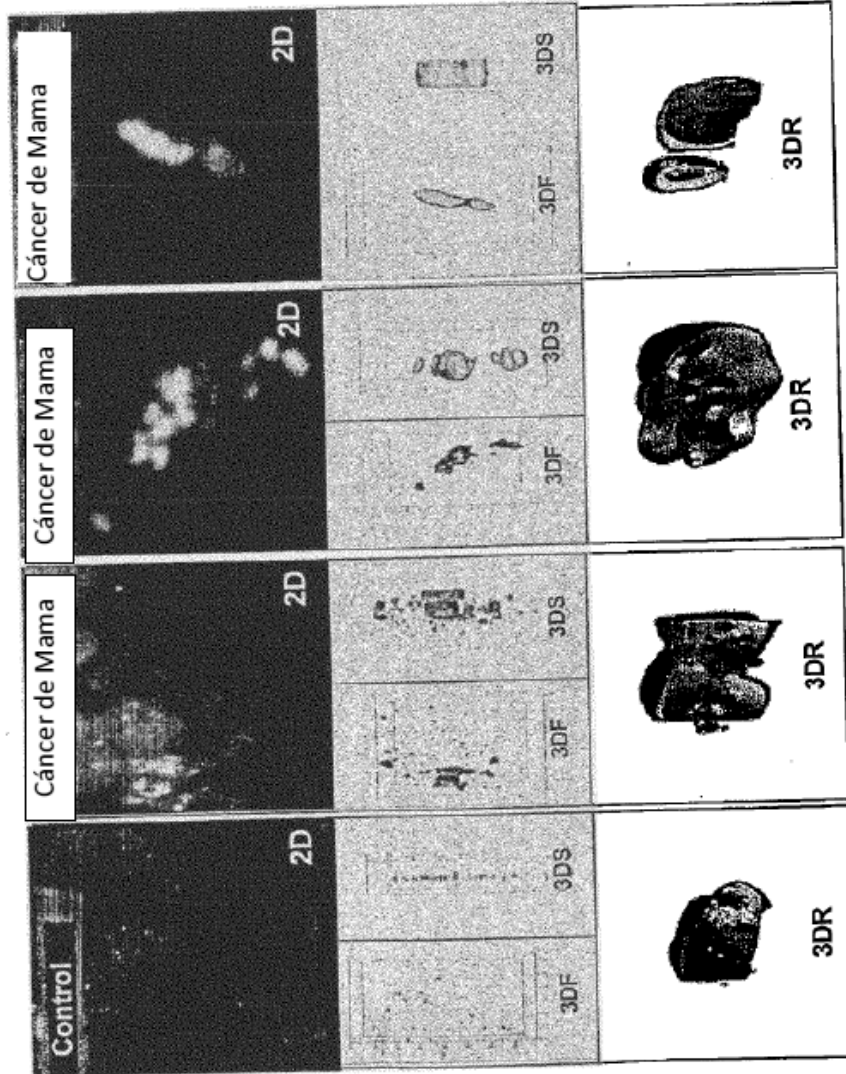


Figura 19

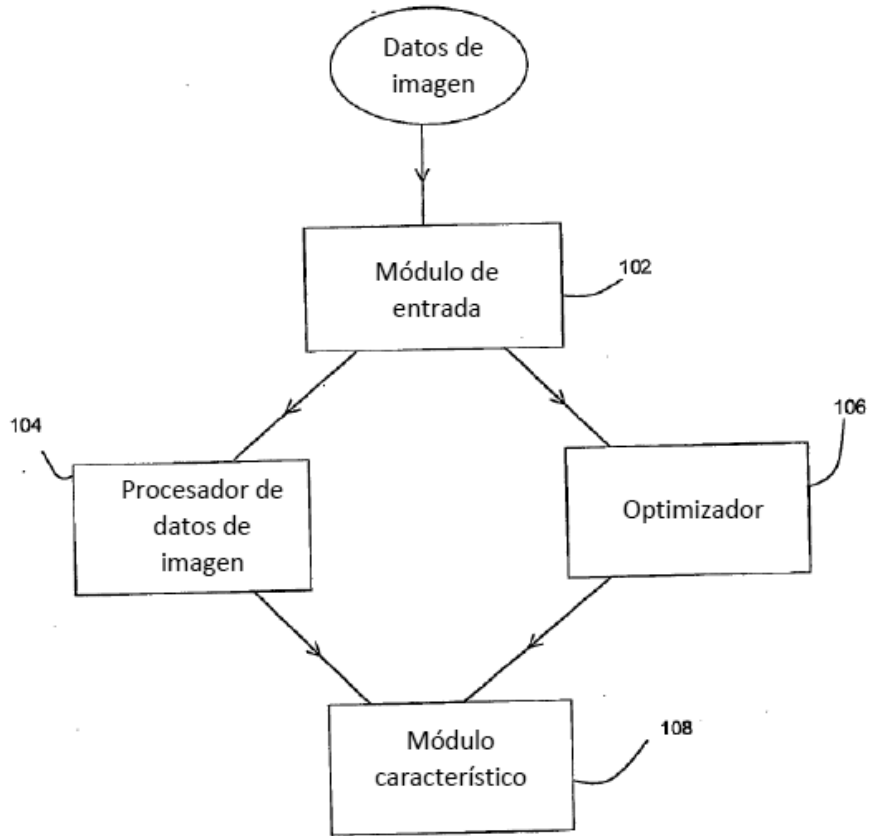
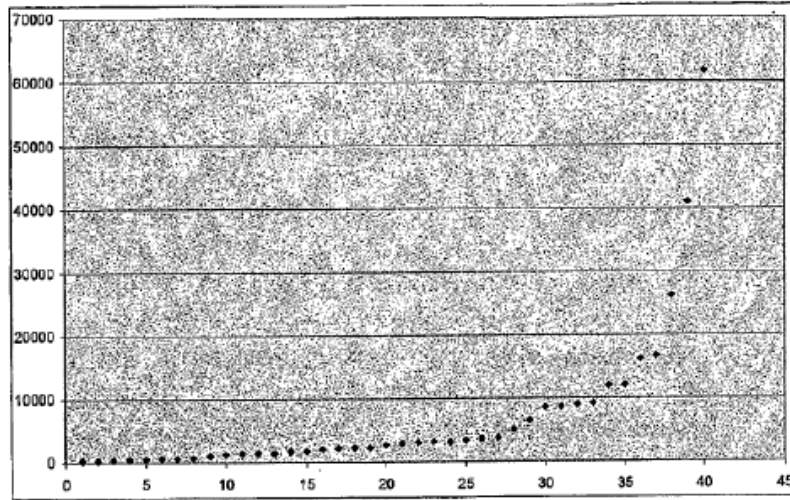


Figura 20

A



B

