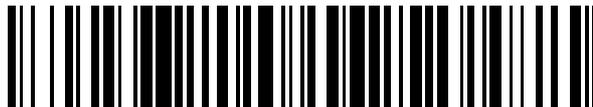


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 434**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2011 PCT/IB2011/002584**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12038831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2011 E 11802132 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2619325**

54 Título: **Método de detección, cuantificación y cartografía del daño y/o de la reparación de cadenas de ADN**

30 Prioridad:

24.09.2010 US 386358 P

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

24.10.2016

73 Titular/es:

**GENOMIC VISION (100.0%)
80-84 rue des Meuniers
92220 Bagneux, FR**

72 Inventor/es:

**CINQUE, LUCIA y
BENSIMON, AARON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 587 434 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 detección, cuantificación y cartografía del daño y/o de la reparación de cadenas de ADN

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 Métodos y productos de detección *in vitro* de la presencia del daño en el ADN o de la presencia de una respuesta biológica hacia el daño en el ADN a nivel molecular. Se emplea el rastreo molecular u otros métodos de estiramiento de ácido nucleico o métodos similares junto con compuestos que reaccionan con el ADN, sondas que se unen al ADN o monómeros de ácido nucleico, especialmente, monómeros de ácido nucleico marcados.

15 Descripción de la técnica relacionada

El daño en el ADN se produce cuando se genera una alteración o una pérdida a lo largo de la molécula de ADN. Es importante distinguir el daño de la mutación en el ADN. Una analogía ilustra la diferencia: el término "TIME" se puede mutar al término "TIDE" mediante la sustitución con la letra "D" de la letra "M", mientras que si la letra "M" se pierde o se altera, se produce un daño, generándose el término sin significado "TI#E". Por analogía, la sustitución de una timina con una adenina sería una mutación, mientras que la pérdida de una adenina o la metilación de una guanina constituirían un daño. Sin embargo, los fenómenos no son independientes, porque se sabe que la guanina metilada es mutagénica (Warren, Forsberg *et al.*, 2006). La mutación normalmente da lugar a la transcripción que produce proteínas con funcionalidad disminuida o alterada, y es probable que se perpetúe en las células en división. El daño en el ADN interfiere en la replicación y la transcripción, y puede afectar drásticamente al progreso del ciclo celular si la célula no es capaz de repararlo.

Hay más de 200.000 daños del ADN por célula de mamífero al día (Saul y Ames, 1986) que se reparan continuamente para recuperar la actividad normal de las células y garantizar la supervivencia celular. Las fuentes de los daños pueden ser endógenas o exógenas con respecto a la célula. El daño endógeno se debe principalmente a los radicales de oxígeno producidos durante la respiración celular normal, o la alquilación e hidrólisis de los compuestos. El daño exógeno se produce cuando las células se exponen a un agente genotóxico (un agente que afecta a la integridad del material genético de una célula, tal como un mutágeno o un carcinógeno). Estos agentes incluyen ciertas longitudes de onda de la radiación: rayos gamma y rayos X, rayos UV-C (-260 nm) y UV-B que penetran en la capa de ozono; radicales de oxígeno altamente reactivos producidos por vías bioquímicas externas; productos químicos del medio ambiente: hidrocarburos, productos vegetales y microbianos, fármacos usados como agentes terapéuticos (por ejemplo, antimicrobianos o fármacos usados en la quimioterapia).

Los efectos de los agentes genotóxicos o dañinos para los ácidos nucleicos a nivel molecular se pueden clasificar en cuatro grupos principales: alteraciones, desapareamientos, entrecruzamientos y roturas de las bases.

Las cuatro bases del ADN (A, T, C, G) se pueden modificar covalentemente en varias posiciones, dando lugar a la pérdida o a la alteración covalente de las bases. Las lesiones más frecuentes son el resultado de la desaminación, despurinación, despirimidación, metilación (7-metilguanina, 1-metiladenina, 6-O-metilguanina) y oxidación (8-hidroxil-2-desoxi-guanosina y 8-oxo-7,8-dihidroguanina u 8-oxoG) de los ácidos nucleicos (Zharkov, 2008). El fallo de la prueba de lectura mediante mecanismos celulares durante la replicación del ADN puede generar desapareamientos de las bases normales: un ejemplo común es la incorporación de la pirimidina U (que normalmente solo se encuentra en el ARN) en lugar de T (Larson, Bednarski *et al.*, 2008.) al ADN. Se pueden formar entrecruzamientos entre las bases de la misma cadena de ADN ([6-4]-PP, dímeros de pirimidina) (Pfeifer, 1997) o en cadenas opuestas ("entrecruzamientos entre cadenas") (McCabe, Olson *et al.*, 2009). Las roturas de la cadena principal pueden limitarse a una de las dos cadenas (rotura de una sola cadena o "RUC") (Caldecott, 2008) o pueden cortar la molécula en ambas cadenas, produciendo una rotura de doble cadena ("RDC") (Shrivastav, De Haro *et al.*, 2008).

En la Tabla 1, se ilustran los tipos y la frecuencia de fondo del daño en el ADN.

55 Tabla 1: Distribución basal del daño en el ADN que se produce diariamente en una célula eucariota

Tipo de daño	n.º	%
Roturas de una sola cadena	120.000	50,9
N ⁷ -Metilguanina	84.000	35,6
Despurinación	24.000	10,2
O ⁶ -Metilguanina	3.120	1,3
8-oxo-7,8-dihidroguanina	2.880	1,2

Tipo de daño	n.º	%
Despirimidación	1.320	0,5
Desaminación de la citosina	360	0,2
Dímeros de pirimidina	200	0,1
Roturas de doble cadena	9	0,01
Entrecruzamientos entre cadenas	8	0,01

El resultado del daño en el ADN es diverso y complejo, pero, en general, constituye un peligro para la célula.

5 Surgen efectos a corto plazo de la obstrucción de las operaciones básicas en el ADN, desencadenando la detención del ciclo celular o la muerte celular. Muchas lesiones estancan la transcripción y generan estrés de transcripción agudo, lo que constituye un eficaz desencadenante de la apoptosis dependiente de p53 (Evan y Vousden, 2001). Para evitar dichos mecanismos, las células desarrollaron un sistema de reparación de alta prioridad denominado reparación acoplada a la transcripción (TCR), que desplaza o elimina la ARN polimerasa detenida y garantiza la reparación rápida (Tornaletti y Hanawalt, 1999).

10 Los efectos a largo plazo son el resultado de la corrección errónea o la conversión de las lesiones que causan mutaciones irreversibles y que contribuyen a la oncogénesis (Hoeijmakers, 2001). Suele ser el caso de las lesiones que interfieren en la replicación del ADN (en general, RUC, alquilaciones, distorsiones de la hélice). Se recluta una clase de polimerasas con propiedades de apareamiento de bases flexible cuando se produce un estrés de la replicación inducido por el daño. Estas enzimas recientemente descubiertas se hacen cargo temporalmente de la ADN polimerasa replicativa bloqueada y permiten la síntesis de translesiones. Este proceso puede ser beneficioso, pero se produce a expensas de una mayor tasa de error. Parece ser responsable de la mayoría de las mutaciones puntuales inducidas por daños, siendo, por tanto, particularmente relevante para la oncogénesis (Kunkel y Bebenek, 2000).

20 Las lesiones que afectan a ambas cadenas (RDC y entrecruzamientos entre cadenas) son la causa directa de la recombinación. Si la información genética se interrumpe, la integridad de los cromosomas no se puede restaurar con alta fidelidad y la segregación no puede progresar adecuadamente durante la mitosis. Las consecuencias están estrechamente relacionadas con la carcinogénesis: aberraciones cromosómicas, incluyendo la aneuploidía, deleciones y translocaciones cromosómicas (Khanna, K. K. y S. P. Jackson, 2001).

25 Para hacer frente a todos los posibles daños que amenazan la integridad del ADN y controlar su impacto en la información genética vital, las células han desarrollado complejos sistemas de reparación que suelen interactuar y apoyarse mutuamente.

30 Un criterio de extensión espacial permite dibujar una imagen intuitiva de cómo la maquinaria de reparación de la célula se organiza tras la activación de un puesto de control de los daños.

35 En el caso de una lesión localizada en una sola cadena, se reclutan dos complejos enzimáticos basados en moldes, dependiendo de la extensión espacial del daño: la reparación de la escisión de bases (BER) se dirige a pequeñas alteraciones químicas de bases individuales (Lindahl y Wood, 1999); la reparación de la escisión de nucleótidos (NER) reconoce alteraciones de múltiples bases, de mayor tamaño, (de Laat, Jaspers *et al.*, 1999). En una reacción de tipo "corte y parche", la lesión se retira y el hueco de una sola cadena resultante se rellena usando la cadena complementaria intacta como molde. La BER es uno de los principales métodos para corregir errores en la secuencia de bases y, por lo tanto, es particularmente relevante para la prevención de la mutagénesis. La NER es un sistema flexible que reconoce diferentes tipos de lesiones de distorsión de la hélice, que impiden el apareamiento adecuado de las bases. La NER se compone de dos subvías dependiendo del sustrato: la NER del genoma global (GG-NER) examina todo el genoma en busca de las distorsiones de la hélice, y la reparación acoplada a la transcripción (TCR) se centra en las distorsiones que bloquean la transcripción (Tornaletti y Hanawalt 1999). La NER también se recupera para apoyar el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR), que coordina específicamente la maquinaria de replicación cuando se introduce un error durante la replicación del ADN normal (Plotz, Zeuzem *et al.*, 2006).

50 En el caso de los daños que afectan a ambas cadenas, no se dispone de cadena molde para realizar la reparación. Como consecuencia directa, estas lesiones son difíciles de corregir y constituyen un peligro real para la célula. En dichos casos, se han de activar los mecanismos de recombinación (recombinación homóloga (HR) y unión de extremos (EJ)), que también participan en otras vías celulares (Shrivastav, De Haro *et al.*, 2008).

55 La detección de las lesiones del genoma tiene que tener lugar rápidamente para activar los puntos de control específicos (la denominada respuesta SOS) que detengan el ciclo celular y permitan la reparación del daño antes de

que se convierta en mutaciones permanentes (Zhou, Elledge, 2000). Cuando el daño es demasiado importante (en términos de cantidad y/o gravedad), la célula entera se sacrifica mediante el inicio de la apoptosis, con el objetivo de prevenir la transmisión del material genético mutado (Evan y Vousden, 2001). El destino de las células depende de este delicado equilibrio entre la importancia del daño y la conversión del daño en elementos que se vuelven permanentes, independientemente de si representan o no una mutación. Este equilibrio es el paradigma común que subyace al mecanismo de envejecimiento y a la carcinogénesis (Finkel, Serrano *et al.*, 2007). El juego con este equilibrio es lo que confiere un potencial terapéutico a los agentes genotóxicos, especialmente a las radiaciones ionizantes (Asaithamby y Chen, 2009). Más directamente, la importancia biológica del daño en el ADN se evidencia por la predisposición a la malignidad inducida por los defectos hereditarios en las vías de reparación. A modo de ejemplo, la deficiencia en las vías de NER causa enfermedades graves (xeroderma pigmentoso, síndrome de Cockayne) y predisposición al cáncer de piel. La falta de respuesta o reparación adecuada de la RDC está implicada en el síndrome de la ataxia telangiectasia y se correlaciona directamente con el linfoma, el cáncer de mama y el cáncer de ovario (Hoeijmakers 2001).

El rastreo molecular es una técnica que permite el estiramiento uniforme de las macromoléculas y, en particular, de los ácidos nucleicos sobre un sustrato mediante la acción de una superficie de contacto en movimiento. La tecnología de rastreo molecular se ha desvelado en diversas patentes y publicaciones científicas, por ejemplo, en los documentos US 6303296, W09818959, WO0073503, US2006257910, US2004033510, US6130044, US6225055, US6054327, WO2008028931 y Michalet, Ekong *et al.* 1997, Herrick, Michalet *et al.* 2000, Herrick, Stanislawski *et al.* 2000, Gad, Aurias *et al.* 2001, Gad, Caux-Moncoutier *et al.* 2002, Gad, Klinger *et al.* 2002, Herrick, Jun *et al.* 2002, Pasero, Bensimon *et al.* 2002, Gad, Bieche *et al.* 2003, Lebofsky y Bensimon 2003, Herrick, Conti *et al.* 2005, Lebofsky y Bensimon 2005, Lebofsky, Heilig *et al.* 2006, Patel, Arcangioli *et al.* 2006, Rao, Conti *et al.* 2007, y Schurra y Bensimon 2009 (Véanse las referencias). También se han usado el rastreo molecular y los sustratos relacionados para inmovilizar ácidos nucleicos sobre una superficie en forma parcialmente estirada o no estirada (Allemand, Bensimon *et al.*, 1997).

El estiramiento del ácido nucleico, en particular, el ADN viral o genómico, proporciona ácidos nucleicos inmovilizados en cadenas lineales y paralelas, y se realiza preferentemente con un factor de estiramiento controlado, sobre una superficie adecuada (por ejemplo, portaobjetos de vidrio tratado en superficie). Es posible estirar ácidos nucleicos que contienen monómeros modificados (por ejemplo, nucleótidos modificados con biotina). Por lo tanto, es posible linealizar una cadena de ácido nucleico sintetizada por una célula viva o *in vitro* en presencia de nucleótidos modificados, y detectarla, por ejemplo, mediante la conversión de los nucleótidos modificados en fluorescentes (Herrick, Jun *et al.* 2002). Por otra parte, tras el estiramiento, es posible hibridar sondas específicas de la secuencia detectables de manera similar por microscopía de fluorescencia (Herrick, Michalet *et al.* 2000). Así pues, se puede visualizar una determinada secuencia directamente, a nivel de una sola molécula. La longitud de las señales fluorescentes y/o su número, y su separación en el portaobjetos proporciona una lectura directa del tamaño y de la separación relativa de las secuencias diana.

Se ha usado la elongación del ADN rudimentaria que implica la elongación no homogénea del ADN para estimar la longitud del ADN y evaluar el número de lesiones en el ADN mediante la medición de la intensidad fluorescente sin el uso de sondas para localizar los daños en las secuencias genómicas o la cartografía. Sin embargo, se ha producido la necesidad de una manera muy sensible y específica de identificación, localización o cartografía del daño o de la reparación del ADN que no se base principalmente en la medición de la intensidad fluorescente y que permita simultáneamente la visualización de diferentes tipos de daños.

Teniendo en cuenta las implicaciones para la salud del daño y de la reparación de los ácidos nucleicos, incluyendo la evaluación del cáncer y el tratamiento de la enfermedad mediante varios agentes, o para el desarrollo o la identificación de nuevos agentes, se ha vuelto fundamental desarrollar métodos sensibles y eficaces para caracterizar y cuantificar el estado dañado y reparado de un ácido nucleico, especialmente, el ADN celular.

Alcance de la invención

La presente invención proporciona un método de detección de la presencia o de la ausencia de una o más partes reparadas en uno o más ácidos nucleicos dañados, en el que dicho daño se produjo en el ácido nucleico de células, comprendiendo dicho método:

(a) tratar una muestra que contiene células en cultivo antes de extraer el/los ácido/s nucleico/s de dicha muestra mediante la adición de un nucleótido o nucleósido detectable durante un tiempo y en condiciones suficientes para que interactúe con los ácidos nucleicos, en el que dicho nucleótido o nucleósido detectable es incorporado por una o más enzimas presentes dentro de dichas células vivas y capaces de escindir dicho daño del ácido nucleico y reemplazarlo por dicho nucleótido o nucleósido detectable;

(b) extraer uno o más ácidos nucleicos de dicha muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácidos nucleicos extraídos;

(c) estirar el/los ácido/s nucleico/s extraído/s;

(d) detectar el nucleótido o el nucleósido detectable en el/los ácido/s nucleico/s estirado/s; y

5 (e) detectar la presencia de la/s parte/s reparada/s en el ácido nucleico cuando dicho nucleótido o nucleósido detectable se detecta, y detectar la ausencia de una parte reparada en el/los ácido/s nucleico/s cuando dicho nucleótido o nucleósido detectable no se detecta.

10 La invención proporciona además un método de diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto, que comprende la detección de una o más partes reparadas en ácido/s nucleico/s extraído/s de una muestra de este sujeto mediante el método anterior.

15 La invención proporciona además un proceso de determinación del efecto de un agente de ensayo en uno o más ácidos nucleicos de una célula, que comprende:

poner en contacto la célula con dicho agente de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dañe el/los ácido/s nucleico/s de la célula; y

20 detectar una parte reparada en el/los ácidos nucleico/s de dicha célula mediante el método anterior.

Las realizaciones específicas del método anterior se definen en las reivindicaciones.

25 En el presente documento, se desvelan realizaciones específicas de la invención y realizaciones relacionadas que forman parte de la invención solo en la medida en que estén comprendidas en el alcance de las reivindicaciones.

Breve resumen de la invención

30 La presente invención proporciona un método de detección *in vitro* de la presencia de daño en el ADN o la presencia de la respuesta biológica al daño en el ADN a nivel molecular. Dicho método comprende el uso del rastreo molecular, u otros métodos de estiramiento de ácidos nucleicos o métodos similares (en los que el estiramiento del ácido nucleico comprende la elongación de la molécula hasta la longitud de su contorno o más) junto con compuestos que reaccionan con el ADN, sondas de unión al ADN o monómeros de ácido nucleico, especialmente monómeros de ácido nucleico marcados. Estos métodos pueden proporcionar, al mismo tiempo, sensibilidad a bajos niveles de daño y alta precisión en la cuantificación tanto del daño como de la capacidad de reparación.

35 También se proporcionan métodos de cuantificación *in vitro* de la presencia de daño en el ADN o la presencia de la respuesta biológica al daño en el ADN. Dicha cuantificación se puede realizar de una manera directa o indirecta: en el primer caso, las entidades diana se visualizan directamente y se cuentan; en el segundo caso, la cantidad de entidades diana se deduce comparando un perfil de la muestra con un perfil de referencia.

40 Estos métodos también se pueden usar para determinar la ubicación genómica del daño en un ácido nucleico o para evaluar las respuestas al daño en el ADN por medio de la hibridación del ADN.

45 Se proporcionan métodos para seguir *in vitro* la presencia de daño o la respuesta al daño en el ADN tras el tratamiento con un agente genotóxico o antimicrobiano como ensayos auxiliares, por ejemplo, para la evaluación de la eficacia de un fármaco antimicrobiano o contra el cáncer. Los métodos desvelados se aplican como ensayos auxiliares cuando el efecto de un compuesto de interés consiste en una acción directa sobre el ADN o en una vía de reparación específica. También sirven como ensayos auxiliares cuando el compuesto de interés se dirige a un factor relacionado o vía de señalización relacionada, cuyo funcionamiento alterado puede influir en la respuesta global de la célula a la exposición genotóxica o a otros mecanismos implicados en la generación o la persistencia del daño en el ADN.

50 Se desvelan kits que son útiles para la práctica de estos métodos, que comprenden los elementos necesarios para llevar a cabo un método de la invención, en particular, los elementos necesarios para la detección de la lesión o reparación diana en las moléculas estiradas. Dichos elementos detectables pueden actuar sobre la lesión o la reparación diana sustituyéndola, uniéndose a ella o convirtiéndola en una extremidad molecular.

55 La sustitución de la diana surge cuando la entidad diana del ácido nucleico se reemplaza parcial o completamente por un elemento detectable. Los ejemplos de elementos detectables que sustituyen los ácidos nucleicos dañados o reparados diana comprenden: nucleótidos y nucleósidos modificados químicamente o marcados, que portan una molécula de biotina, una molécula de digoxigenina, una molécula de avidina, una molécula de transferencia con carga eléctrica, un nanocristal semiconductor, una nanopartícula semiconductor, un nanocristal de oro coloidal, un ligando, una nanopera, una micropera, una perla magnética, una partícula paramagnética, un punto cuántico, un sustrato cromogénico, un hapteno, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un lípido, un complejo metálico, un complejo de Rh, un complejo de Ru o cualquier combinación de los mismos. El reemplazo de una entidad diana por un elemento detectable tiene lugar en presencia de una o más enzimas capaces de escindir la lesión del ácido

nucleico y reemplazarlo por el ácido nucleico recién sintetizado que contiene uno o más elementos detectables. Estas enzimas están presentes dentro de las células vivas, dentro de extractos de células o pueden sintetizarse *in vitro*. La escisión puede realizarse también usando soluciones alcalinas u otros tratamientos químicos, seguidos de la incorporación enzimática de un elemento detectable en el ácido nucleico.

5 La unión tiene lugar cuando el elemento detectable se sitúa y se une al ácido nucleico en correspondencia con la entidad diana, espontáneamente o mediante la acción de una enzima. La unión puede seguir a la modificación covalente de la entidad diana, o uniones no covalentes tales como interacciones o formación de complejos de anticuerpo-ligando. La entidad diana se puede modificar químicamente a través de la unión, pero no se escinde del
10 ácido nucleico. Los ejemplos de elementos detectables que se unen con los ácidos nucleicos dañados o reparados diana comprenden: un nucleótido o nucleósido modificado químicamente o marcado, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un lípido, un complejo metálico, un complejo de Rh, un complejo de Ru, una molécula capaz de reaccionar químicamente con la entidad diana o cualquier combinación de los mismos. Las sustancias mencionadas se detectan directamente o portan una molécula que permite la detección, tal como una molécula de biotina, una
15 molécula de digoxigenina, una molécula de avidina, una molécula de transferencia con carga eléctrica, un nanocrystal semiconductor, una nanopartícula semiconductor, un nanocrystal de oro coloidal, un ligando, una nanoperla, una microperla, una perla magnética, una partícula paramagnética, un punto cuántico, un sustrato cromogénico, un hapteno, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un lípido, un complejo metálico, un complejo de Rh, un complejo de Ru o cualquier combinación de los mismos.

20 La conversión en una extremidad molecular tiene lugar mediante la escisión de la molécula de ácido nucleico en correspondencia con las entidades diana. Los fragmentos resultantes de la molécula de ácido nucleico inicial tienen nuevas extremidades moleculares, que constituyen los elementos detectables. La conversión de la diana en una extremidad molecular se puede inducir mediante tratamiento químico, tratamiento térmico, tratamiento enzimático o cualquier combinación de los mismos. Cualquier tipo de extremidad molecular constituye un elemento detectable:
25 extremidad de ácido nucleico dúplex, extremidad de ácido nucleico no dúplex, "extremidades cohesivas", extremidad de tipo enzima de restricción y extremidad de ácido nucleico romo.

30 Se desvelan métodos de detección o de diagnóstico del daño (alteración o pérdida) en la estructura o secuencia de ADN o de otro ácido nucleico. Dicho daño desencadena vías de señalización que conducen a una alteración en el ciclo celular normal. La presente invención se refiere a la detección de dicho daño tanto en las células capaces de restablecer el progreso normal del ciclo celular después de la reparación como en las células que carecen de actividad de reparación normal (por ejemplo, células cancerosas, células que carecen de vías de reparación específicas). La presente invención también se refiere a la detección de los sitios del ácido nucleico que han sido
35 reparados tras un daño. El método de la invención permite seguir la actividad de reparación en las células tanto normales como anormales, evaluar la capacidad de reparación de los sistemas de reparación seleccionados, medir la eficacia de reparación, la cinética y la influencia de los factores ambientales.

40 En otro aspecto, se desvelan métodos que permiten evaluar los efectos de un agente genotóxico o un compuesto citotóxico en una muestra biológica, en términos de cuantificación del daño inducido y reparado, y la localización de dichos hechos en el ADN. El presente método también es útil para predecir la muerte celular o la pérdida de la actividad normal debido a una reparación insuficiente o alterada del daño inducido por un agente genotóxico.

45 Otros aspectos de la invención incluyen un método de detección de la presencia o de la ausencia de una secuencia reparada, dañada, alterada o mutada en un ácido nucleico que comprende: (a) extraer uno o más ácidos nucleicos de una muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra extraída; (b) estirar el al menos un ácido nucleico en dicha muestra extraída; (c) añadir una sustancia detectable al ácido nucleico estirado, sustancia que se sitúa en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; (d) detectar la sustancia detectable en el ácido nucleico estirado; y (e)
50 detectar la presencia de ácido nucleico dañado o reparado cuando dicha sustancia se detecta y detectar la ausencia de una secuencia de ácido nucleico dañada o reparada cuando dicha sustancia detectable no se detecta; o (a) extraer uno o más ácidos nucleicos de una muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra extraída, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácido nucleico extraída; (b) añadir una sustancia detectable a dicho ácido nucleico durante un tiempo y en condiciones suficientes para la interacción, sustancia que se sitúa en una o
55 más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácido nucleico tras ponerla en contacto con la sustancia detectable; (c) estirar el al menos un ácido nucleico en dicha muestra de ácido nucleico interaccionada; (d) detectar la sustancia detectable en el ácido nucleico estirado; y (e) detectar o diagnosticar la presencia de ácido nucleico dañado o reparado cuando dicha sustancia se detecta y detectar o diagnosticar la ausencia de una secuencia de ácido nucleico dañada o reparada cuando dicha sustancia detectable no se detecta; o
60 (a) tratar una muestra que contiene células antes de la extracción de los ácidos nucleicos de dicha muestra mediante la adición de una sustancia detectable durante un tiempo y en condiciones suficientes para la interacción con los ácidos nucleicos, sustancia que se sitúa en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; (b) extraer uno o más ácidos nucleicos de una muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácidos nucleicos extraída; (c) estirar el al menos un ácido nucleico en dicha muestra de ácido nucleico interaccionada; (d) detectar la sustancia

detectable en el ácido nucleico estirado; y (e) detectar o diagnosticar la presencia de ácido nucleico dañado o reparado cuando dicha sustancia se detecta y detectar o diagnosticar la ausencia de una secuencia de ácido nucleico dañada o reparada cuando dicha sustancia detectable no se detecta.

5 En los métodos descritos anteriormente, la sustancia se puede situar en una o más partes dañadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; puede situarse en una o más partes reparadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; puede situarse en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante sustitución; puede situarse en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante la unión al mismo; o situarse en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante su conversión en una extremidad molecular.

10 Estos métodos se pueden dirigir además al diagnóstico de una enfermedad, un trastorno o una afección mediante la detección de una parte dañada o reparada en el ácido nucleico; o dirigirse al diagnóstico de la recuperación de una enfermedad, un trastorno o una afección mediante la detección de una parte dañada o reparada en el ácido nucleico. Estos métodos también se pueden usar para detectar modificaciones en el genoma de las células de ensayo cultivadas *in vitro* cuando se exponen a un agente o condición que modifica o altera sus componentes genómicos.

15 Las muestras usadas en estos métodos no tienen ninguna limitación en particular, siempre que contengan ácido nucleico e incluyan muestras de tejido, o muestras de sangre, de líquido cefalorraquídeo, de líquido sinovial o de linfa. Las muestras se pueden obtener de sujetos en necesidad de diagnóstico de una enfermedad, un trastorno o una afección en particular incluyendo sujetos que tienen enfermedades o trastornos genéticos, cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes o trastornos inflamatorios, o que se hayan sometido al tratamiento de estas enfermedades o trastornos. Las muestras pueden extraerse en un momento determinado o extraerse longitudinalmente durante un período de tiempo para detectar las diferencias entre las células producidas debido al envejecimiento, la exposición repetida a determinados agentes u otros cambios dependientes del tiempo.

20 En otra realización, este método implicará (a) hibridar una o más sondas específicas de secuencias correspondientes a una o más posiciones o regiones conocidas específicas del ácido nucleico y, opcionalmente, (b) medir la distancia o la distribución espacial entre las sondas hibridadas y los elementos detectables correspondientes a una o más secuencias de ácido nucleico dañadas o reparadas.

25 En otra realización, la invención se dirige a un proceso de determinación del efecto de un agente de ensayo o un compuesto citotóxico en una secuencia de ácido nucleico de una célula, que engloba poner en contacto la célula con dicho agente de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que repare, dañe, altere o mute el ácido nucleico de la célula, y detectar un ácido nucleico reparado, dañado, alterado o mutado de dicha célula mediante el método de la reivindicación 1; en el que el ácido nucleico reparado, dañado, alterado o mutado se puede evaluar comparándolo con el ácido nucleico de una célula idéntica por lo demás que no se haya expuesto a dicho agente de ensayo. Este método puede comprender además la selección de un agente de ensayo que repare, dañe, altere o mute un ácido nucleico de la célula o de un segundo agente que inhiba, mejore o modifique las acciones de dicho agente de ensayo. Un agente de ensayo puede ser un compuesto genotóxico o un agente físico tal como una radiación ionizante tal como rayos UV, rayos X o rayos gamma. En general, los métodos descritos en el presente documento se ponen en práctica con células eucariotas y ADN extraído de dichas células, aunque es posible usar otros tipos de células o ácidos nucleicos. En la aplicación del método, la comparación normalmente se realiza entre una muestra celular de control o una muestra molecular de control que contiene los ácidos nucleicos de control, y una muestra celular de ensayo o una muestra molecular de ensayo que contiene el ácido nucleico alterado. Para evaluar el efecto de un agente de ensayo, los ácidos nucleicos de control normalmente se obtienen del mismo tipo y de la misma cantidad de células que están contenidas en la muestra de ensayo, pertenecientes al mismo individuo, extraídas del mismo tipo de tejido, pero no expuestas al agente de ensayo. Para evaluar la susceptibilidad intrínseca al daño o la capacidad de reparación de una muestra de ensayo, los ácidos nucleicos de control normalmente se obtienen del mismo tipo y de la misma cantidad de células que están contenidas en la muestra de ensayo, pero aisladas de tejido aparentemente sano del mismo tipo y posiblemente pertenecientes a un mismo individuo o a individuos de edad y raza similares. Los criterios pertinentes que permiten la distinción entre los controles y los ácidos nucleicos alterados incluyen, pero sin limitación: la cantidad de entidades diana detectadas en un momento determinado o a lo largo de un período de tiempo; la distribución molecular local de las entidades diana detectadas en un momento determinado o a lo largo de un período de tiempo; la correlación entre la distribución molecular local y la persistencia/desaparición con el tiempo de las entidades diana detectadas; la posición genómica de las entidades diana detectadas; la correlación entre la posición genómica y la persistencia/desaparición con el tiempo de las entidades diana detectadas; la correlación entre los procesos celulares y la persistencia/desaparición en el tiempo de las entidades diana detectadas; la correlación entre la estructura molecular local del ácido nucleico y la persistencia/desaparición en el tiempo de las entidades diana detectadas; la correlación entre la organización nuclear del ácido nucleico y la persistencia/desaparición en el tiempo de las entidades diana detectadas, donde una entidad diana puede corresponder a una lesión, un daño, una lesión reparada o una respuesta biológica a un daño encontrado en las muestras de ácido nucleico estudiadas.

Otra realización es un proceso de prevención, profilaxis, tratamiento o terapia de un organismo o huésped que comprende la administración de un agente de ensayo seleccionado mediante los métodos descritos anteriormente. Como se ha mencionado anteriormente, dicho organismo o huésped normalmente será un organismo eucariota.

- 5 También se contemplan kits que comprenden uno o más ingredientes útiles para poner en práctica el método descrito en el presente documento, y contendrán al menos un elemento detectable que se sitúa en una o más partes dañadas o reparadas de un ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; uno o más reactivos adecuados para la visualización del al menos un elemento detectable; y una o más sondas que se unen a lugares específicos de un ácido nucleico; y, opcionalmente, uno o más reactivos usados para el estiramiento de un ácido nucleico.

Breve descripción de las figuras

- 15 Figura 1: Distribución de la longitud de las moléculas de ADN rastreadas tras la exposición a UV-C. La longitud de las moléculas de ADN tras el rastreo molecular se ve influida por el número de "regiones frágiles" a lo largo del ADN, ya que aumentan la probabilidad de fragmentación del ADN durante la manipulación. El daño inducido por la exposición a la radiación UV crea dichos "sitios frágiles" de una manera dependiente de la dosis. Las curvas muestran los efectos de este fenómeno: cuando se aumenta la dosis de UV (de 150 (gris) a 250 J/m² (negro)), la longitud de las moléculas de ADN rastreadas se reduce progresivamente.

- 20 Figura 2: Ejemplo de señales de replicación observadas en el ADN rastreado extraído de fibroblastos humanos normales tras 30 min de incubación con BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina, en blanco) y 30 min de incubación con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina, en negro). BrdU se detecta usando una técnica de inmunofluorescencia de dos capas, mientras que EdU se detecta mediante la reacción química con los fluoróforos (que aparece en negro). Las señales blancas de anticuerpos aparecen discontinuas cuando se comparan con las señales negras producidas por la detección química. Por otra parte, la adsorción no específica de anticuerpos fluorescentes produce un fondo irregular, que no se observa para el canal negro.

- 30 Figura 3: Ejemplo de señales de EdU (que aparecen en negro) observadas en el ADN rastreado extraído de fibroblastos normales humanos tras la exposición a UV-C y 1 hora de incubación con EdU. La señal negra lineal corresponde a la replicación del ADN, y la señal negra irregular a la UDS (síntesis de ADN no programada). El ADN se tiñe con colorante YOYO-1 (que aparece en blanco).

- 35 Figura 4: Evolución del número de la señal irregular y de su distancia media en el genoma con el aumento de la exposición a UV-C. El número de sitios de la UDS aumenta exponencialmente con la dosis de UV-C (A), según lo confirma la reducción lineal de su distancia media en las moléculas de ADN rastreadas (B). La capacidad de reparación de escisiones de nucleótidos (NERCA) parece constante hasta la dosis de UV-C de ensayo. Una desviación del perfil lineal se interpreta como una variación en la NERCA de la muestra celular estudiada.

- 40 Figura 5: Evolución de la frecuencia de las señales de la UDS detectadas en el ADN rastreado extraído de fibroblastos humanos normales HS 707 (B) y fibroblastos deficientes en la reparación de las escisiones de nucleótidos XP17BE expuestos a cuatro dosis de luz UV-C. La aparición de una síntesis UDS fue modelizada como una variable de Poisson. Las barras de error corresponden a los límites de confianza de Poisson. Se observa la saturación en la frecuencia de las reparaciones para la muestra competente en la reparación tras una dosis crítica de 20 J/m² de UV-C.

- 50 Figura 6: Evolución del tamaño de los parches de la UDS con la dosis de UV-C. La representación gráfica de las distribuciones del contenido de fluorescencia de las señales de UDS tras la normalización interna de los fibroblastos normales (izquierda) y para las células XP-C (derecha). Los histogramas se representan en forma de curvas continuas para facilitar la visualización.

- 55 Figura 7: Detección de las extremidades moleculares (asociados a la RDC) y RUC en el ADN del fago lambda rastreado. Se marcaron previamente los extremos 3'-OH durante 3 horas usando la enzima TdT y BrdUTP. El tamaño de la cola se estima en 150-200 monómeros de BrdUTP. La señal negra es producida por anticuerpos anti-BrdU marcados con fluorescencia. El ADN se tiñe con YOYO-1 (que aparece en blanco).

- 60 Figura 8: Desviación relativa del perfil de fragmentación revelada por el tratamiento con la enzima formamidopirimidina-ADN glicosilasa (Fpg) en 5 muestras de ADN humano extraídas de células expuestas a dosis en incrementos de H₂O₂. La figura de la izquierda muestra la distribución de los tamaños (eje X) de fragmentos de ADN en cada muestra. Las distribuciones se ajustaron usando exponenciales de la desintegración $y = Ae^{-x/\tau}$ a y la evolución de las constantes de desintegración τ se ilustra en el gráfico de la derecha.

- 65 Figura 9: Enfoque teórico para la estimación de la cantidad de RDC generadas mediante la exposición a la radiación ionizante. Para facilitar la identificación de las extremidades moleculares inducidas por la radiación (Bio RDC); la fragmentación aleatoria del ADN inducida por la manipulación (RDC de cizalla) se reduce al mínimo mediante la introducción de una etapa de digestión con endonucleasas de restricción (ER). La digestión con ER permite reducir

el tamaño del ADN en el tamaño crítico de cizalla y las extremidades de ER (RDC de ER) se pueden marcar para identificarlas de forma inequívoca tras el estiramiento del ADN. Las pocas extremidades no identificadas restantes contienen la RDC original, inducida por la radiación, que se puede cuantificar comparándola con el perfil de referencia.

5 Descripción detallada de la invención

10 Los ensayos de alta sensibilidad son cruciales para los estudios generales de biomonitorización. El nivel basal de daño en el ADN se ve influido por una variedad de estilos de vida y exposiciones ambientales, incluyendo el ejercicio, la contaminación del aire, la luz del sol y la dieta. Las condiciones de vida normales son responsables de daños constantes, pero a dosis bajas, sobre el ADN que impactan directamente en los procesos celulares. En este contexto, el método de la invención es una solución útil para la detección de la exposición genotóxica en los seres humanos, y proporciona una herramienta eficaz para la caracterización de los compuestos y los riesgos en la evaluación del riesgo público. También se requiere una alta sensibilidad en el campo de la dermatología y la cosmética: a diferencia de otros órganos, la piel está en contacto directo con el medio ambiente y, por tanto, envejece como consecuencia de los daños ambientales. El factor ambiental principal que provoca el envejecimiento de la piel humana es la radiación UV del sol. El fotoenvejecimiento y la fotosensibilidad de la piel se correlacionan con el desarrollo del cáncer de piel, y se han convertido en un problema social para varios países. Se necesita una mejor caracterización de los tipos de piel y de la respuesta a la exposición solar para desarrollar pantallas más eficaces con protección la radiación UV. En el Ejemplo 2, el método de la invención se usa con éxito para visualizar la reparación de daños individuales o agrupados producidos en las células normales de la piel expuesta a la radiación UV, con una resolución jamás alcanzada con anterioridad.

25 La quimioterapia y la radioterapia tienen por objetivo la generación de daños en el ADN de alta importancia, para inducir selectivamente las células cancerosas a la muerte, aprovechando sus sistemas de reparación defectuosos. El método de la invención, que permite la cuantificación rápida y exacta de la proporción de los sitios dañados/reparados, representa una herramienta valiosa para la predicción de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de los pacientes. La evaluación exacta de los daños solo representaría un comienzo en el complejo campo de la terapia personalizada: la relación entre la respuesta molecular a los daños y la respuesta celular es compleja y depende de una serie de factores además de la importancia de los daños: el tipo de célula (tipo de tejido normal, cáncer), el momento del ciclo celular, el medio ambiente celular (Gerweck, Vijayappa *et al.* 2006). La variabilidad individual introduce un segundo grado de complejidad, que es muy amplia en este campo y hace de la correlación de la respuesta celular con la respuesta clínica una ardua labor (Stausbol-Gron y Overgaard 1999).

35 Al igual que en la terapia del cáncer, el daño del ADN es la diana citotóxica de muchos fármacos antimicrobianos. El ejemplo más importante es la gran familia de las fluoroquinolonas, que son los únicos inhibidores directos de la síntesis de ADN microbiano. Las fluoroquinolonas actúan uniéndose al complejo de enzima-ADN y estabilizan las roturas de las cadenas de ADN creadas por la ADN girasa y la topoisomerasa IV (Hooper, 2001). Debido a que la resistencia a los fármacos antimicrobianos es generalizada, resultan vitales la comprensión de sus mecanismos de acción y un control de calidad preciso. También en este contexto, el método de la invención resulta valioso para la evaluación exacta de la eficacia de los fármacos antimicrobianos, de la especificidad, y para el estudio de los factores que intervienen en el desarrollo de la resistencia a los fármacos.

45 El método de la invención es particularmente interesante por su potencial para detectar y analizar, al mismo tiempo, los diferentes tipos de daños o de respuestas al daño. En la actualidad, ningún ensayo es capaz de describir el daño del ADN por completo, debido a la variedad de las lesiones del ADN y al hecho de que son dirigidas por diferentes mecanismos, y tienen diferentes potenciales mutagénicos y cinéticas de reparación. Existen dos enfoques principales para analizar el daño del ADN: el primer grupo incluye las técnicas que identifican los tipos específicos de lesiones del ADN; el segundo grupo comprende ensayos bioquímicos centrados en la medición de los efectos del daño del ADN.

50 Los ejemplos del primer grupo comprenden el uso de técnicas de calibrado del ADN combinadas con un tratamiento enzimático selectivo dirigido a lesiones específicas del ADN y su conversión en RDC o RUC (Collins 2004). El perfil de la fragmentación del ADN resultante se puede obtener mediante técnicas tradicionales como la transferencia de Southern (Bohr, Smith *et al.* 1985), la electroforesis en gel de campo pulsado (Cedervall, Wong *et al.* 1995) o medios de mayor rendimiento como la detección fluorescente en un microchip (Filippova, Monteleone *et al.* 2003). Estas técnicas carecen de sensibilidad para la detección de eventos de baja frecuencia (como las RDC) debido a su naturaleza voluminosa (la señal media de un grupo de moléculas procedentes de más de una célula). Por otra parte, los tamaños de los fragmentos se extrapolan de la medición de la intensidad de fluorescencia, lo que reduce drásticamente la exactitud y la precisión del calibrado. Finalmente, los fragmentos de ADN se manipulan en la forma enrollada, lo que impide los estudios de localización.

65 La electroforesis en gel de una sola célula (SCGE, también denominada ensayo del cometa) es una herramienta versátil que permite la evaluación de bajos niveles de daño al nivel de una sola célula. Las células se extienden sobre una superficie y se introducen en gel de agarosa. Las membranas celulares se permeabilizan en presencia de un compuesto que tiñe el ADN, y se aplica un campo eléctrico. El concepto básico es que el ADN dañado (en

particular, las cadenas rotas localmente) puede relajarse y migrar cuando se aplica el campo eléctrico, mientras que el ADN intacto conserva su organización en las proteínas de compactación y no sale del núcleo. Las células observadas por microscopía de fluorescencia se ven como "cometas", cuyo tamaño de la cola corresponde a la cantidad de ADN que sale de la cavidad y es una medida de la cantidad del daño en el ADN en la célula (Ostling y Johanson 1984). Cuando se acopla a tratamientos químicos (Singh, McCoy *et al.* 1988) o enzimáticos (Collins, Dobson *et al.*, 1997), la SCGE puede proporcionar alta sensibilidad y especificidad para ciertos tipos de daños. El inconveniente es su carácter cualitativo: la extensión del daño en el ADN se estima mediante la comparación visual o la comparación con ayuda de un software de la intensidad de la fluorescencia en la cabeza del cometa (ADN intacto) y en la cola (ADN dañado) (Collins, 2004).

Recientemente, los ensayos inmunoquímicos han permitido la visualización directa y la cuantificación de bajos niveles de RDC dentro de las células fijas. El más ampliamente empleado es la inmunodetección de la forma γ -fosforilada de la histona H2AX, que se sabe que se forma muy rápidamente cuando se genera una RDC (Rogakou, Pilch *et al.* 1998). Estas técnicas son las más sensibles y directas, pero son complicadas de realizar desde un punto de vista experimental y no son aptas para su uso clínico.

Los sitios abásicos se pueden marcar directamente con haptenos como la biotina a través de una reacción química con reactivos de sonda reactiva con aldehídos (ARP) (Nakamura, Walker *et al.*, 1998; Kurisu, Miya *et al.*, 2001). Las lesiones de bases (por ejemplo, 8-OH-Guanina) se pueden detectar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o mediante espectrometría de masas-GC (Dizdaroglu, 1984).

El segundo grupo de métodos se dirige, en general, a mecanismos que están bloqueados por la presencia de daño en el ADN. Por consiguiente, a menudo dan puntos de vista sobre la importancia biológica de los daños investigados y sus consecuencias en términos de mutagénesis.

Los ensayos de PCR de largo alcance extrapolan la cantidad y el impacto de los daños midiendo la reducción de la amplificación de una secuencia representativa. Cuando una polimerasa se encuentra con una lesión en la secuencia monitorizada, la amplificación se detiene. El resultado es una reducción proporcional al daño de la eficacia de la amplificación (Lisby, Gniadecki *et al.*, 2005). Su sensibilidad depende de la cantidad del daño y de las limitaciones de la técnica de PCR.

Los ensayos de mutagénesis suelen basarse en la transfección de células con un plásmido que contiene un gen indicador. Los daños convertidos en mutaciones provocarán el silenciamiento génico, dando como resultado una reducción de la cantidad de producto génico (White y Sedgwick, 1985). Estos métodos permiten la evaluación de la relevancia biológica de los daños inducidos a la célula y pueden proporcionar modelos para estudiar la reparación por recombinación. Sin embargo, solo se pueden realizar *in vitro* limitando la posibilidad de usarlos en el tejido humano.

La detección de la reparación de daños específicos se puede realizar de una manera directa cuando implica la síntesis de ADN no programada (UDS), es decir, para los sistemas BER y NER. La síntesis de ADN no programada (UDS) se refiere a la síntesis de ADN que se produce como una respuesta específica, local, inducida por la presencia de una alteración en la estructura de la molécula de ADN. Los parches producidos durante la UDS se definen como no programados para distinguirlos del ADN replicado normal, que se considera una actividad celular programada. En el caso de BER, el ensayo se suele realizar *in vitro* usando proteínas reconstituidas y nucleótidos radiomarcados. Los recuentos de la radiactividad permiten estimar el número de lesiones de bases que se han reparado (Srivastava, Berg *et al.* 1998). Los ensayos *in vivo* requieren sistemas que usan plásmidos, que normalmente portan una lesión química definida (Sattler, Frita *et al.*, 2003). En el caso de los parches de NER, los ensayos se realizan en las células vivas, proporcionándoles nucleósidos marcados de diferentes tipos como se describe en más detalle a continuación en el Ejemplo 2.

En muchos casos, las capacidades de reparación se deducen indirectamente estudiando la evolución de los sitios dañados durante diferentes tiempos de reparación.

El método de la invención es más exhaustivo y flexible que los ensayos mencionados, ya que permite la detección tanto directa como indirecta de los daños y de la reparación a la vez. Se pueden estudiar y cuantificar daños y reparaciones específicos mediante la combinación de tres estrategias diferentes de moléculas de ADN estiradas. Con el primer enfoque, la detección de la lesión o de la reparación se realiza a través de la sustitución parcial o total de la diana (es decir, la alteración seleccionada de la molécula de ADN) con un elemento detectable; el segundo enfoque se basa en un elemento detectable que se une específicamente a la diana; y el tercer enfoque consiste en la transformación de la diana en una extremidad molecular. Los procedimientos experimentales detallados para la aplicación de estas tres estrategias se proporcionan, respectivamente, en los Ejemplos 2, 3 y 4.

El método de la invención permite evaluar la detección de múltiples lesiones o lesiones reparadas en moléculas de ADN de forma fiable, de una manera que requiere poco tiempo y que es rentable, y con pequeñas cantidades de diversos materiales de partida: ADN comercial, partículas virales, parásitos, células procariotas, células eucariotas cultivadas, sangre y biopsia de tejido de un organismo eucariota u hospedador (es decir, plantas, hongos o animales

incluyendo seres humanos). El rastreo molecular es una potente técnica que permite la visualización directa de las moléculas individuales, y se ha usado con éxito para el estudio de la cinética de replicación mediante la visualización directa del ADN recién sintetizado (Herrick, Conti *et al.* 2005) y para estudios de cartografía del genoma (Conti, Bensimon, 2002). Se ha sugerido que el uso de la elongación del ADN mediada por nanocanales como herramienta para la investigación del daño y la reparación en el ADN proporciona una alternativa a las técnicas de calibrado de los fragmentos como PFGE o la intensidad de la fluorescencia (documento WO/2008/121828). A diferencia del rastreo molecular, todos estos métodos de calibrado basados en la PFGE, moléculas individuales que fluyen en micro- (Filippova, Monteleone *et al.*, 2003) o nano-canales (Tegenfeldt, Prinz *et al.*, 2004) no permiten el procesamiento posterior de las moléculas de ADN, y los estudios de hibridación son muy difíciles de realizar. Además, estos métodos no proporcionan o solo proporcionan la elongación parcial de las moléculas de ADN. Por consiguiente, la longitud de los fragmentos de ADN se ha de estimar a partir de las mediciones de la intensidad de la fluorescencia, lo que reduce la resolución y la precisión de la medición en comparación con las técnicas de estiramiento del ADN. Nada anticipa el uso del rastreo molecular u otras técnicas de estiramiento del ADN como herramientas de alta resolución, visualización directa y localización genómica de los sitios del ADN en los que se han producido los daños y la reparación biológica. Cao *et al.* intentaron construir perfiles de fragmentación específicos mediante la conversión de los sitios dañados en RDC y la medición de la longitud de los fragmentos de ADN parcialmente elongados resultantes (documento WO/2008/121828, documento US 7.670.770). Ninguna de estas publicaciones menciona la posibilidad ya sea de detectar directamente y de contar los sitios dañados o sitios reparados en los ácidos nucleicos estirados o de estimar indirectamente la cantidad de daño mediante la determinación de la distribución del tamaño de los fragmentos estirados. Además, nada sugiere la aplicación de la hibridación del ADN en el ADN elongado o estirado para investigar la distribución de los daños y la reparación con respecto a la secuencia del genoma o la organización de la cromatina.

Los inventores han demostrado que el rastreo molecular, que permite un análisis de alta resolución del ácido nucleico estirado, se puede aplicar con éxito para la detección directa e indirecta, la cuantificación y la localización genómica de la presencia de sitios dañados (alteraciones o pérdidas en la secuencia o estructura de un ácido nucleico) y los sitios reparados (sitios dañados reconvertidos en la forma original o en una forma normal por los sistemas celulares) en moléculas de ADN estiradas, algo que no se ha sugerido con anterioridad. El método de la invención que implica el estiramiento de ADN, y en particular, el rastreo molecular, es el único método, hasta la fecha, que permite la visualización directa, la cuantificación precisa y la localización de los eventos distribuidos en el ADN a distancias aleatorias (de 1 base a varios millones de bases) con una resolución de al menos 500 pb debido al límite óptico actual de las imágenes de fluorescencia. Los principios de la presente invención no pueden verse limitados por las limitaciones del método de marcaje de fluorescencia y detección que existe en la actualidad.

Aspectos específicos de la invención incluyen un método de detección de la presencia o de la ausencia de una secuencia reparada, dañada, alterada o mutada en un ácido nucleico que comprende: (a) extraer uno o más ácidos nucleicos de una muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra extraída; (b) estirar el al menos un ácido nucleico de dicha muestra extraída; (c) añadir una sustancia detectable al ácido nucleico estirado, sustancia que se sitúe en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; (d) detectar la sustancia detectable en el ácido nucleico estirado; y (e) detectar la presencia de ácido nucleico dañado o reparado cuando dicha sustancia se detecta y detectar la ausencia de una secuencia de ácido nucleico dañada o reparada cuando dicha sustancia detectable no se detecta. Como alternativa, dicho método puede comprender (a) extraer uno o más ácidos nucleicos de una muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra extraída, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácido nucleico extraída; (b) añadir una sustancia detectable a dicho ácido nucleico durante un tiempo y en condiciones suficientes para la interacción, sustancia que se sitúe en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácido nucleico tras ponerla en contacto con la sustancia detectable; (c) estirar el al menos un ácido nucleico en dicha muestra de ácido nucleico interaccionada; (d) detectar la sustancia detectable en el ácido nucleico estirado; y (e) detectar o diagnosticar la presencia de ácido nucleico dañado o reparado cuando dicha sustancia se detecta y detectar o diagnosticar la ausencia de una secuencia de ácido nucleico dañada o reparada cuando dicha sustancia detectable no se detecta. Como alternativa, dicho método puede comprender: (a) tratar una muestra celular antes de la extracción de los ácidos nucleicos de dicha muestra mediante la adición de una sustancia detectable durante un tiempo y en condiciones suficientes para la interacción con los ácidos nucleicos, sustancia que se sitúe en una o más partes dañadas o reparadas del ácido nucleico mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular; (b) extraer uno o más ácidos nucleicos de dicha muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácidos nucleicos extraída; (c) estirar el al menos un ácido nucleico en dicha muestra de ácido nucleico interaccionada; (d) detectar la sustancia detectable en el ácido nucleico estirado; y (e) detectar o diagnosticar la presencia de ácido nucleico dañado o reparado cuando dicha sustancia se detecta y detectar o diagnosticar la ausencia de una secuencia de ácido nucleico dañada o reparada cuando dicha sustancia detectable no se detecta. Ambos métodos anteriores pueden emplear una sustancia que se sitúe en una o más partes dañadas del ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o su conversión en una extremidad molecular. Estos métodos pueden comprender etapas específicas tales como la hibridación de una o más sondas específicas de secuencia correspondiente a una o más posiciones o regiones conocidas específicas en el ácido nucleico, y/o la medición de la distancia o la distribución espacial entre las sondas hibridadas y los elementos detectables correspondientes a una o más secuencias de ácido nucleico dañadas o

reparadas.

Estos métodos también pueden comprender el diagnóstico de una enfermedad, un trastorno o una afección mediante la detección de una parte dañada o reparada en el ácido nucleico; o comprender el diagnóstico de la recuperación de una enfermedad, un trastorno o una afección mediante la detección de una parte dañada o reparada en el ácido nucleico. También se puede evaluar el daño producido en el ácido nucleico como resultado del envejecimiento o usarlo por un forense para determinar la edad de un sujeto.

En el método, se usan muestras que contienen ácidos nucleicos, y se pueden obtener de una fuente *in vitro* o *in vivo* tal como de una muestra de tejido o de sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o linfa de un sujeto. Los sujetos pueden ser sujetos normales o aquellos que tienen enfermedades o trastornos tales como cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria, o el tratamiento previo o en curso de estas enfermedades o trastornos. Las muestras también se pueden adquirir en un período de tiempo, por ejemplo, para evaluar las alteraciones relacionadas con el tratamiento o relacionadas con el envejecimiento en los ácidos nucleicos celulares. Las muestras se pueden expandir, procesar o tratar antes de la extracción de los ácidos nucleicos.

Un proceso para determinar el efecto de un agente de ensayo en una secuencia de ácido nucleico de una célula que comprende poner en contacto la célula con dicho agente de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que reparare, dañe, altere o mute el ácido nucleico de la célula, y detectar un ácido nucleico reparado, dañado, alterado o mutado de dicha célula mediante los métodos descritos en el presente documento; en el que el ácido nucleico reparado, dañado, alterado o mutado se puede evaluar comparándolo con el ácido nucleico de una célula idéntica por lo demás que no se haya expuesto a dicho agente de ensayo. Dichos métodos se pueden usar para identificar nuevos agentes, o identificar y seleccionar entre los agentes agrupados o existentes uno que repare, dañe, altere o mute un ácido nucleico de una célula en particular. Las células representativas incluyen células eucariotas, células de mamífero, incluyendo las de animales domésticos o de granja, y seres humanos. Los métodos del presente documento pueden ponerse en práctica con diferentes ácidos nucleicos. En general, las muestras de ADN se usarán más convenientemente debido a su estabilidad. Los efectos de los agentes genotóxicos, genorreparadores o estabilizantes, incluyendo los compuestos químicos o diversas formas de agentes físicos, tales como la radiación ionizante genotóxica, se pueden rastrear a nivel molecular, y su resultado final sobre los procesos celulares puede estar relacionado con sus mecanismos de acción sobre los ácidos nucleicos. Los agentes identificados y caracterizados mediante los métodos desvelados en el presente documento se pueden usar para tratar a un sujeto.

Se pueden formular kits que comprenden uno o más ingredientes útiles para la práctica de los métodos desvelados en el presente documento, opcionalmente, con instrucciones sobre cómo usarlos para la práctica de estos métodos, y recipientes apropiados y materiales de envasado para los componentes que contienen. Estos kits pueden contener elementos necesarios para realizar las diferentes etapas de los métodos, tales como una combinación que comprende al menos un elemento detectable que se sitúa en una o más partes dañadas o reparadas de un ácido nucleico estirado mediante la sustitución, la unión al mismo o la conversión en una extremidad molecular; uno o más reactivos adecuados para la visualización de al menos un elemento detectable; y una o más sondas que se unen a lugares específicos de un ácido nucleico; y, opcionalmente, uno o más reactivos usados para el estiramiento de un ácido nucleico.

Otro aspecto de la invención se refiere a un ensayo de detección del daño y de la reparación en el ADN *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente invención.

Los siguientes ejemplos no limitantes describen realizaciones particulares de la invención.

Ejemplo 1: Cuantificación del daño y de la capacidad de reparación del ADN en linfoblastos humanos normales expuestos a la radiación UV-C.

La exposición a la radiación UV-C induce lesiones inespecíficas en la molécula de ADN, por ejemplo, RUC, sitios de AP, bases oxidadas, etc., junto con productos fotoquímicos más específicos: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y productos fotoquímicos (6-4) (6-4PP). El siguiente procedimiento experimental describe en detalle el protocolo y los materiales necesarios para poner en práctica el método de la invención para la detección y la cuantificación simultáneas de un conjunto de daños: en este ejemplo, la 8-oxoguanina (indirecta), varios CPD y 6-4PP (inmunodetección directa) y productos fotoquímicos reparados (marcaje de UDS directa). Se podrían abordar otros tipos de lesiones mediante un procedimiento experimental análogo.

Procedimientos experimentales

Cultivo de linfoblastos humanos normales

Los experimentos se realizaron usando linfoblastos humanos normales, la línea celular GM17749 en P5. Se descongelaron rápidamente células de las reservas criogenizadas, y se cultivaron en un matraz de cultivo T25 a

37 °C, CO₂ al 5 % hasta alcanzar una cantidad final de 2×10^6 células. El medio de crecimiento usado fue RPMI 1640 (medio de Roswell Park Memorial Institute, Invitrogen) con FBS al 15 % v/v (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Gibco, Invitrogen). Las células se incubaron durante 6 h con RPMI 1640 que contenía FBS al 0,5 % para reducir la replicación antes del experimento.

5

Tratamiento con luz UV y marcaje de UDS

Se vertió la suspensión celular en cuatro placas de Petri abiertas y se expusieron dos de ellas a la luz UV-C (UV1 y UV2) producida por una lámpara germicida (Philips, 254 nm, 15 W, $0,8 \mu\text{W}/\text{m}^2$), con la tapa abierta. Se fijó la dosis de exposición en $100 \text{ J}/\text{m}^2$, medida con un radiómetro UV-C (LT Lutron, ref. Q569239). Las dos muestras de control (CT1 y CT2) se expusieron simplemente al aire. Tras la exposición, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se volvieron a suspender las muestras UV1 y CT1 en 1 x PBS (solución salina tamponada con fosfato, Invitrogen) a una concentración de 5.000 células/ μl para la preparación inmediata de tapones de agarosa. Se volvieron a suspender las muestras UV2 y CT2 en RPMI 1640 que contenía FBS al 0,5 % v/v y 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) 100 μM (Invitrogen) y se incubaron las células durante 60 min a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir la UDS y el marcaje de la replicación residual.

10

15

Preparación de tapones de ADN embebidos a partir de células cultivadas

Tras el marcaje con EdU, se mezcló cada suspensión de células de las muestras UV2 y CT2 con un volumen igual de 1 x PBS a 4 °C, se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se aclararon una vez con 1 x PBS 20 a 4 °C, se volvieron a centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se volvieron a suspender en 1 x PBS 20 a una concentración de 5.000 células/ μl . Para la preparación de los tapones de agarosa, a continuación, se mezcló bien la suspensión de células en una proporción de 1:1 con una solución al 1,2 % p/v de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve GTG, ref. 50081, Cambrex) preparada en 1 x PBS a 50 °C. Se vertieron 90 μl de la mezcla de células/agarosa en un pocillo de formación de tapones (BioRad, ref. 170-3713) y se dejó que se enfriara al menos 15 minutos a 4 °C. La lisis de las células en los bloques se realizó como se ha descrito previamente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, se incubaron los tapones de agarosa durante la noche a 50 °C en 250 μl de una solución de EDTA 0,5 M (pH 8), Sarkosyl al 1 %, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K (Eurobio, código: GEXPRK01, Francia), y, a continuación, se lavaron tres veces en un Tris 10 mM, solución de EDTA 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente.

20

25

30

Escisión de 8-oxoguanina mediante el tratamiento con hOGG1

Se transfirieron tapones de agarosa a tampón de digestión de hOGG1 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM) y se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{tapón}$ de enzima hOGG1 (New England Biolabs) a 37 °C durante 3 h. Se incubaron los tapones durante 1 h a 50 °C en 250 μl de una solución de EDTA 0,5 M (pH 8), 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K para eliminar la hOGG1 residual, y después se lavaron tres veces en una solución de Tris 10 mM, EDTA 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente.

35

40

Extracción final del ADN y rastreo molecular

Se trataron tapones de ADN embebido de linfoblastos humanos para el rastreo del ADN como se ha descrito anteriormente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, se fundieron los tapones a 68 °C en una solución de MES 0,5 M (pH 5,5) durante 20 min, y se añadieron 1,5 unidades de beta-agarasa (New England Bio Labs, ref. M0392S, MA, EE.UU.) y se dejaron incubar durante un máximo de 16 horas a 42 °C. Luego se vertió la solución de ADN en un depósito de teflón y se realizó el rastreo molecular usando el sistema de rastreo molecular (Genomic Vision S.A., París, Francia) y CombiCoverslips (20 mm x 20 mm, Genomic Vision S.A., París, Francia). Las superficies rastreadas se curaron durante 4 horas a 60 °C.

45

50

Detección de la UDS y señal de replicación

Se realizó la detección de nucleótidos marcados con alquino mediante la reacción de cicloadición de Huisgen catalizada por Cu (I) (clic) como se ha descrito previamente (Salic y Mitchison, 2008). En resumen, se preparó una mezcla de reacción de tampón de Tris 100 mM, pH 8,5, CuSO₄ 0,5 mM (Sigma), azida Alexa Fluor® 594 1 μM (Invitrogen) y L-ascorbato de sodio 50 mM (Sigma) (añadido el último a la mezcla de una solución 0,5 M) y se mezcló con Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) en una proporción de 1:1. Se vertieron 20 μl de mezcla de reacción sobre portaobjetos de vidrio limpios y se cubrieron con una superficie de rastreo. Se incubaron los portaobjetos durante 30 min a TA protegidos de la luz, luego se aclararon durante 1 min en agua desionizada con agitación a 500 rpm. Se realizó una segunda incubación con una mezcla de reacción recién preparada durante otros 30 min. Las superficies se aclararon dos veces en 1 x PBS durante 5 minutos y una vez en agua desionizada durante 1 minuto, ambas veces con agitación a 500 rpm. El agua residual se secó con aire comprimido.

55

60

Detección inmunoquímica de los CPD y 6-4PP

La detección se realizó usando capas de anticuerpos. Para cada capa, se añadieron 20 µl de la solución de anticuerpos al portaobjetos, y se cubrió con un cubreobjetos de rastreo, y el portaobjetos se incubó en atmósfera húmeda a 37 °C durante 20 min. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en una solución de 2 x SSC y Tween 20 al 1 % durante 3 minutos a temperatura ambiente entre cada capa y tras la última capa. La detección se llevó a cabo en este ejemplo usando anti-CPD de ratón (CosmoBioCo, Ltd, Clon: TDM-2) y anti-6-4PP de ratón (CosmoBioCo, Ltd, Clon: 64M-2) en una dilución de 1:25. Como segundo anticuerpo de la capa, se usó anticuerpo anti-ratón de cabra acoplado con Alexa Fluor ® 350 (Invitrogen, Francia) diluido a 1:25.

Análisis de las señales fluorescentes

Para la visualización directa del ADN rastreado, se montaron cubreobjetos con 20 µl de una mezcla de Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) y yoduro YOYO-1 (Molecular Probes, código Y3601) (10000:1 v/v) para la tinción de contraste de todas las moléculas estiradas. La generación de imágenes se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertido automático, dotado de un objetivo de 40 aumentos (ImageXpress Micro, Molecular Devices, EE.UU.). Se midió la longitud de las fibras de ADN teñidas con YOYO-1 y se convirtió a kb, usando un factor de ampliación de 2 kb/µm (Schurra y Bensimon, 2009), con un software interno GVLab v0.4.6 (Genomic Vision S. A., París, Francia). Se construyeron histogramas de distribución de la longitud a partir de las mediciones del ADN y se compararon para la evaluación indirecta de la cantidad de lesiones de 8-oxoguanina presentes en las muestras justo después de la exposición UV (UV1 frente a CT1) y tras la reparación de 1 h (UV2 frente a CT2). Se analizó una cantidad total de ADN de 20 Gpb. Se identificaron señales azules y señales rojas específicas, correspondientes respectivamente a anticuerpos anti-productos fotoquímicos y a UDS, cuando se encontraban en las moléculas de ADN teñidas de YOYO-1 y luego se cuantificaron como el número de eventos/kpb. La comparación de las muestras UV1 y UV2 normalizadas con respecto a sus controles permitió la evaluación de la capacidad de reparación a corto plazo de la muestra de linfoblastos.

Ejemplo 2: Detección de lesiones o de reparaciones a través de la sustitución parcial o completa de la diana con un elemento detectable.

Detección de la capacidad de reparación de NER (NERCA)

El sistema de reparación de escisiones de nucleótidos (NER) es una vía enzimática de reparación del ADN versátil que participa en la reparación de una amplia variedad de lesiones del ADN estructural con propiedades de distorsión de la hélice del ADN (van der Wees, Jansen *et al.*, 2007), incluyendo dímeros de pirimidina ciclobutano inducidos por UV (CPD) y productos fotoquímicos (6-4) (6-4PP). Se han identificado dos subvías de NER, es decir, la reparación del genoma global (GGR) y una vía especializada denominada reparación acoplada a la transcripción (TCR). La GGR elimina las lesiones del ADN en todo el genoma, mientras que la TCR se dirige a las lesiones en la transcripción de genes activos (Fousteri, Mullenders, 2008).

La NER es un complejo proceso de reparación de múltiples etapas que incluye más de 30 polipéptidos. El heterodímero XPC-hHR23B es el principal factor de reconocimiento de daños de la GGR y es estrictamente necesario para el reclutamiento de las siguientes proteínas NER con el ADN dañado. Para una revisión de los factores que intervienen en la vía de NER, véase de Laat, Jaspers *et al.*, (1999).

El reconocimiento de las distorsiones voluminosas conduce a la eliminación de un segmento corto de ADN bicatenario, de aproximadamente 30 pares de bases de longitud, que incluye la lesión, creándose un hueco de una sola cadena en el ADN. La escisión se produce exclusivamente en la cadena de ADN que contiene el aducto de ADN: las proteínas implicadas en la NER son capaces de distinguir no solo el ADN de dúplex dañado frente al intacto, sino también qué cadena contiene el aducto (Shuck, Short *et al.*, 2008). El hueco es rellenado posteriormente por la ADN polimerasa (lo que se denomina normalmente parches reparados), que usa la cadena intacta como molde. Los parches de ADN reparado normalmente se definen como la síntesis de ADN no programada (UDS) para distinguirlos del ADN replicado normal, que se considera una actividad celular programada.

La falta o la mala regulación de la vía de NER dan lugar a enfermedades graves (xeroderma pigmentoso (XP), síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia) y a la predisposición al desarrollo de cáncer. Los genes NER han sido objeto de una intensa exploración en busca de posibles SNP relacionados con la carcinogénesis (Kiyohara y Yoshimasu, 2007; Crew, Gammon *et al.*, 2007). La comunidad científica en general ha intentado delimitar las conexiones entre la capacidad de reparación del ADN y la inestabilidad genética que, con el tiempo, se correlacionan con la probabilidad de aparición del cáncer. Muchos de estos análisis son contradictorios y representan un reto considerable, ya que suelen ser capaces de medir el parámetro de partida: la capacidad de reparación del ADN. Los resultados recientes sobre los modelos que contienen múltiples SNP dentro de la vía de reparación han demostrado una mayor correlación con el riesgo de cáncer y la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos (Bartsch, Dally *et al.*, 2007).

Además de un papel en la carcinogénesis, la capacidad de NER también es relevante en el contexto del tratamiento del cáncer. Numerosos agentes quimioterapéuticos, incluyendo derivados de platino (el cisplatino, el oxaliplatino y el carboplatino son los más comunes) actúan a través de la formación de aductos de ADN voluminosos, que son dianas de la NER (Jamieson y Lippard, 1999). Por lo tanto, la sensibilidad a la quimioterapia individual se ve influida por la capacidad de reparación NER, y esta se podría usar para predecir la respuesta al tratamiento. Los derivados de platino son el tratamiento principal para una variedad de cánceres, incluyendo los cánceres testicular, de pulmón y de ovario, así como los tumores de la cabeza y del cuello (Shuck, Short *et al.*, 2008). La importancia de la capacidad de reparación del ADN se demuestra por la discrepancia drástica en la eficacia del cisplatino en dos casos clínicos: el cáncer testicular, que se caracteriza por una gran reducción de la capacidad de reparación del ADN, muestra una tasa de supervivencia del 95 % tras el tratamiento con cisplatino (Einhorn, 2002), mientras que el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), presente con mayores niveles de capacidad de reparación del ADN, tiene una baja supervivencia (Spitz, Wei *et al.*, 2003). Además, la NER deficiente parece desempeñar un papel importante en la etiología del cáncer de mama esporádico. De este modo, se espera de los derivados de platino sean eficaces en el tratamiento del cáncer de mama en fase temprana (Latimer, Johnson *et al.*, 2010) y la capacidad de reparación NER se podría usar para predecir la respuesta al tratamiento también para este tipo de cáncer. Teniendo en cuenta estas correlaciones, las mediciones precisas de la capacidad de reparación NER ayudarían a aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos actuales que funcionan dañando el ADN (Kartalou y Essigmann, 2001). Además, el método de la invención se podría usar para identificar epitelio de mama que muestre la reducción en la capacidad de NER y, por lo tanto, servir como ensayo de predicción de la tumorigénesis.

La actividad de NER se calcula a partir de mediciones de la UDS. La UDS, en general, se detecta mediante la incorporación de nucleósidos modificados/marcados durante cultivos celulares, de manera similar a la replicación del ADN. Sin embargo, debido al pequeño tamaño (parches de aproximadamente 30 pb) y una menor frecuencia de estos eventos en todo el genoma, resulta difícil cuantificar la UDS con alta sensibilidad o localizar parches en todo el genoma. Las mediciones se deben realizar en células que no se encuentren en fase S o se ha de silenciar la síntesis de ADN de replicación para detectar la UDS (Lehmann y Stevens, 1980), que, de lo contrario, será enmascarada por la señal de replicación. Los ensayos convencionales de los laboratorios de diagnóstico son: la incorporación de ³H-timidina, seguida del recuento de centelleo líquido o la autorradiografía de sustratos de cultivo de tejidos y la evaluación del recuento de granos; la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), seguida de la detección inmunofluorescente por anticuerpos anti-BrdU (Kelly y Latimer, 2005). La radiactividad permite alcanzar sensibilidades más altas que la inmunodetección, pero requiere más mano de obra y tiempo. Los resultados se usan para el diagnóstico de trastornos de reparación deficiente clínicamente y proporcionar una base para la investigación de la deficiencia de la reparación de tejidos o tumores humanos. En la actualidad, no existe ningún otro ensayo funcional que mida directamente la capacidad para realizar la NER en todo el genoma sin el uso de radiactividad o anticuerpos específicos.

Los inventores han desarrollado métodos para detectar la UDS directamente sobre ADN estirado, de una manera que requiere poco tiempo y que es rentable, y con ninguna de las limitaciones de manipulación de la radioactividad o los inconvenientes del uso de anticuerpos. Además, el método de la invención permite estimar la capacidad de reparación NER de una muestra celular expuesta al tratamiento que daña el ADN, independientemente del tipo de tratamiento considerado. Con una metodología de una sola molécula como el rastreo molecular, la detección de la UDS ganaría sensibilidad, y sería posible realizar estudios de resolución y cartografía gracias a la hibridación simultánea. Cuando se proporcionan nucleósidos modificados a las células en cultivo tras la exposición UV, la NER producirá pequeños oligoparches (por ejemplo, de 20 a 40 pb, y preferentemente de 30 pb) y la maquinaria de replicación producirá fragmentos marcados mucho más largos. Como resultado de ello, la señal fluorescente de la UDS aparecerá como una señal irregular en las moléculas de ADN estiradas, mientras que la replicación se corresponderá con las señales lineales largas. La metodología es la única que permite la detección simultánea de señales de replicación y de UDS. Esto ayudaría significativamente a descubrir fármacos con una mayor especificidad, ya que los compuestos candidatos pueden perturbar varias vías metabólicas del ADN, incluyendo la replicación y la recombinación del ADN, y los efectos generales puede producir respuestas clínicas drásticas.

Los inventores también desvelan un método de detección *in vitro* de la presencia de UDS impulsada por la NER en las células expuestas a agentes genotóxicos, en particular, la detección de la UDS en los fibroblastos normales humanos expuestos a la luz UV. Dicho método comprende una etapa de incubación con nucleósidos modificados con alquino durante el cultivo celular y la detección química de los parches de NER sobre ADN estirado. Nunca se ha demostrado la visualización directa de segmentos fluorescentes de 30 pb en el ADN estirado. Según la experiencia de los presente inventores, las señales irregulares en las moléculas estiradas corresponden a varios cientos de bases según lo observado usando una cámara CCD convencional. Se podrían visualizar los parches individuales usando una cámara de alta sensibilidad. Los parches de NER probablemente están concentrados en agrupaciones (Svetlova, Solovjeva *et al.*, 2002): las agrupaciones que cubren una región inferior a 1.000 pb aparecerían como manchas intensas debido a la resolución óptica, mientras que los parches espaciados más de dicha resolución se podrían distinguir como manchas más pequeñas separadas. Por lo tanto, para realizar la detección de la UDS, se requiere un protocolo que no produzca ruido de fondo irregular: se excluyen los métodos de inmunquímica, porque se sabe que los anticuerpos producen ruido de fondo en forma de manchas. Por otra parte, una secuencia de 30 pb debe contener un promedio de 6-10 timidinas. Esto significa que solo unos cuantos nucleótidos marcados se incorporarán durante la reparación, incluso en las mejores condiciones. A continuación, la

detección tras la síntesis debe convertir los nucleótidos marcados en fluorescencia con la mayor eficacia. Estos elementos orientaron a los presentes inventores al desarrollo de un método de detección química. Se adaptó una nueva detección fluorescente posterior a la síntesis basada en la química clic: las uridinas marcadas con alquino (EdU) incorporadas al ADN por las células se convierten en nucleótidos fluorescentes en el ADN rastreado por una reacción química específica con fluoróforos marcados con azida (Salic y Mitchison, 2008).

Procedimientos experimentales

Cultivo de fibroblastos humanos normales

Los experimentos se realizaron usando fibroblastos de piel humana normales GM08402 y HS 707(B), y fibroblastos de piel de donantes XP-C humanos XP17BE (todos del banco de células ATCC). Se descongelaron rápidamente células de las reservas criogenizadas, se sembraron a una densidad de 10^4 células/cm² y se cultivaron hasta la confluencia en placas de Petri convencionales a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de crecimiento usado fue MEM (medio Eagle modificado, Invitrogen) con FBS al 15 % v/v (Invitrogen), glutamina al 2 % v/v (Gibco, Invitrogen) y NEAA al 2 % v/v (Gibco, Invitrogen). Se mantuvieron las células GM08402 hasta la confluencia durante 1 día y después se incubaron durante 6 h con MEM que contenía FBS al 0,5 %, para reducir aún más la replicación. Las células HS 707(B) y XP17BE se recogieron al 80 % de confluencia.

Tratamiento con luz ultravioleta y marcaje de UDS

Se expusieron las células en placas de Petri a la luz UV-C producida por una lámpara germicida (Philips, 254 nm, 15 W, 0,8 μ W/m²), con la tapa abierta. Se fijó la dosis de exposición en 150 y 250 J/m² para la línea celular GM08402, y en 10, 20 y 30 J/m² para las líneas de células HS 707(B) y XP17BE. Las dosis de radiación se midieron con un radiómetro UV-C (LT Lutron, ref. Q569239). Las muestras de control se expusieron simplemente al aire, abriendo la tapa de la placa de Petri. Tras la exposición, se reemplazó el medio por MEM que contenía 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) 100 μ M (Invitrogen) y FBS al 0,5 % v/v para GM08402 o FBS al 15 % v/v para el resto de líneas celulares. Se incubaron las células durante 60 min a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir la UDS y el marcaje de la replicación residual.

Reparación de tapones de ADN embebido a partir de células cultivadas

Tras el marcaje con EdU, se aclararon las células una vez con 1 x PBS 20 (solución salina tamponada con fosfato, Invitrogen) a 4 °C y una vez con 1 x PBS 20 a TA. Se recogieron las células mediante incubación de 3 minutos con 1 ml de solución de tripsina-EDTA comercial (tripsina al 0,05 % en EDTA 0,53 mM, Invitrogen). Se detuvo la digestión con tripsina mediante la adición de 9 ml de medio de crecimiento y se contaron las células usando 25 cámaras de recuento desechables (Kova slide, CML), se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos y se volvieron a suspender en 1 x tampón de PBS/EDTA de tripsina, proporción de 1:1 hasta concentraciones finales de 5×10^5 a 2×10^6 células/ml. A continuación, se mezcló la suspensión celular a fondo a una proporción de 1:1 con una solución al 1,2 % p/v de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve GTG, ref. 50081, Cambrex) preparada en 1 x PBS a 50 °C. Se vertieron 90 μ l de la mezcla de células/agarosa en un pocillo de formación de tapones (BioRad, ref. 170-3713) y se dejó que se enfriaran al menos 15 minutos a 4 °C. La lisis de las células en los bloques se realizó como se ha descrito previamente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, los tapones de agarosa se incubaron durante la noche a 50 °C en 250 μ l de una solución de EDTA 0,5 M (pH 8), Sarkosyl al 1 %, 250 μ g/ml de proteinasa K (Eurobio, código: GEXPRK01, Francia), después se lavaron tres veces en una solución de Tris 10 mM y EDTA 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente.

Extracción final del ADN y rastreo molecular

Se trataron tapones de ADN embebido de fibroblastos humanos para el rastreo del ADN como se ha descrito anteriormente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, se fundieron los tapones a 68 °C en una solución de MES 0,5 M (pH 5,5) durante 20 min, y se añadieron 1,5 unidades de beta-agarasa (New England Bio Labs, ref. M0392S, MA, EE.UU.) y se dejaron incubar durante un máximo de 16 horas a 42 °C. A continuación, se vertió la solución de ADN en un depósito de teflón y se realizó el rastreo molecular usando el sistema de rastreo molecular (Genomic Vision S.A., París, Francia) y Combicoverslips (20 mm x 20 mm, Genomic Vision S.A., París, Francia). Las superficies rastreadas se curaron durante 4 horas a 60 °C.

Detección de USD y señal de replicación

Se realizó la detección de nucleótidos marcados con alquino mediante la reacción de cicloadición de Huisgen catalizada por Cu (I) (clic) como se ha descrito previamente (Salic y Mitchison, 2008). En resumen, se preparó una mezcla de reacción de tampón de Tris 100 mM, pH 8,5, CuSO₄ 0,5 mM (Sigma), azida Alexa Fluor® 594 1 μ M (Invitrogen) y L-ascorbato de sodio 50 mM (Sigma) (añadido el último a la mezcla de una solución 0,5 M) y se mezcló con Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) en una proporción de 1:1. Se vertieron 20 μ l de mezcla de reacción sobre portaobjetos de vidrio limpios y se cubrieron con una superficie de rastreo. Se incubaron los portaobjetos durante 30 min a TA protegidos de la luz, luego se aclararon durante 1 min en agua desionizada con agitación a 500

rpm. Se realizó una segunda incubación con una mezcla de reacción recién preparada durante otros 30 min. Las superficies se aclararon dos veces en Tris 10 mM/EDTA 1 mM durante 5 minutos y una vez en agua desionizada durante 1 minuto, ambas veces con agitación a 500 rpm. El agua residual se secó con aire comprimido.

5 *Análisis de las señales fluorescentes*

Para la visualización directa de la UDS y las señales de replicación en el ADN rastreado, se montaron cubreobjetos con 20 μ l de mezcla de agente de bloqueo basado en proteínas (por ejemplo Block-Aid de Invitrogen) y yoduro YOYO-1 (Molecular Probes, código Y3601) (10000:1 v/v) para la tinción de contraste de todas las moléculas estiradas. La generación de imágenes se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertido automático, dotado de un objetivo de 40 aumentos (ImageXpress Micro, Molecular Devices, EE.UU.). Se midió la longitud de las fibras de ADN teñidas con YOYO-1 y de las señales lineales de EdU, y se convirtieron en kb, usando un factor de ampliación de 2 kb/ μ m (Schurra y Bensimon, 2009), con un software interno GVlab v0.4.6 (Genomic Vision S. A., París, Francia).

15 *Resultados*

Extracción del ADN de fibroblastos humanos expuestos a radiación UV

El rastreo molecular se ha realizado con éxito con solución de ADN de células aisladas, incluyendo células cultivadas (es decir, las cepas celulares establecidas, células primarias inmortalizadas) o fluidos biológicos (es decir, linfocitos de sangre periférica, células amnióticas) (Gad, Klinger *et al.*, 2002; Caburet, Conti *et al.*, 2005). Durante la preparación de muestras convencionales, muchas moléculas de ADN se cortaron en ubicaciones aleatorias debido a las fuerzas de manipulación no controladas producto de una alta variabilidad en el tamaño del ADN preparado. Se ha demostrado que el peso molecular del ADN rastreado se puede aumentar embebiendo cromatina y desproteinizándola en un tapón de agarosa (Lebofsky y Bensimon, 2003). Con este protocolo, las moléculas de ADN analizadas son de longitud variable, pero la longitud media es de aproximadamente 200 kb, alcanzando las moléculas más largas varias megabases. La distribución de la longitud de las moléculas también se ve afectada por la calidad del ADN: cuando las células se exponen a la radiación UV, se generan RUC, debilitando la resistencia mecánica de las moléculas y aumentando la frecuencia de rotura de las moléculas. Dado que nunca se ha realizado el rastreo molecular sobre los fibroblastos expuestos a UV, se analizó el efecto de la radiación UV en la distribución de la longitud del ADN. Los resultados se representan en la Figura 1: el daño inducido por la exposición UV crea "sitios frágiles" de una manera dependiente de la dosis. Las curvas muestran claramente el efecto de la radiación sobre la resistencia mecánica del ADN: cuando aumenta la dosis de radiación UV (de 150 a 250 J/m²), se va reduciendo progresivamente la longitud de las moléculas de ADN rastreado.

Detección química de las señales en el ADN rastreado

La detección química y, en particular, la cicloadición de Huisgen de alquinos y azidas (química clic), se ha añadido recientemente al repertorio de métodos de marcaje del ADN, mostrando una excepcional eficacia de detección en comparación con las técnicas inmunológicas (Gierlich, Burley *et al.*, 2006). La principal ventaja de la reacción clic es su bio-ortogonalidad, porque los grupos reactivos implicados, en general, están ausentes en los materiales biológicos. Hasta la fecha, no se ha informado de la detección química de nucleótidos funcionalizados en ADN estirado y, más en general, en ADN inmovilizado en sustrato. El método se ha empleado con éxito para estudiar la replicación del ADN (Salic y Mitchison, 2008) y la UDS (Limsirichaiikul, Niimi *et al.*, 2009) en muestras celulares fijas y tejidos. Sin embargo, las condiciones de reacción optimizadas para dichos tipos de muestras no son apropiadas en el caso del material biológico inmovilizado sobre un sustrato inorgánico, donde se reduce la ortogonalidad de reacción. Los presentes inventores han ensayado diferentes parámetros, incluyendo la concentración de colorante y las incubaciones repetidas para aumentar la eficacia de conversión final de EdU en (Alexa Fluor®) dU y reducir el ruido de fondo y de las señales irregulares al mínimo. Un ejemplo de los resultados de la mejor combinación de los parámetros se muestra en la Figura 2: la señal de replicación del ADN rastreado se detecta posteriormente con anticuerpos anti-BrdU (verde) y la detección química (rojo). La detección química no requiere la desnaturalización del ADN, y produce una señal continua, mientras que se observa la detección fragmentada con los anticuerpos. Por otra parte, las manchas de ruido se observan en verde, debido a la adsorción inespecífica de los anticuerpos, pero no hay manchas rojas presentes: el nivel de fondo de color rojo es bastante intenso, pero uniforme, lo que permite la detección fiable de pequeños eventos en las moléculas como UDS.

Visualización de la UDS y estimación de NERCA a altas dosis de UV

La UDS suele detectarse en muestras celulares fijas mediante la medición de la intensidad de la fluorescencia nuclear de células que no se dividen seleccionadas. Las mediciones se realizan comparando el nivel global de la intensidad de la fluorescencia de los núcleos de la muestra con una muestra de referencia. La visualización de la actividad de NER distinguida en el núcleo de fibroblastos quiescentes fijos ha sido informada por un solo grupo, que demostró por primera vez la detección directa de la UDS agrupada y su posicionamiento global en el núcleo (Svetlova, Solovjeva *et al.*, 2002). En contraste con los ensayos de inmunológica, que tienen una resolución reducida, con las metodologías de una sola molécula como el rastreo molecular, es posible detectar parches de

NER, o estimar el número o la distancia de las reparaciones presentes en una agrupación.

Los resultados obtenidos se analizaron primero mediante la exposición de fibroblastos quiescentes GM08402 a dosis de radiación UV altas ($> 50 \text{ J/m}^2$). Se observaron dos tipos de señales en las moléculas rastreadas teñidas con YOYO-1: señales irregulares y lineales (Figura 3). Se analizó el mismo número de imágenes por muestra. A partir de las mediciones de la longitud de las moléculas, se dedujo la cantidad total de material genético (en Mpb) presente en las regiones analizadas de los portaobjetos. Este parámetro es necesario para estimar la capacidad de reparación por escisión de los nucleótidos (NERCA) a partir de la detección de señales de UDS. La NERCA se puede expresar como la proporción del número de señales de UDS detectadas en una región R con respecto a la cantidad total de material genético estirado en la región R, que representa un valor normalizado. Cuando las regiones analizadas son suficientemente grandes (varios genomas analizados), se pueden comparar los valores de NERCA obtenidos de diferentes portaobjetos y condiciones para extrapolar diferencias significativas. Los análisis de las imágenes de GM08402 se resumen en la Tabla 2. En las muestras de control (no expuestas a la luz UV), se observaron 150 señales lineales y 6 señales irregulares; en la muestra expuesta a 150 J/m^2 de radiación UV, 55 señales irregulares y 13 señales lineales; en las muestras expuestas a 250 J/m^2 de radiación UV, 149 señales irregulares y 37 señales lineales. Las señales lineales se atribuyeron a la replicación del ADN (la quiescencia de 6 h no bastó para la replicación silenciosa por completo). La proporción de las señales irregulares/lineales indica que cuando se realiza la exposición a la radiación UV, aparecen señales mucho más irregulares. La mayor parte de estas señales irregulares corresponde entonces a la UDS realizada por el sistema de NER. El análisis de varios miles de Mpb de ADN indicó que el número de sitios de UDS aumenta exponencialmente con la dosis aplicada de UV-C (Figura 4, A), según lo confirma la reducción lineal de su distancia media en las moléculas de ADN rastreadas (Figura 4, B). Para la muestra celular de GM08402 y el nivel de exposición genotóxica estudiado, la capacidad de NER (NERCA) parece ser constante hasta la dosis de UV-C ensayada. Si la NERCA se varía, se ha de observar una desviación del perfil lineal de la distancia de la UDS.

Tabla 2: Frecuencia de las señales observadas en el ADN rastreado extraído de fibroblastos humanos normales GM08402 parcialmente quiescentes expuestos a diferentes dosis de luz UV-C. El número de señales irregulares, asociadas a la UDS, aumenta con la dosis de UV-C, como lo demuestra la reducción lineal de su distancia media en las moléculas de ADN rastreadas.

Dosis de UV-C a 254 nm (J/m^2)	Número de señales irregulares	Número de señales lineales	ADN analizado (Mpb)	Distancia media de los eventos (Mpb)
0	6	150	987	164,5
150	55	13	4.094	74,4
250	149	37	2.785	18,7

Visualización de la UDS y estimación de la NERCA a dosis fisiológicas de radiación UV

A continuación, se compararon los resultados obtenidos mediante la exposición de HS 707(B) competente en la reparación, normal, y de fibroblastos XP17BE deficientes en la reparación a dosis crecientes de UV-C en el intervalo considerado fisiológicamente relevante. Se preparó y se analizó un total de 8 muestras celulares para proporcionar una base de comparación para la capacidad de reparación a las 4 dosis diferentes de UV-C: ninguna exposición UV, (0 J/m^2), y dosis de 10 J/m^2 , 20 J/m^2 y 30 J/m^2 de radiación UV. La exactitud de los resultados estuvo garantizada por la planificación experimental, y los datos se acumularon hasta que se contabilizaron al menos 30 señales de UDS para cada condición, a excepción de la muestra de 10 J/m^2 XP-C. El tamaño y la intensidad de las manchas de UDS fluorescentes observadas no es constante: algunas señales muestran mayor difusión y mayor intensidad. De hecho, el método de la invención tiene el potencial de diferenciar el parámetro "número de parches de reparación" del parámetro "tamaño de los parches". Por lo tanto, primero se procedió con la cuantificación de la frecuencia de los eventos por cada condición y después se volvieron a analizar los resultados para investigar la intensidad de la fluorescencia de las señales de UDS.

El análisis de la frecuencia de las reparaciones para las 8 condiciones estudiadas se resume en la Tabla 3 y se representa en la Figura 5. Se empleó la proporción del "número de señales de UDS" con respecto a la "cantidad de ADN analizada" como estimador de la probabilidad de observación de un evento de UDS. La distribución de Poisson es una aproximación conveniente para modelizar la probabilidad de los eventos de UDS. El parámetro λ que caracteriza la distribución es el número de observaciones del evento, es decir, el número de señales de UDS detectadas. Los límites de confianza de Poisson se proporcionan en la tabla y se ilustran en el gráfico de la Figura 5 en forma de barras de error.

La evolución de la probabilidad P (UDS) con dosis de UV creciente muestra claramente la capacidad de reparación deficiente de la muestra de células XP-C. A la dosis de 0, se observó prácticamente la misma frecuencia basal de señales de UDS en ambas muestras. Tras la exposición a la radiación UV, se detectó un número significativo de

5 señales de UDS para los fibroblastos normales (HS 707(B)), mientras que solo se observó un ligero aumento de la síntesis de reparación para la muestra de XP-C (XP17BE). Es importante señalar que la tendencia de P(UDS) de la Fig. 5 cambia tras 20 J/m² para la muestra competente en la reparación. La frecuencia de eventos tiende a una meseta. Este hallazgo coincide con las observaciones anteriores realizadas con técnicas tanto directas como indirectas. Tras una dosis de UV crítica de 20 J/m², el sistema de NER se satura y la síntesis de reparación tiene lugar a un rendimiento constante (Ahmed y Setlow, 1977).

10 La capacidad de reparación esperada de la línea celular XP-C está comprendida entre el 30 y el 60 % del control, de acuerdo con las mediciones de la UDS llevadas a cabo por el proveedor de las células. Al calcular la proporción directa de P(UDS) de las células XP-C con respecto a la P(UDS) de las células normales, se encontró una capacidad de reparación de XP-C residual de ~57 % para la condición de 20 J/m² y del ~64 % para la condición de 30 J/m². Los valores encontrados también coinciden el intervalo designado por el proveedor de las células y confirma aún más la fiabilidad del método de la invención.

15 La observación directa de las síntesis de reparación en las moléculas de ADN individuales permite trazar una imagen mucho más informativa de la actividad de reparación. Como se ha mencionado, las manchas de UDS varían de tamaño e intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, se procedió al análisis del "contenido de fluorescencia" de las señales, que constituye un índice de la cantidad de síntesis de reparación realizada en cada sitio. Se empleó un método sencillo para cuantificar de manera aproximada, pero equitativamente, las variaciones de la fluorescencia
 20 relativa de las manchas que pertenecen a un mismo sustrato. Se cuantificaron las intensidades de los píxeles y, a continuación, se aplicó una normalización interna para todas las señales dentro de un sustrato. Se obtuvieron 8 grupos de datos de "contenido de fluorescencia" (uno por muestra) que se representan en forma de histogramas en la Figura 6.

25 Tabla 3: Estimación de la probabilidad P (UDS) de observación de un evento de UDS sobre el ADN rastreado extraído de fibroblastos humanos normales HS 707 (B) y fibroblastos XP17BE deficientes en NER expuestos a 4 dosis de luz UV-C. La ocurrencia de un evento de UDS se modelizó como una variable de Poisson.

Dosis de UV (J/m ²)	Línea celular	ADN analizado (N Mpb)	Eventos de UDS (λ)	P (UDS) (p)	Intervalo de confianza P(UDS)	
0	Fibroblastos normales	9.503,43	36	0,00379	0,00290	0,00488
	Fibroblastos XP-C	15.962,53	63	0,00395	0,00322	0,00480
10	Fibroblastos normales	21.555,36	131	0,00608	0,00527	0,00698
	Fibroblastos XP-C	4.464,32	18	0,00403	0,00270	0,00558
20	Fibroblastos normales	7.166,16	56	0,00781	0,00624	0,00953
	Fibroblastos XP-C	17.170,24	79	0,00460	0,00381	0,00545
30	Fibroblastos normales	11.639,94	96	0,00825	0,00695	0,00963
	Fibroblastos XP-C	18.672,59	100	0,00536	0,00453	0,00624

30 De los histogramas, se desprende una tendencia clara: la distribución de las intensidades normalizadas cambia a valores más altos al aumentar la dosis de UV. En las muestras no irradiadas de control, los datos se distribuyen con buena simetría alrededor de un pico claro. Tras la exposición a dosis crecientes de radiación, la distribución de los datos se desvía progresivamente del modelo de Gauss. En particular, el pico situado en el contenido de fluorescencia relativa igual a 2 cae, ya que más señales tienen un mayor contenido de fluorescencia. La interpretación lógica es que algunos parches de reparación se están ampliando en determinados sitios de la molécula de ADN. El cambio es mucho más pronunciado para los fibroblastos normales que para las células XP-C, aunque hay un efecto visible para ambos tipos de células. Por primera vez, un ensayo ofrece una visión sobre la reorganización de la vía NER en respuesta a dosis críticas de daños. Como se ha informado en la técnica anterior, se detecta la saturación en la frecuencia de la UDS, pero la metodología de una sola molécula permite diferenciar
 35 dos contribuciones de la mayor parte de la síntesis de reparación: el número de sitios se satura, pero el tamaño de algunos parches de reparación sigue creciendo. Estos hallazgos ponen de relieve el gran valor añadido del método
 40

de la invención para desentrañar la compleja relación que une el daño del ADN con la mutagénesis.

Un método variante

5 La detección y cuantificación global de la síntesis de ADN no programada se pueden realizar de manera similar al método descrito en el párrafo anterior usando moléculas de ADN individuales inmovilizadas sobre un sustrato en una configuración no estirada, por ejemplo, adsorbida en forma de espiral al azar o solo parcialmente elongada. En ausencia de estiramiento de ADN uniforme y constante, la cuantificación de la cantidad total de ADN se basa en la medición de la intensidad de fluorescencia del colorante de unión al ADN empleado (en el ejemplo, YOYO-1). Del mismo modo, la distinción entre la síntesis de ADN de replicación y la UDS se puede basar en el nivel de intensidad de la señal de EdU: bajo una intensidad definida, que puede ser absoluta o relativa a la intensidad del colorante de unión al ADN, la señal se considera UDS y, en un segundo nivel de intensidad, la señal está asociada a la replicación. Nunca se ha informado con anterioridad de este tipo de detección en moléculas de ADN individuales inmovilizadas, y ofrece una mejora espectacular de la resolución y de la sensibilidad con respecto a los métodos convencionales que usan células o cromosomas inmovilizados en sustratos.

Ejemplo 3

20 Ejemplo 3A: Detección de la lesión o la reparación mediante un elemento detectable que se une específicamente a la diana.

2.1 Visualización directa de RUC y RDC

25 La radioterapia personalizada mantiene la promesa de que el diagnóstico, la prevención y el tratamiento del cáncer se basarán en la evaluación individual del riesgo. Aunque se han logrado avances en la radioterapia personalizada, los parámetros biológicos que definen la radiosensibilidad individual siguen sin estar claros. La predicción de la radiosensibilidad del tejido tumoral y normal ha sido objeto de una intensa investigación, pero aún tiene que integrarse de forma habitual en la radioterapia (Torres-Roca y Stevens, 2008). Son muchos los factores predictivos descritos de la radiosensibilidad de los tumores. El número de células clonogénicas, la tasa de proliferación, la hipoxia y la radiosensibilidad intrínseca, en general, se consideran los principales parámetros de control de los tumores (Hennequin, Quero *et al.*, 2008). Actualmente, los riesgos de complicaciones para un determinado paciente irradiado solo se pueden predecir por las tasas de complicaciones observadas en poblaciones similares. Esta evaluación no tiene en cuenta la variación en la capacidad de reparación del ADN del individuo. Además, la predicción de la radiosensibilidad del tumor tiene una importante aplicabilidad clínica. Si se pudiera realizar dicha predicción con exactitud, las dosis de radiación se podrían adaptar a la radiocurabilidad de los tumores individuales. Además, dicho ensayo podría ser útil en la determinación de las dosis óptimas y la programación de los radiosensibilizadores biológicos y quimioterapéuticos. Varios grupos han publicado datos de modelizaciones que demuestran el valor clínico de la predicción de la radiosensibilidad del tejido tumoral y normal (Mackay y Hendry 1999; MacKay, Niemierko *et al.*, 1998). Estos datos indican que las probabilidades de tanto el control de los tumores como de complicaciones del tejido normal se pueden mejorar mediante la individualización del tratamiento de acuerdo con los resultados de ensayos predictivos.

45 La radioterapia destruye las células principalmente a través de un daño extenso en el ADN. La radiación ionizante lleva una gran cantidad de energía que es capaz de inducir una gran cantidad de roturas en la cadena principal del ADN. Cuando las roturas de una sola cadena (RUC) se aproximan más de una distancia crítica en la molécula, forman una rotura de doble cadena (RDC), que representa la lesión más peligrosa para la célula y el efecto citotóxico asociado a la radiación (Suzuki, Ojima *et al.*, 2003). La radiosensibilidad intrínseca se correlaciona con la capacidad global de la célula para detectar y reparar el daño del ADN, pero más particularmente con la capacidad de reparación de las RDC. Ha habido numerosos intentos por extrapolar un biomarcador para la radiosensibilidad basándose en la evaluación de la capacidad de reparación y de la cinética de las RDC. Se ha usado la electroforesis en gel de una sola célula (ensayo de cometa) para estudiar la cinética de reunión de las RDC y las células hipóxicas radiorresistentes en los tumores sólidos y en los tejidos (P. L. Olive, 2009). Ismail *et al.*, desarrollaron un ensayo que analiza las RDC a través de complejos de unión de extremos de ADN. El ensayo demostró predecir la radiosensibilidad tanto en fibroblastos primarios como en líneas celulares de cáncer (Ismail, Puppi *et al.*, 2004). Las técnicas de inmunohistoquímica recientes han permitido alcanzar una alta sensibilidad en la detección de las RDC (Vasireddy, Sprung *et al.*, 2010), pero no se han adoptado en el entorno clínico habitual debido a su complejidad experimental. Los perfiles de expresión génica basados en micromatrices ha contribuido de manera importante a comprender la relación entre la radiosensibilidad intrínseca y el resultado clínico, permitiendo diferenciar entre pacientes con un riesgo alto y bajo de fibrosis inducida por la radiación (Fernet y Hall, 2008). Sin embargo, la preparación técnica para las mediciones de la expresión génica hace que sea poco probable que este último ensayo se introduzca pronto en un entorno clínico habitual.

65 A pesar de más de una década de esfuerzos de investigación en la oncología de radiación predictiva, ninguno de estos ensayos ha cumplido con los requisitos de aplicabilidad clínica. Los fragmentos cromosómicos generados por las RDC llevan información significativa con respecto a la frecuencia de las roturas de las cadenas, la ubicación física y espacial de estos eventos, y la relación con el nivel de exposición a la radiación. Sin embargo, son eventos

raros (60-200 eventos por genoma a dosis convencionales de radiación ionizante), y existe la necesidad de una técnica sensible que proporcione un análisis preciso de la cantidad y de la distribución.

Los inventores han encontrado el empleo con éxito de una metodología de marcaje para detectar y cuantificar directamente las roturas de la cadena principal de las moléculas de ADN estiradas. Cada extremo libre de una cadena rota (RUC o RDC) deja al descubierto una extremidad 3' y 5'. Los inventores llegaron a la conclusión de que, si todos los extremos 3' libres se etiquetaban justo tras la exposición de las células a un agente genotóxico, sería posible visualizarlos directamente en las moléculas de ADN individuales y cuantificarlos con precisión. Los inventores esperaban detectar RUC como manchas fluorescentes en la mitad de una molécula rastreada y RDC en la extremidad. Para marcar los extremos 3' libres, se usó una potente enzima denominada desoxinucleótido transferasa terminal (TdT), que es capaz de alargar los extremos libres 3'-OH con varios cientos de nucleótidos y sin ADN de molde. Esta metodología se ensayó en el ADN del fago lambda para comprobar si se podían detectar los oligos marcados polimerizados por TdT en las muescas y en las extremidades.

15 Procedimientos experimentales

Reparación de la solución de ADN del fago lambda y rastreo molecular

Se preparó la mezcla de reacción de marcaje de las colas (50 μ l) mezclando EdUTP 1 mM (Invitrogen), ADN de fago Lambda 10 pM (Sigma) y 15 U de la enzima TdT (Invitrogen) en 1 x tampón de reacción de TdT (Invitrogen), y se incubó a 37 °C durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA 0,1 M a la mezcla. Se preparó la solución de rastreo de ADN diluyendo la mezcla en 2 ml de tampón MES 0,5 M (pH 5,5). Se vertió la solución en un recipiente de teflón y se realizó el rastreo molecular usando el sistema de rastreo molecular (Genomic Vision S. A., París, Francia) y portaobjetos Combicoverslips (20 mm x 20 mm, Genomic Vision S. A., París, Francia). Las superficies rastreadas se curaron durante 4 horas a 60 °C.

Detección de colas de EdU

La detección de las colas marcadas con alquino se realizó mediante la reacción de cicloadición de Huisgen catalizada por Cu (I) (clic) como se ha descrito previamente (Salic y Mitchison, 2008). En resumen, se preparó una mezcla de reacción de tampón de Tris 100 mM, pH 8,5, CuSO₄ 0,5 mM (Sigma), azida Alexa Fluor® 594 1 μ M (Invitrogen) y L-ascorbato de sodio 50 mM (Sigma) (añadido el último a la mezcla de una solución 0,5 M) y se mezcló con Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) en una proporción de 1:1. Se vertieron 20 μ l de mezcla de reacción sobre portaobjetos de vidrio limpios y se cubrieron con una superficie de rastreo. Se incubaron los portaobjetos durante 30 min a TA protegidos de la luz, luego se aclararon durante 1 min en agua desionizada con agitación a 500 rpm. Se realizó una segunda incubación con una mezcla de reacción recién preparada durante otros 30 min. Las superficies se aclararon dos veces en Tris 10 mM/EDTA 1 mM durante 5 minutos y una vez en agua desionizada durante 1 minuto, ambas veces con agitación a 500 rpm. El agua residual se secó con aire comprimido.

40 *Análisis de las señales fluorescentes*

Para la visualización directa del ADN rastreado, se montaron cubreobjetos con 20 μ l de una mezcla de Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) y yoduro YOYO-1 (Molecular Probes, código Y3601) (10.000:1 v/v) para la tinción de contraste de todas las moléculas estiradas. La generación de imágenes se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertido automático, dotado de un objetivo de 40 aumentos (ImageXpress Micro, Molecular Devices, EE.UU.).

Resultados

50 Los resultados de la prueba de concepto sobre el ADN de lambda muestran que el marcaje de extremos tiene una eficacia superior al 60 % y que, como se esperaba, hay muescas (RUC) visibles en la mitad de las moléculas rastreadas (Figura 7).

55 A partir de la duración de la reacción de marcaje de las colas y la cantidad de EdUTP presente en la mezcla, se calculó que la longitud de las colas estaba comprendida entre 150 y 200 nucleótidos, siendo suficiente para detectar una señal de color rojo intenso en el ADN marcado con YOYO-1.

60 La eficacia del marcaje de los extremos se ha calculado como la proporción de las extremidades marcadas con respecto a las no marcadas de una muestra constituida por 2.000 moléculas de ADN de lambda estiradas. La eficacia de la prueba de concepto ya supera el 60 % y, sin duda, se puede aumentar con una simple optimización.

65 Debido a su naturaleza directa y de alto rendimiento, este método permite la cuantificación precisa de la fragmentación del ADN cromosómico, y se puede aplicar a pequeñas cantidades de material de partida, incluyendo sangre y biopsia de tejido, de una manera que requiere poco tiempo y rentable. En conjunto, estas características lo hacen adecuado para los requisitos de aplicabilidad clínica y hacen que sea una potente herramienta para entender los parámetros biológicos que influyen en la radiosensibilidad individual. Por otra parte, el método de la invención

tiene un gran potencial para los estudios de biomonitorización en general, más allá de la cuantificación de las RUC y RDC: usando la hibridación del ADN en las moléculas rastreadas, es posible acoplar en un solo ensayo la localización cromosómica del daño en el ADN y la detección de aberraciones cromosómicas.

5 *Un método variante*

10 La detección y cuantificación global de las RUC/RDC se pueden realizar de manera similar al método descrito en el párrafo anterior usando moléculas de ADN individuales inmovilizadas sobre un sustrato en una configuración no estirada, por ejemplo, adsorbida en forma de espiral al azar o solo parcialmente elongada. En ausencia de
15 estiramiento de ADN uniforme y constante, la cuantificación de la cantidad total de ADN se basa en la medición de la intensidad de fluorescencia del colorante de unión al ADN empleado (en el ejemplo, YOYO-1). Del mismo modo, la cantidad de roturas (RUC y RDC) se puede obtener a partir de la cuantificación de la intensidad de la señal de EdU, de una forma relativa con respecto a una referencia interna o de una manera más absoluta teniendo en cuenta la longitud media de la cola, la eficacia del marcaje de los extremos y la eficacia de conversión de EdU en fluorescencia.

Ejemplo 3B: 2.2 Visualización y localización directas de daños mediante reacción química.

20 Detección y localización de sitios abásicos (sitios AP) con sondas reactivas con aldehído en un gen seleccionado hibridado en el ADN estirado

Procedimientos experimentales

25 Cultivo de la línea celular

El método de cultivo usado es similar a los métodos descritos anteriormente para los fibroblastos normales humanos en el caso de las células adherentes y para los linfoblastos humanos normales en el caso de las células en suspensión.

30 Tratamiento con ARP (*sondas reactivas con aldehído*)

35 Para el marcaje con ARP *in vivo*, se incubaron las células durante 60 min con las sondas reactivas con aldehído (Cayman Chemical) marcadas con biotina o un fluorocromo a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir que las sondas reaccionaran con la forma de anillo abierto de los sitios AP para generar un sitio AP marcado con biotina o marcado fluorescentemente.

Preparación de tapones de ADN embebido a partir de células cultivadas

40 Tras el marcaje con ARP, se aclararon las células una vez con 1 x PBS 20 (solución salina tamponada con fosfato, Invitrogen) a 4 °C y una vez con 1 x PBS 20 a TA. Se recogieron las células mediante incubación de 3 minutos con 1 ml de solución de tripsina-EDTA comercial (tripsina al 0,05 % en EDTA 0,53 mM, Invitrogen). Se detuvo la digestión con tripsina mediante la adición de 9 ml de medio de crecimiento y se contaron las células usando 25 cámaras de recuento desechables (Kova slide, CML), se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos y se volvieron a suspender en 1 x tampón de PBS/EDTA de tripsina, proporción de 1:1 hasta concentraciones finales de 5 x 10⁵ a 2
45 x 10⁶ células/ml. A continuación, se mezcló la suspensión celular a fondo a una proporción de 1:1 con una solución al 1,2 % p/v de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve GTG, ref. 50081, Cambrex) preparada en 1 x PBS a 50 °C. Se vertieron 90 µl de la mezcla de células/agarosa en un pocillo de formación de tapones (BioRad, ref. 170-3713) y se dejó que se enfriaran al menos 15 minutos a 4 °C. La lisis de las células en los bloques se realizó como se ha descrito previamente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, los tapones de agarosa se incubaron durante la
50 noche a 50 °C en 250 µl de una solución de EDTA 0,5 M (pH 8), Sarkosyl al 1 %, 250 µg/ml de proteinasa K (Eurobio, código: GEXPRK01, Francia), después se lavaron tres veces en una solución de Tris 10 mM y EDTA 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente.

55 *Extracción final del ADN y rastreo molecular*

Se trataron tapones de ADN embebido de fibroblastos humanos para el rastreo del ADN como se ha descrito anteriormente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, se fundieron los tapones a 68 °C en una solución de MES 0,5 M (pH 5,5) durante 20 min, y se añadieron 1,5 unidades de beta-agarasa (New England Bio Labs, ref. M0392S, MA, EE.UU.) y se dejaron incubar durante un máximo de 16 horas a 42 °C. A continuación, se vertió la solución de
60 ADN en un depósito de teflón y se realizó el rastreo molecular usando el sistema de rastreo molecular (Genomic Vision S.A., París, Francia) y Combicoverslips (20 mm x 20 mm, Genomic Vision S.A., París, Francia). Las superficies rastreadas se curaron durante 4 horas a 60 °C.

Síntesis y marcaje de las sondas para localizar el gen seleccionado en el ADN estirado

En este ejemplo, el tamaño de las sondas varía de 100 a 3.000 pb. Las sondas específicas para el gen seleccionado se produjeron mediante PCR de largo alcance usando ADN polimerasa LR Taq (Roche) usando los cebadores apropiados y el ADN humano comercial como ADN de molde. Se ligaron los productos de PCR en el vector pCR®2.1 usando el kit de clonación TOPO® TA (Invitrogen, Francia, código K455040). Las dos extremidades de cada sonda se secuenciaron para realizar la verificación. Las sondas aparentes de 4 tamaños diferentes en este ejemplo son mezclas de varias sondas adyacentes o superpuestas. El marcaje de las sondas se realizó con 11-digoxigenina-dUTP usando protocolos de cebado al azar convencionales. Los productos de reacción se visualizaron en un gel de agarosa para verificar la síntesis del ADN.

Tratamiento con ARP (sondas reactivas con aldehído)

La reacción con ARP se puede realizar durante el cultivo celular antes de la extracción del ADN o tras el estiramiento del ADN en el portaobjetos rastreado. Los portaobjetos de ADN rastreados se incubaron durante 30 min con las sondas reactivas con aldehído (Cayman Chemical) marcadas con biotina o un fluorocromo a 37 °C, para permitir que las sondas reaccionaran con la forma de anillo abierto de los sitios AP para generar un sitio AP marcado con biotina o marcado fluorescentemente.

Hibridación de sondas para localizar el gen seleccionado

Las etapas posteriores también se realizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente en Schurra y Bensimon, 2009 (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, se precipitó una mezcla de sondas marcadas (250 ng de cada sonda) en etanol junto con 10 µg de ADN de esperma de arenque y 2,5 µg de ADN de Cot-1 humano (Invitrogen, ref. 15279-011, CA, EE.UU.), se volvió a suspender en 20 µl de tampón de hibridación (formamida al 50 %, 2 x SSC, SDS al 0,5 %, Sarkosyl al 0,5 %, NaCl 10 mM, Block-Aid al 30 % (Invitrogen, ref. B-10710, CA, EE.UU.)). Se desnaturalizaron por calor la solución de la sonda y el ADN extendido conjuntamente en el hibridizador (Dako, ref. S2451) a 90 °C durante 5 min, y se dejó que la hibridación tuviera lugar en el hibridizador durante la noche a 37 °C. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en formamida al 50 %, 2 x SSC y 3 veces en soluciones de 2x SSC, durante 5 min a temperatura ambiente.

Detección de sitios AP marcados y sondas hibridadas

Los sitios AP tratados con las ARP marcadas fluorescentemente se pudieron visualizar directamente con un microscopio de epifluorescencia. Los sitios AP marcados con biotina se detectaron usando estreptavidina marcada fluorescentemente (Invitrogen). A continuación, se aclararon las superficies dos veces en Tris 10 mM/EDTA 1 mM durante 5 minutos y una vez en agua desionizada durante 1 minuto, ambas veces con agitación a 500 rpm. El agua residual se secó con aire comprimido. La detección de las sondas se realizó usando capas de anticuerpos. Para cada capa, se añadieron 20 µl de la solución de anticuerpos al portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de rastreo, y se incubó el portaobjetos en atmósfera húmeda a 37 °C durante 20 min. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en 2 x solución de SSC y Tween 20 al 1 % durante 3 minutos a temperatura ambiente entre cada capa y tras la última capa. La detección se llevó a cabo en este ejemplo usando un anticuerpo anti-digoxigenina de ratón acoplado con fluorescencia (Jackson Immunoresearch, Francia) en una dilución 1:25. Como segunda capa, se usó un anticuerpo anti-ratón de cabra acoplado con fluorescencia (Invitrogen, Francia) diluido a 1:25. Tras las últimas etapas de lavado, se deshidrataron todos los cubreobjetos de vidrio en etanol y se secaron al aire.

Análisis de señales fluorescentes

Para la visualización directa del ADN estirado, se montaron cubreobjetos con 20 µl de una mezcla de Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) y yoduro YOYO-1 (Molecular Probes, código Y3601) (10.000:1 v/v) para la tinción de contraste de todas las moléculas estiradas. La generación de imágenes se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertido automático, dotado de un objetivo de 40 aumentos (ImageXpress Micro, Molecular Devices, EE.UU.). Se midió la longitud de las fibras de ADN teñidas con YOYO-1 y la longitud de las señales lineales de las sondas hibridadas y de las distancias entre los sitios AP, y se convirtieron en kb, usando un factor de extensión de 2 kb/µm (Schurra y Bensimon, 2009), con un software interno GVlab v0.4.6 (Genomic Vision S. A., París, Francia).

Ejemplo 3C: 2.3 Visualización y cuantificación directas de los daños por inmunofluorescencia.

Posibles anticuerpos: anti-dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDS), anti-productos fotoquímicos (6-4) (6-4 PP), anti productos fotoquímicos Dewar (Dewar PP), anti-8-OH-dG, 8-oxo-G y productos de oxidación similares, anti-aductos de ADN de BPDE (benzo(a)pireno Diol-epóxido) y cualquier anticuerpo futuro que se una específicamente a alteraciones de la molécula de ADN.

Procedimientos experimentales

Cultivo de la línea celular

- 5 El método de cultivo usado es similar a los métodos descritos anteriormente para los fibroblastos normales humanos en el caso de las células adherentes y para los linfoblastos humanos normales en el caso de las células en suspensión.

Reparación de tapones de ADN embebido a partir de células cultivadas

- 10 Se aclararon las células una vez con 1 x PBS 20 (solución salina tamponada con fosfato, Invitrogen) a 4 °C y una vez con 1 x PBS 20 a TA. Se recogieron las células mediante incubación de 3 minutos con 1 ml de solución de tripsina-EDTA comercial (tripsina al 0,05 % en EDTA 0,53 mM, Invitrogen). Se detuvo la digestión con tripsina mediante la adición de 9 ml de medio de crecimiento y se contaron las células usando 25 cámaras de recuento desechables (Kova slide, CML), se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos y se volvieron a suspender en 1 x tampón de PBS/EDTA de tripsina, proporción de 1:1 hasta concentraciones finales de 5×10^5 a 2×10^6 células/ml. A continuación, se mezcló la suspensión celular a fondo a una proporción de 1:1 con una solución al 1,2 % p/v de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve GTG, ref. 50081, Cambrex) preparada en 1 x PBS a 50 °C. Se vertieron 90 μ l de la mezcla de células/agarosa en un pocillo de formación de tapones (BioRad, ref. 170-3713) y se dejó que se enfriaran al menos 15 minutos a 4 °C. La lisis de las células en los bloques se realizó como se ha descrito previamente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, los tapones de agarosa se incubaron durante la noche a 50 °C en 250 μ l de una solución de EDTA 0,5 M (pH 8), Sarkosyl al 1 %, 250 μ g/ml de proteinasa K (Eurobio, código: GEXPRK01, Francia), después se lavaron tres veces en una solución de Tris 10 mM y EDTA 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente.

Extracción final de ADN y rastreo molecular

- Se trataron tapones de ADN embebido de fibroblastos humanos para el rastreo del ADN como se ha descrito anteriormente (Schurra y Bensimon, 2009). En resumen, se fundieron los tapones a 68 °C en una solución de MES 0,5 M (pH 5,5) durante 20 min, y se añadieron 1,5 unidades de beta-agarasa (New England Bio Labs, ref. M0392S, MA, EE.UU.) y se dejaron incubar durante un máximo de 16 horas a 42 °C. A continuación, se vertió la solución de ADN en un depósito de teflón y se realizó el rastreo molecular usando el sistema de rastreo molecular (Genomic Vision S.A., París, Francia) y Combicoverslips (20 mm x 20 mm, Genomic Vision S.A., París, Francia). Las superficies rastreadas se curaron durante 4 horas a 60 °C.

Detección de los productos de oxidación 8-OH-dG y 8-oxo-G sobre el ADN estirado

- La 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OH-dG) y la 8-oxo-guanina (8-oxo-G) son productos del daño oxidativo del ADN producido por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y sirven como marcadores establecidos del estrés oxidativo. La detección se realizó usando capas de anticuerpos. Para cada capa, se añadieron 20 μ l de la solución de anticuerpos al portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de rastreo, y se incubó el portaobjetos en atmósfera húmeda a 37 °C durante 20 min. Se lavaron los portaobjetos 3 veces en 2 x solución de SSC y Tween 20 al 1 % durante 3 minutos a temperatura ambiente entre cada capa y tras la última capa. La detección se llevó a cabo en este ejemplo usando anticuerpos monoclonales anti-8-OH-G de ratón y anti-8-oxoG de ratón (Abeam) en una dilución 1:25. Como segunda capa, se usó un anticuerpo anti-ratón de cabra acoplado con fluorescencia (Invitrogen, Francia) diluido a 1:25. Tras las últimas etapas de lavado, se deshidrataron todos los cubreobjetos de vidrio en etanol y se secaron al aire.

Análisis de señales fluorescentes

- Para la visualización directa del ADN estirado, se montaron cubreobjetos con 20 μ l de una mezcla de Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) y yoduro YOYO-1 (Molecular Probes, código Y3601) (10.000:1 v/v) para la tinción de contraste de todas las moléculas estiradas. La generación de imágenes se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertido automático, dotado de un objetivo de 40 aumentos (ImageXpress Micro, Molecular Devices, EE.UU.). Se midió la longitud de las fibras de ADN teñidas con YOYO-1 y la longitud de las distancias entre los sitios de 8-OH-dG y 8-oxo-G detectados, y se convirtieron en kb, usando un factor de extensión de 2 kb/ μ m (Schurra y Bensimon, 2009), con un software interno GVlab v0.4.6 (Genomic Vision S. A., París, Francia).

Un método variante

- La detección y cuantificación global del daño usando anticuerpos específicos se pueden realizar de manera similar al método descrito en el párrafo anterior usando moléculas de ADN individuales inmovilizadas sobre un sustrato en una configuración no estirada, por ejemplo, adsorbida en forma de espiral al azar o solo parcialmente elongada. En ausencia de estiramiento de ADN uniforme y constante, la cuantificación de la cantidad total de ADN se basa en la medición de la intensidad de fluorescencia del colorante de unión al ADN empleado (en el ejemplo, YOYO-1). La

cantidad relativa de daño se puede estimar con respecto a una referencia interna de la cuantificación de la señal de fluorescencia asociada a los anticuerpos marcados

Ejemplo 4: Detección y cuantificación indirectas de la lesión o la reparación mediante la conversión de las dianas en extremidades moleculares

Determinación del perfil del daño mediante desviación del perfil inducido por la fragmentación relativa (PD)

Se crea la construcción de un perfil de referencia de la longitud del ADN de una población celular sana y se realiza la comparación del perfil obtenido de la misma población tras la exposición a un agente genotóxico. Los perfiles de referencia de la longitud del ADN de alta resolución se construyen mediante la medición del tamaño de miles de moléculas de ADN estiradas uniformemente en un portaobjetos de rastreo.

En el caso del daño generado a alta frecuencia a lo largo del genoma (por ejemplo las RUC, sitios abásicos, metilados, alquilados, bases oxidadas, productos fotoquímicos), la conversión de la mayoría de las lesiones diana en RDC teóricamente genera tantas extremidades de ADN nuevas como lesiones hay presentes en las moléculas. Al comparar el perfil de distribución de la longitud de la muestra dañada con el patrón intacto, aparece una desviación del perfil (PD) asociada a un daño específico. Entonces, a partir de la PD, se puede estimar directamente la cantidad de las lesiones generadas por el compuesto genotóxico.

La conversión de una lesión específica en una extremidad molecular se puede realizar a través de tratamiento enzimático (Collins, Dobson *et al.* 1997), químico o térmico (Singh, McCoy *et al.* 1988). El método más fiable es el uso de nucleasas específicas de la lesión, que convierten los tipos específicos de daños en una RUC o una RDC. Si la etapa de conversión genera RUC, se puede realizar una segunda etapa enzimática o química para generar RDC. Las enzimas comunes que se pueden emplear y sus dianas se resumen en la Tabla 3. Mediante el uso de un conjunto seleccionado de enzimas o tratamientos dirigidos a daños, el método de la invención permite el estudio de más de un tipo de lesión al mismo tiempo.

Tabla 3: Enzimas comunes empleadas para la conversión de las lesiones del ADN específicas en RUC o RDC y las dianas respectivas. ¹Formamidopirimidina-ADN glicosilasa; ²8-hidroxi-guanina ADN-glicosilasa humana, ³Glicosilasa de dímero de pirimidina de T4; ⁴Glicosilasa de dímero de pirimidina del virus Chlorella; ⁵ADN endonucleasa ultravioleta.

Enzima	Daño reconocido
Fpg ¹ Endonucleasa III	8-oxoguanina, restos de formamidopirimidina que contienen ADN, Timinaglicol, 5,6-dihidrotimina, urea, 5-hidroxi-6-hidrotimina, 5,6-dihidrouracilo, aloxana, 5-hidroxi-6-hidrouracilo, uracilglicol, 5-hidroxi-5-metilhidantoína, 5-hidroxicitosina, 5-hidroxiuracilo, metiltarionilurea, producto saturado o de fragmentación de anillo de timina
hOGG1 ²	8-oxoguanina, restos de formamidopirimidina que contienen ADN
T4-PDG ³	Isómeros <i>cis-sin</i> de dímeros de pirimidina de ciclobutano
cv-PDG ⁴	Isómeros <i>cis-sin</i> y <i>trans-sin</i> de dímeros de pirimidina de ciclobutano
UVDE ⁵	Dímeros de pirimidina de ciclobutano, productos fotoquímicos (6-4)

Los inventores han reconocido que el rastreo molecular, que permite el calibrado de alta resolución de matrices densas de fragmentos de ADN uniformemente estirados, se aplica con éxito para la cuantificación indirecta de la mayoría de las lesiones del ADN. A diferencia del rastreo molecular, los métodos de calibrado basados en SCGE (FRAME™, Trevigen, documento WO1996040902), o moléculas individuales que fluyen en microcanales (Filippova, Monteleone *et al.*, 2003) o en nanocanales (Tegenfeldt, Prinz *et al.*, 2004) no permiten el procesamiento posterior de las moléculas de ADN, y los estudios de hibridación son muy difíciles de realizar. Además, estos métodos no proporcionan o solo proporcionan la elongación parcial de las moléculas de ADN. Por consiguiente, para estos métodos, la longitud de los fragmentos de ADN se ha de estimar a partir de mediciones de la intensidad de fluorescencia, lo que reduce la resolución y la precisión de la medición en comparación con las técnicas de estiramiento del ADN. Nada anticipa la posibilidad de estudiar la cantidad y la distribución del daño en el ADN por la media del estiramiento del ácido nucleico. Además, nada sugiere la aplicación de la hibridación del ADN en el ADN elongado o estirado para investigar la distribución de los daños y de las reparaciones con respecto a la secuencia del genoma o la organización de la cromatina.

En el siguiente ejemplo no limitante, el método de desviación del perfil inducido por la fragmentación relativa (PD) se aplica con éxito para la cuantificación del daño oxidativo inducido por la exposición a H₂O₂.

Procedimientos experimentales

Cultivo de la línea celular

- 5 El método de cultivo usado es similar a los métodos descritos anteriormente para los fibroblastos normales humanos en el caso de las células adherentes y para los linfoblastos humanos normales en el caso de las células en suspensión.

Tratamiento con H₂O₂

- 10 Se incubaron las células durante 10 min en medio de crecimiento que contenía H₂O₂ 0 (muestra de control) 1, 5, 10 y 20 mM a 37 °C, CO₂ al 5 % para inducir diferentes dosis de daño oxidativo.

Extracción de ADN y tratamiento con Fpg

- 15 Tras el tratamiento con H₂O₂, se recogieron las células de las 5 muestras y se volvieron a suspender en 1 x PBS 20 (solución salina tamponada con fosfato, Invitrogen) a una concentración de 10⁶ células/ml. La extracción se realizó usando el kit de extracción de ADN de sangre PreAnalytiX (Qiagen) con un procedimiento habitual. En resumen, se vertió 1 ml de suspensión de células por condición en 10 ml de tampón BG1 (del kit PreAnalytiX), seguido de centrifugación durante 5 min a 2.500 g. Tras la eliminación del sobrenadante, se volvió a suspender el sedimento y se aclaró mezclando durante 5 s en tampón BG2 (del kit PreAnalytiX). Se volvieron a centrifugar los tubos durante 3 minutos a 2.500 g. Se volvieron a suspender los sedimentos en 100 µl de tampón de digestión de Fpg según las indicaciones del proveedor (New England Bio Labs) y se incubaron con 3 U de enzima Fpg (New England Bio Labs) durante 3 horas a 37 °C. Tras la digestión, se añadió 1 ml de tampón BG3 (en el kit PreAnalytiX) que contenía 250 µg/ml de proteinasa K (Eurobio) a las soluciones, y se incubaron los tubos a 65 °C durante 15 min para permitir la proteólisis. Tras ello, se precipitó el ADN mediante la adición de 2-propanol a los tubos en una proporción v/v de 1:1 e invirtiendo los tubos 20 veces. Se incubaron los tubos durante la noche a 4 °C antes de retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento de ADN en 100 µl de tampón de Tris 40 mM/EDTA 2 mM por un par de horas a temperatura ambiente.

Extracción final de ADN y rastreo molecular

- 35 Antes de realizar el rastreo molecular, se añadieron 3 ml de tampón MES 0,5 M (pH 5,5) a cada muestra de ADN, y se invirtieron los tubos suavemente varias veces. A continuación, se vertió la solución de ADN en un depósito de teflón y se realizó el rastreo molecular usando el sistema de rastreo molecular (Genomic Vision S.A., París, Francia) y Combicoverslips (20 mm x 20 mm, Genomic Vision S.A., París, Francia). Las superficies rastreadas se curaron durante 4 horas a 60 °C.

Análisis de señales fluorescentes

- 40 Para la visualización directa del ADN estirado, se montaron cubreobjetos con 20 µl de una mezcla de Block-Aid (Invitrogen, ref. B-10710) y yoduro YOYO-1 (Molecular Probes, código Y3601) (10.000:1 v/v) para la tinción de contraste de todas las moléculas estiradas. La generación de imágenes se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertido automático, dotado de un objetivo de 40 aumentos (ImageXpress Micro, Molecular Devices, EE.UU.). Se midió la longitud de las fibras de ADN teñidas con YOYO-1 con un software interno GVlab v0.4.6 (Genomic Vision S. A., París, Francia).

Resultados

- 50 La enzima Fpg se dirige a una subfamilia específica de daño oxidativo que incluye 8 oxoguanina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroxiuracilo, guanina de anillo abierto de imidazol unida a aflatoxina, N-2-aminofluoreno-C8-guanina de anillo abierto de imidazol y las formas de anillo abierto de 7-metilguanina. La enzima escinde la lesión reconocida y deja una muesca en la cadena correspondiente del ADN. Como resultado de ello, cuando se forman dos o más lesiones muy cerca ("agrupadas" en 15-20 bases) en cadenas opuestas, el tratamiento enzimático genera una rotura de doble cadena y convierte el fragmento original en dos fragmentos de ADN más cortos. Se estimó la cantidad relativa de las lesiones "agrupadas" producidas por 4 dosis incrementales de H₂O₂ comparando las distribuciones del tamaño molecular final de las muestras de ADN tras el tratamiento con Fpg. Incluso en ausencia de exposición a agentes oxidantes potentes como H₂O₂, se espera encontrar una cantidad basal de lesiones oxidativas en la molécula de ADN, pues la oxidación de bases tiene lugar de forma continua dentro de la célula debido a la presencia de radicales libres derivados de las actividades metabólicas. Para evaluar el efecto producido por las diferentes dosis de H₂O₂, la muestra de control se sometió igualmente, por tanto, al tratamiento con Fpg. Las distribuciones del tamaño del ADN resultantes se presentan en la Figura 8(A). Los histogramas obtenidos muestran una clara dependencia gradual del perfil de tamaño del ADN en la cantidad de H₂O₂ usada durante la exposición genotóxica. A altas dosis de H₂O₂ (10 y 20 mM), la cantidad de daño agrupado presente en las moléculas es uniforme y las cadenas estiradas parecen mucho más cortas que en la muestra de control. Para cuantificar mejor la DP y el aumento relativo de la cantidad de daño oxidativo, se ajustaron las distribuciones usando un modelo exponencial y $= Ae^{-x/\tau}$ y las constantes de

desintegración τ comparadas en función de la dosis de H_2O_2 . Como se representa mediante el gráfico de la Figura 8(B), las constantes de desintegración parecen reducirse linealmente con respecto a la cantidad de H_2O_2 . La muestra de control no expuesta se excluye del ajuste lineal, y tiene una constante de desintegración de 6,1 μ m. Comparando los coeficientes de los exponenciales de ajuste, es posible detectar y cuantificar relativamente cantidades muy pequeñas de daño agrupado producido por dosis bajas como H_2O_2 1 mM. El método de la invención demuestra ser, por lo tanto, mucho más sensible con respecto a las técnicas disponibles. Por otra parte, el método descrito mantiene una alta precisión en un intervalo muy amplio de dosis genotóxicas, pues los histogramas se construyen a partir de decenas de miles de mediciones a nivel de una sola molécula. Para lograr la cuantificación absoluta de los daños, es suficiente aplicar un método de cuantificación directa (espectroscopia de masas, cromatografía de líquidos etc.) a solo una condición y luego extrapolar el resto con respecto a los parámetros de ajuste.

En el caso de eventos raros como la RDC (60-200 RDC por 2 Gy en genoma de 6.000 Mpb), el tamaño de los fragmentos originales producidos por dosis bajas de radiación (30-100 Mpb) es demasiado grande para su extracción de forma intacta y medición de forma fiable mediante técnicas de calibrado. Por lo tanto, la PD original no se puede evaluar directamente. La manipulación de moléculas de gran tamaño provoca una fragmentación complementaria no controlada (RDC de cizalla), que actúa como ruido de fondo (no media de cero). Para poderse comparar los perfiles de las mediciones, se reduce la contribución de esta fragmentación no controlada mediante la superposición de una controlada y reproducible, proporcionada por la acción de enzimas de restricción seleccionadas (ER). El ADN es digerido por un conjunto de enzimas que producen fragmentos de ADN de 30 a 70 kpb de tamaño. A partir de las presentes distribuciones convencionales del ADN genómico humano, los presentes inventores saben que su protocolo de extracción produce al menos el 90 % de las moléculas superiores a 50 kpb. Los fragmentos reducidos hasta 50 kpb o menos tras la digestión con ER no se fragmentan de manera significativa durante la manipulación. Por dar un ejemplo, si el material de partida es ADN genómico humano, se puede usar la enzima de restricción Sma I para producir una población de fragmentos en este intervalo. Como se ilustra en la Figura 9, para distinguir con exactitud las RDC de ER (RDC creadas por ER) de las Bio-RDC (RDC de detección, generadas en la célula por un agente genotóxico) y las RDC de cizalla (RDC generadas por cizalla durante la manipulación), los presentes inventores asocian el marcaje de extremos específicos de la RDC adhesiva generada por la ER. Por ejemplo, los extremos adhesivos de los fragmentos de ADN humano se pueden marcar con dATP fluorescente usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa. Se añaden desoxinucleósidos trifosfato no marcados en caso de que se requiera su incorporación. Opcionalmente, el marcador no incorporado se puede retirar por precipitación con etanol. La combinación de ADN de los fragmentos se estira sobre un sustrato y se descartan los fragmentos marcados en ambas extremidades de las mediciones del tamaño. Las distribuciones de tamaño se construyen a partir de las mediciones del resto de fragmentos, y se comparan con la muestra de referencia, no expuesta al agente genotóxico. A continuación, se calcula la cantidad de Bio-RDC.

Referencias

Patentes

Documento US 6.130.044: "Surfaces for biological reactions, process for preparing them and process for their use". Bensimon D., Bensimon A., Heslot F. 10 de octubre de 2000

Documentos US 6.303.296, US 2006/257910 y US 6.054.327: "Process for aligning macromolecules by passage of a meniscus and applications". Bensimon D., Bensimon A., Heslot F., 16 de octubre de 2001.

Documento US 6.225.055: "Apparatus for the parallel alignment of macromolecules, and use thereof". Bensimon A., Bensimon D., 22 de mayo de 2002.

Documento US 2004/033510: "Method for the diagnosis of genetic diseases by molecular combing and diagnostic kit", Bensimon A., Bensimon D., Michalet X., 19 de febrero de 2004

Documento US 6.789.022: "Method for assaying clustered DNA damages", Sutherland B. M., 7 de septiembre de 2004.

Documento US 7.670.770: "Nanochannel arrays and their preparation and use for high throughput macromolecular analysis", Chou S. Y., Cao H., Austin R. H., Yu Z., Tegenfeldt J. O., 2 de marzo de 2010.

Solicitud provisional: "Genotoxicity Analysis of DNA using Nanochannels", Cao H., Deshpande P., Austin M., Boyce-Jacino M., 2004.

Documento WO 98/18959: "Procédé de diagnostic de maladies génétiques par Peignage Moléculaire et coffret de diagnostic", Bensimon A., Bensimon D., Michalet X., 07-05-1998.

Documento WO 0073503: "Utilisation du peignage dans l'identification des origines de replication d'ADN", Bensimon A., Herrick J., Hyrien O., 7-12-2000.

Documento WO 2008/028931: "Genomic Morse Code", Lebofsky R., Bensimon A., Walrafen P., 13-03-2008.

Documento WO 2008/121828: "Methods of Macromolecular Analysis using Nanochannel arrays", Cao H., Deshpande P., Austin M., Boyce-Jacino M., 2008.

Documento WO 1996/040902: "Nucleic Acid Repair Enzyme Methods for Point Mutation and in vitro Mutagenesis", Chirikjian J.G., Collier B. G., diciembre de 1996.

Publicaciones científicas

Ahmed F. y R. Setlow (1977) "Different rate-limiting steps in excision repair of ultraviolet- and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene-damaged DNA in normal human fibroblasts", *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 74: 1548.

Allemand, J.-F., D. Bensimon *et al.* (1997) "pH-Dependent Specific Binding and Combing of DNA". *Biophys. J.* 73: 2064-2070.

Asaithamby, A. y D. J. Chen (2009) "Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation". *Nucl. Acids Res* 37: 3912-3923.

Bartsch, H., H. Dally, O. Popanda *et al.* (2007) "Genetic risk profiles for cancer susceptibility and therapy response". *Recent Results Cancer Res.* 174:19-36.

Bohr, V. A., C. A. Smith *et al.* (1985) "DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall". *Cell* 40: 359-369.

Caburet, S., C. Conti, *et al.* (2005). "Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures". *Genome Res* 15(8): 1079-1085.

Caldecott, K. W. (2008) "Single-strand break repair and genetic disease". *Nature Reviews Genetics* 9: 619-631.

Cedervall, B., R. Wong *et al.* (1995) "Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis". *Radiat. Res.* 144(1):122-130.

Collins, A. R., V. L. Dobson *et al.* (1997) "The comet assay: what can it really tell us?". *Mutat. Res.* 75(2):183-193.

Collins, A. R. (2004) "The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations". *Mol. Biotechnol.* 26(3): 249-261.

Conti, C. y A. Bensimon (2002) "A combinatorial approach for fast high-resolution mapping", *Genomics* 80: 259-264.

Crew, K. D., M. D. Gammon, M. B. Terry *et al.* (2007) "Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, and breast cancer risk". *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(10): 2033-2041.

de Laat, W. L., N. G Jaspers *et al.* (1999) "Molecular mechanism of nucleotide excision repair". *Genes Dev.* 13:768-785.

Dizdaroglu, M. (1984) "The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links". *J. Chromatogr.* 295(1): 103-121.

Einhorn, L. H. (2002) "Curing metastatic testicular cancer". *Proc. Nat. Acad. Sci.* EE.UU. 99: 4592-4595.

Evan, G. I. y K. H. Vousden (2001) "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer". *Nature* 411(6835): 342-348.

Fernet, M. y J. Hall (2008) "Predictive markers for normal tissue reactions: Fantasy or reality?". *Cancer/Radiothérapie* 12(6-7): 614-618.

Filippova, E. M, D. C. Monteleone *et al.* (2003) "Quantifying damage to double stranded DNA by single molecule laser fluorescence sizing". *Biophys. J.* 84: 1281-1290.

Finkel, T., M. Serrano *et al.* (2007), "The common biology of cancer and ageing". *Nature* 448: 767-774.

Fousteri M. y L. H. Mullenders (2008) "Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects", *Cell Res.* 18(1):73-84.

Gad, S., A. Aurias, *et al.* (2001). "Color bar coding the BRCA1 gene on combed DNA: a useful strategy for detecting large gene rearrangements", *Genes Chromosomes Cancer* 31(1): 75-84.

- Gad, S., I. Bieche, *et al.* (2003). "Characterisation of a 161 kb deletion extending from the NBR1 to the BRCA1 genes in a French breast-ovarian cancer family". *Hum Mutat* 21(6): 654.
- 5 Gad, S., V. Caux-Moncoutier, *et al.* (2002). "Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families". *Oncogene* 21(44): 6841-6847.
- Gad, S., M. Klinger, *et al.* (2002). "Bar code screening on combed DNA for large rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes in French breast cancer families". *J Med Genet* 39(11): 817-821.
- 10 Gerweck, L. E., S. Vijayappa *et al.* (2006) "Tumor cell radiosensitivity is a major determinant of tumor response to radiation". *Cancer Res* 66: 8352-5.
- Gierlich, J., G. A. Burley, P. M. Gramlich *et al.* (2006) "Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA". *Org. Lett.* 8(17): 3639-3642.
- 15 Hennequin, C., L. Quero y V. Favaudon (2008) "Déterminants et facteurs prédictifs pour la radiosensibilité tumorale". *Cancer/Radiothérapie* 12(1): 3-13.
- Herrick, J., C. Conti, *et al.* (2005). "Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis". *Cancer Res* 65(4): 1174-1179.
- 20 Herrick, J., S. Jun, *et al.* (2002). "Kinetic model of DNA replication in eukaryotic organisms". *J Mol Biol* 320(4): 741-750.
- Herrick, J., X. Michalet, *et al.* (2000). "Quantifying single gene copy number by measuring fluorescent probe lengths on combed genomic DNA". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 97(1): 222-227.
- 25 Herrick, J., P. Stanislawski, *et al.* (2000). "Replication fork density increases during DNA synthesis in *X. laevis* egg extracts". *J Mol Biol* 300(5): 1133-1142.
- 30 Hoeijmakers, J. H. J. (2001) "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer". *Nature* 411: 366-374.
- Hooper, D. C. (2001) "Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones". *Clin. Infect. Dis.* 32(Supl. 1):S9-S15.
- 35 Ismail, S. M., M. Puppi, S. Prithivirajsingh (2004) "Predicting radiosensitivity using DNA end-binding complex analysis". *Clin. Cancer Res.* 10(4):1226-1234.
- Jamieson, E. R. y S. J. Lippard (1999) "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts". *Chem Rev.* 99(9): 2467-2498.
- 40 Kartalou, M., y J. M. Essigmann (2001) "Mechanisms of resistance to cisplatin". *Mutat. Res.* 478: 23-43.
- Kelly, C. M. y J. J. Latimer (2005) "Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair". *Methods Mol. Biol.* 291:303-320.
- 45 Khanna, K. K. y S. P. Jackson (2001) "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection". *Nature Genet.* 27: 247-254.
- Kiyohara, C. y K. Yoshimasu (2007) "Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis". *Int. J. Med. Sci.* 4(2): 59-71.
- 50 Kunkel, T. A y K. Bebenek (2000) "DNA replication fidelity". *Annu. Rev. Biochem.* 69: 497-529.
- Kurusu, S., T. Miya *et al.* (2001) "Quantitation of DNA damage by an aldehyde reactive probe (ARP)". *Nucleic Acids Res. Supl* 1: 45-46.
- 55 Laga A. C. y G. F. Murphy (2009) "The translational basis of human cutaneous photoaging: on models, methods, and meaning". *Am. J. of Pathol.* 174(2): 357-360.
- 60 Larson, E. D., D. W. Bednarski *et al.* (2008) "High-fidelity correction of genomic uracil by human mismatch repair activities". *BMC Mol Biol.* 27(9): 94-106.
- Latimer, J. J., J. M. Johnson *et al.* (2010) "Nucleotide excision repair deficiency is intrinsic in sporadic stage I breast cancer, *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 107: 21725.
- 65

- Lebofsky, R. y A. Bensimon (2003). "Single DNA molecule analysis: applications of molecular combing". *Brief Funct Genomic Proteomic* 1(4): 385-396.
- 5 Lebofsky, R. y A. Bensimon (2005). "DNA replication origin plasticity and perturbed fork progression in human inverted repeats". *Mol Cell Biol* 25(15): 6789-6797.
- Lebofsky, R., R. Heilig, *et al.* (2006). "DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells". *Mol Biol Cell* 17(12): 5337-5345.
- 10 Lehmann, A. R. y S. Stevens (1980) "A rapid procedure for measurement of DNA repair in human fibroblasts and for complementation analysis of xeroderma pigmentosum cells". *Mutat. Res.* 69(1): 177-190.
- Limsirichaikul, S., A. Niimi, H. Fawcett *et al.* (2009) "A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU)". *Nucleic Acids Res.* 37(4): e31.
- 15 Lindahl, T. y R. D. Wood (1999) "Quality control by DNA repair". *Science* 286: 1897-1905.
- Lisby, S., R. Gniadecki *et al.* (2005) "UV-induced DNA damage in human keratinocytes: quantitation and correlation with long-term survival". *Exp Dermatol.* 14(5): 349-355.
- 20 MacKay, R. I., A. Niemierko *et al.* (1998) "Potential clinical impact of normal tissue intrinsic radiosensitivity testing". *Radiother. Oncol.* 46: 215-216.
- 25 Mackay, R. Land J. H Hendry (1999) "The modeled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability". *Radiother. Oncol.* 50: 67-75.
- McCabe, K. M., S. B. Olson *et al.* (2009) "DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells". *J Cell Physiol.* 220(3): 569-573.
- 30 Michalet, X., R. Ekong, *et al.* (1997). "Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies". *Science* 277(5331): 1518-1523.
- Nakamura, J., V. E. Walker *et al.* (1998) "Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions". *Cancer Res.* 58: 222-225.
- 35 Olive, P. L. (2009) "Impact of the comet assay in radiobiology". *Mutat. Res.* 681:13-23.
- Ostling, O. y K. J. Johanson (1984) "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells". *Biochem Biophys Res Commun.* 123(1): 291-298.
- 40 Pasero, P., A. Bensimon, *et al.* (2002). "Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus". *Genes Dev* 16(19): 2479-2484.
- 45 Pfeifer, G. P. (1997) "Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment". *Photochem Photobiol.* 65(2): 270-283.
- Plotz, G., S. Zeuzem *et al.* (2006) "DNA mismatch repair and Lynch syndrome". *J Mol Histol.* 37(5-7): 271-283.
- 50 Rao, V. A., C. Conti, *et al.* (2007). "Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks". *Mol Cancer Res* 5(7): 713-724.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch *et al.* (1998) "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139". *J Biol Chem.* 273(10): 5858-5868.
- 55 Salic, A. y T.J. Mitchison (2008) "A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 105(7): 2415-2420.
- Sattler, U., P. Frit *et al.* (2003) "Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells" *EMBO Re.* 4(4): 363-367
- 60 Saul, R. L. y B. N. Ames (1986) "Background levels of DNA damage in the population". *Basic Life Sci.* 38: 529-535.
- Schurra, C. y A. Bensimon (2009). "Combing genomic DNA for structural and functional studies". *Methods Mol Biol* 464: 71-90.
- 65

- Shrivastav, M., L. P. De Haro *et al.* (2008) "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice". *Cell Res.* 18(1): 134-147.
- 5 Shuck S. C., E. A. Short *et al.* (2008) "Eukaryotic nucleotide excision repair, from understanding mechanisms to influencing biology". *Cell Res.* 18(1): 64-72.
- Spitz, M. R., Q. Y. Wei, Q. Dong *et al.* (2003) "Genetic susceptibility to lung cancer: The role of DNA damage and repair". *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 12:689-698.
- 10 Srivastava, D. K., B. J. Berg *et al.* (1998) "Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps". *J. Biol. Chem.* 273(33): 21203-21209.
- Stausbol-Gron, B., J. Overgaard (1999) "Relationship between tumour cell in vitro radiosensitivity and clinical outcome after curative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck". *Radiother Oncol* 50: 47-55.
- 15 Suzuki, K., M. Ojima *et al.* (2003) "Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability". *Oncogene* 22(45):6988-6993.
- Svetlova, M., L. Solovjeva, N. Pleskach *et al.* (2002) "Clustered sites of DNA repair synthesis during early nucleotide excision repair in ultraviolet light-irradiated quiescent human fibroblasts". *Exp. Cell Res.* 276(2): 284-295.
- 20 Tegenfeldt, J. O., C. Prinz *et al.* (2004) "The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 101(30):10979-10983.
- 25 Tornaletti, S. y P. C. Hanawalt (1999) "Effect of DNA lesions on transcription elongation". *Biochimie* 81: 139-148.
- Torres-Roca, J. F., C. W. Stevens (2008) "Predicting response to clinical radiotherapy: past, present, and future directions". *Cancer Control.* 15(2):151-156.
- 30 van der Wees, C., J. Jansen *et al.* (2007) "Nucleotide excision repair in differentiated cells". *Mutat Res.* 614(1-2): 16-23.
- Vasireddy, R. S., C. N. Sprung *et al.* (2010) "H2AX phosphorylation screen of cells from radiosensitive cancer patients reveals a novel DNA double-strand break repair cellular phenotype". *Br. J. Cancer* 102(10): 1511-1518.
- 35 Warren, J. J., L. J. Forsberg *et al.* (2006) "The structural basis for the mutagenicity of O6-methyl-guanine lesions". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 103(52): 19701-19706.
- White, C. I., S. G. Sedgwick (1985) "The use of plasmid DNA to probe DNA repair functions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* 201: 99-106.
- 40 Zharkov, D. O. (2008) "Base excision DNA repair". *Cell Mol Life Sci.* 65(10):1544-1565.
- Zhou, B. B. y S. J. Elledge (2000) "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective". *Nature* 408: 433-439.
- 45

Modificaciones y otras realizaciones

- 50 Para los expertos en la materia, serán evidentes diversas modificaciones y variaciones de los métodos, de las composiciones y de los kits descritos según el concepto de la invención sin alejarse de la invención reivindicada. Aunque la invención se ha descrito en relación con determinadas realizaciones preferidas, se ha de entender que la invención según lo reivindicado no pretende limitarse a dichas realizaciones específicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de detección de la presencia o de la ausencia de una o más partes reparadas en uno o más ácidos nucleicos dañados, en el que dicho daño se produjo en el ácido nucleico de células, comprendiendo dicho método:
- 10 (a) tratar una muestra que contiene células en cultivo antes de extraer el/los ácido/s nucleico/s de dicha muestra mediante la adición de un nucleótido o nucleósido detectable durante un tiempo y en condiciones suficientes para la interacción con los ácidos nucleicos, en el que dicho nucleótido o nucleósido detectable es incorporado por una o más enzimas presentes dentro de dichas células vivas y capaces de escindir dicho daño del ácido nucleico y reemplazarlo por dicho nucleótido o nucleósido detectable;
- 15 (b) extraer uno o más ácidos nucleicos de dicha muestra y, opcionalmente, aclarar o lavar la muestra de ácidos nucleicos extraídos;
- (c) estirar el/los ácido/s nucleico/s extraído/s;
- (d) detectar el nucleótido o el nucleósido detectable en el/los ácido/s nucleico/s estirado/s; y
- (e) detectar la presencia de la/s parte/s reparada/s en el ácido nucleico cuando dicho nucleótido o nucleósido detectable se detecta, y detectar la ausencia de una parte reparada en el/los ácido/s nucleico/s cuando dicho nucleótido o nucleósido detectable no se detecta.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el/los ácido/s nucleico/s extraído/s se estiran usando rastreo molecular.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el daño se repara en células vivas mediante el sistema de reparación de escisiones de nucleótidos y en el que la sustancia es un nucleósido modificado químicamente o marcado, en particular, 5-etinil-2'-desoxi-uridina, y se incorpora a partes dañadas del/de los ácido/s nucleico/s a través de la síntesis de ADN no programada.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además:
- (a) hibridar una o más sondas específicas de secuencias correspondientes a una o más posiciones o regiones conocidas específicas del ácido nucleico y, opcionalmente,
- 30 (b) medir la distancia o la distribución espacial entre las sondas hibridadas y el nucleótido o el nucleósido detectable correspondiente a una o más secuencias de ácido nucleico reparadas.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra es una muestra de tejido, o una muestra de sangre, de líquido cefalorraquídeo, de líquido sinovial o de linfa.
- 35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra se obtiene de un sujeto que tiene cáncer o que ha sido sometido a tratamiento del cáncer o que tiene una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune o enfermedad o afección inflamatoria.
- 40 7. Un método de diagnóstico de una enfermedad, un trastorno o una afección en un sujeto, que comprende la detección de una o más partes reparadas de ácido/s nucleico/s extraído/s de una muestra de este sujeto mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 8. Un proceso de determinación del efecto de un agente de ensayo en uno o más ácidos nucleicos en una célula, que comprende:
- poner en contacto la célula con dicho agente de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dañe el/los ácido/s nucleico/s de la célula; y
- 50 detectar una parte reparada del/de los ácido/s nucleico/s de dicha célula mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y, opcionalmente,
- detectar una o más partes reparadas del/de los ácido/s nucleico/s de células por lo demás idénticas no expuestas a dicho agente de ensayo y comparar la/s parte/s reparada/s detectada/s con las de las células expuestas.
- 55 9. El proceso de la reivindicación 8, en el que dicho agente de ensayo es un compuesto genotóxico o una radiación ionizante genotóxica.

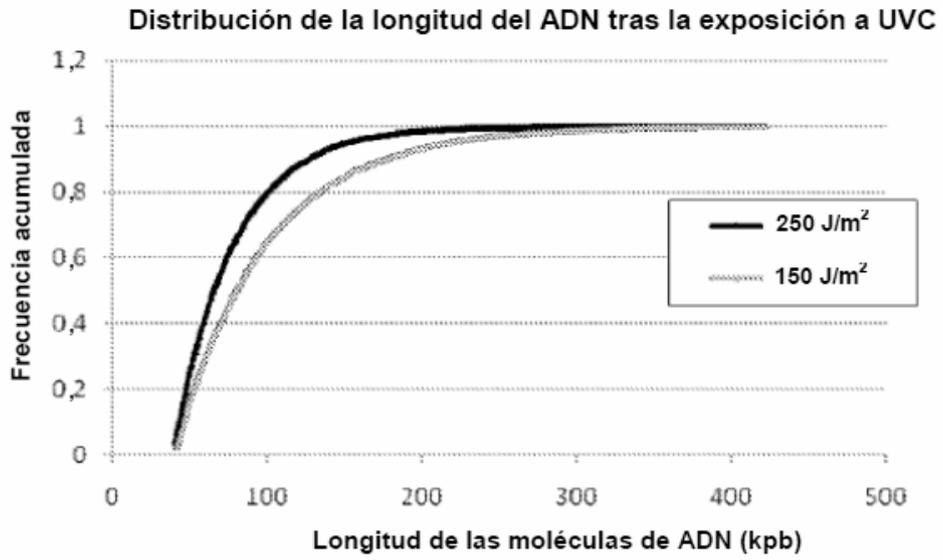


Figura 1

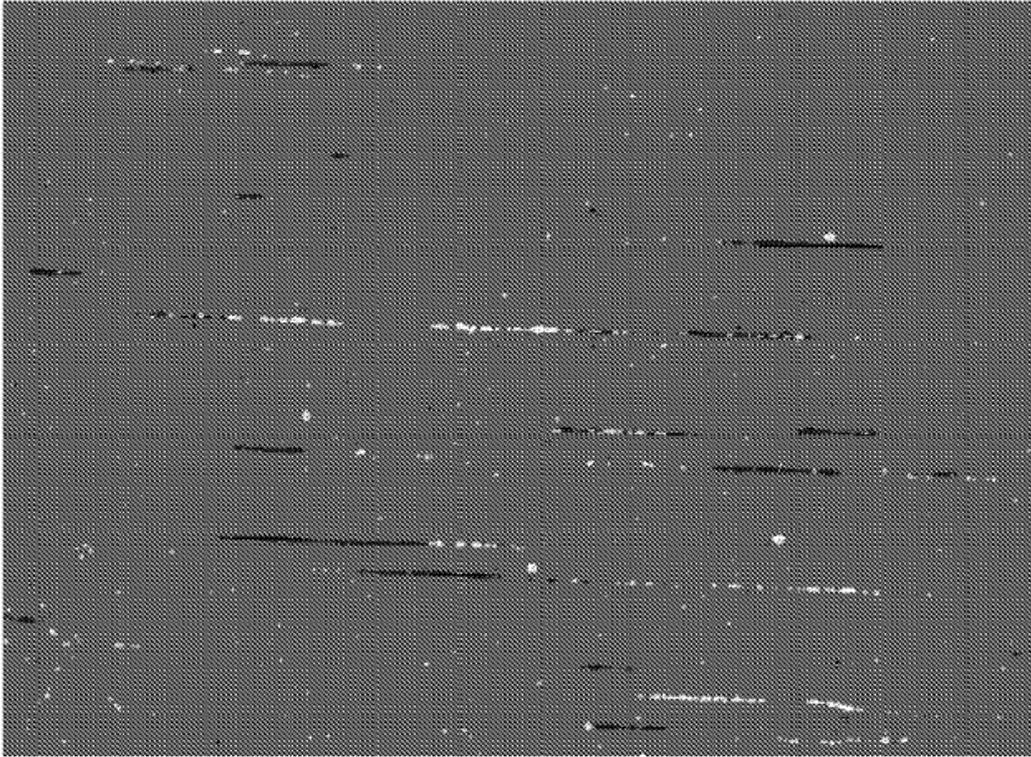


Figura 2

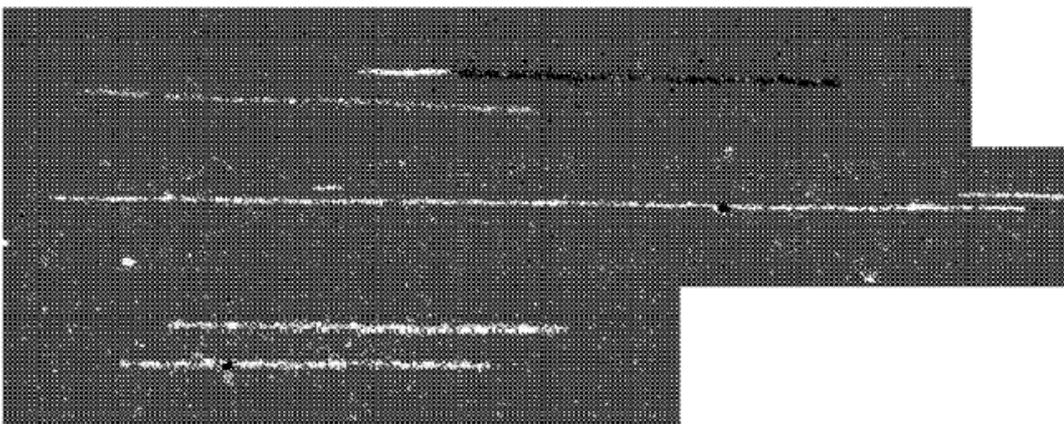


Figura 3

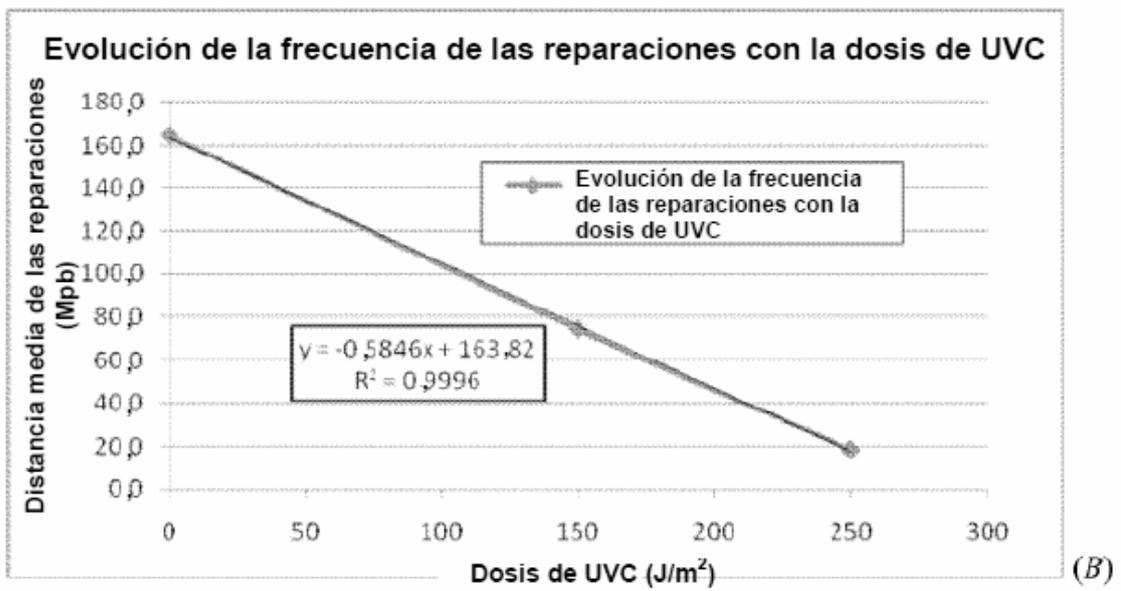
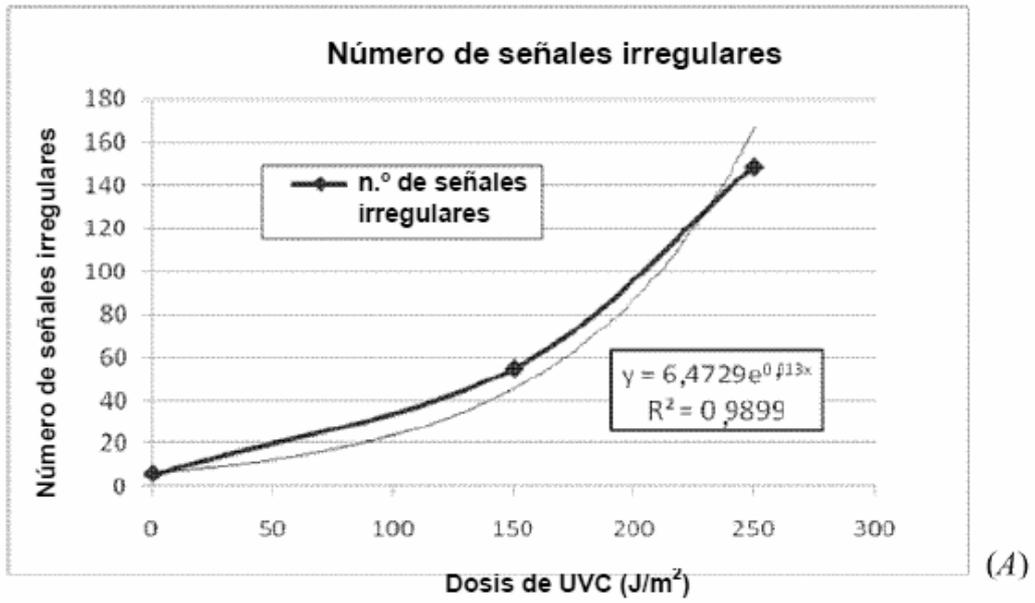


Figura 4

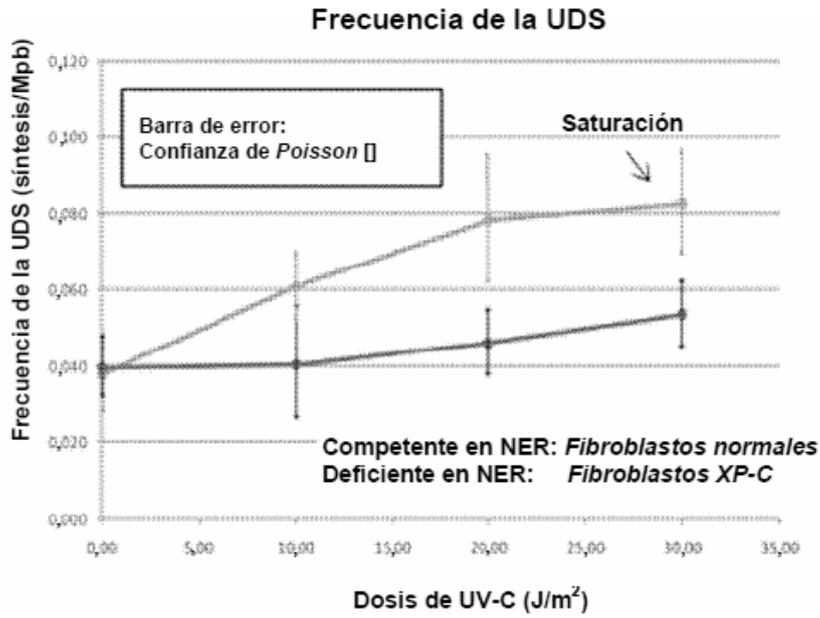


Figura 5

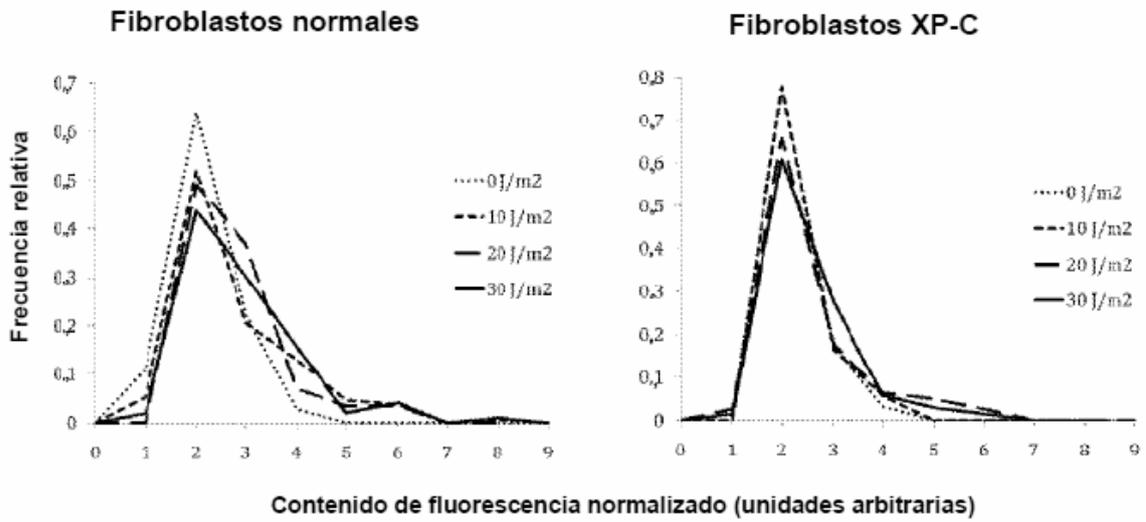


Figura 6

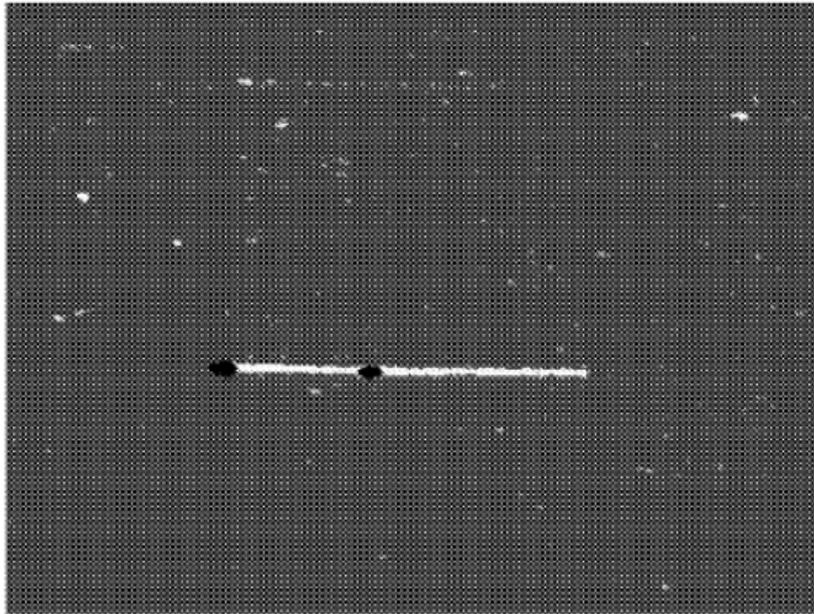


Figura 7

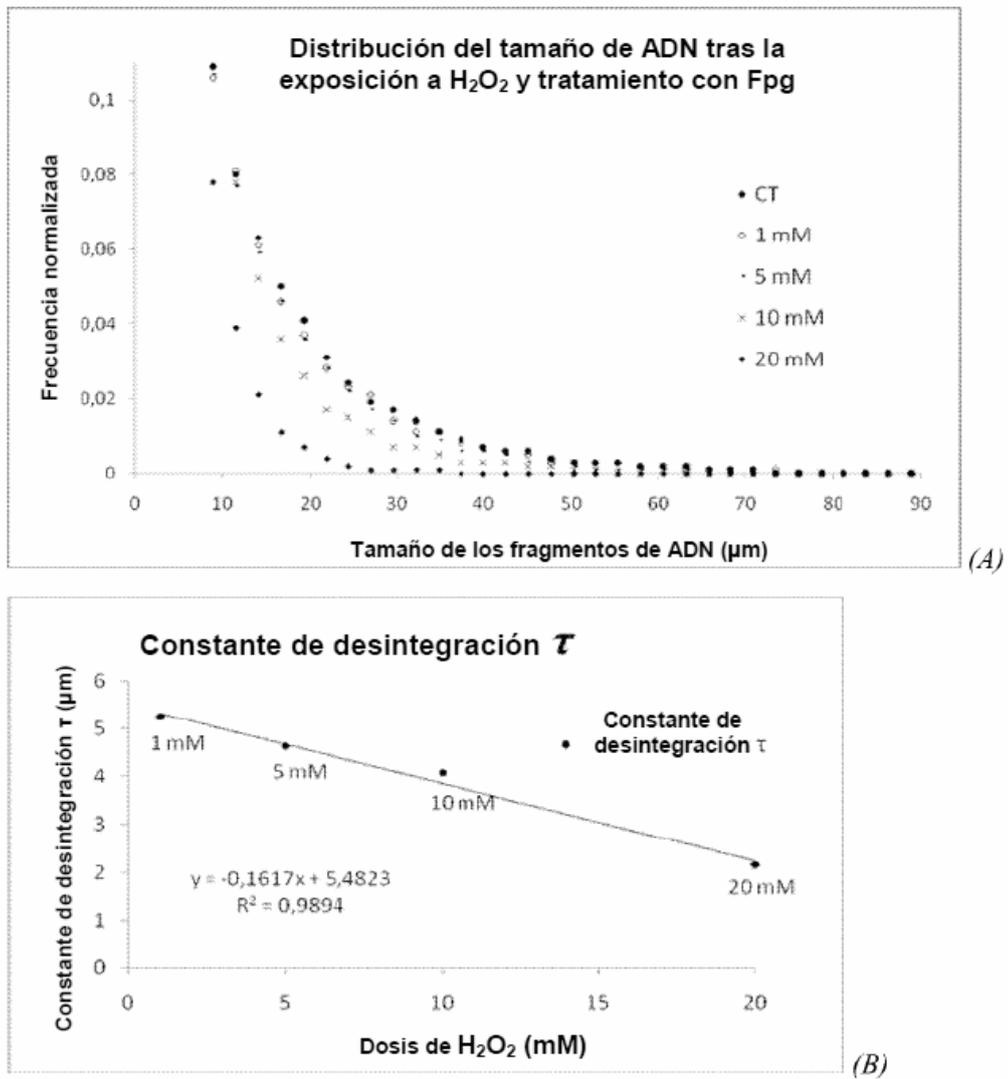


Figura 8

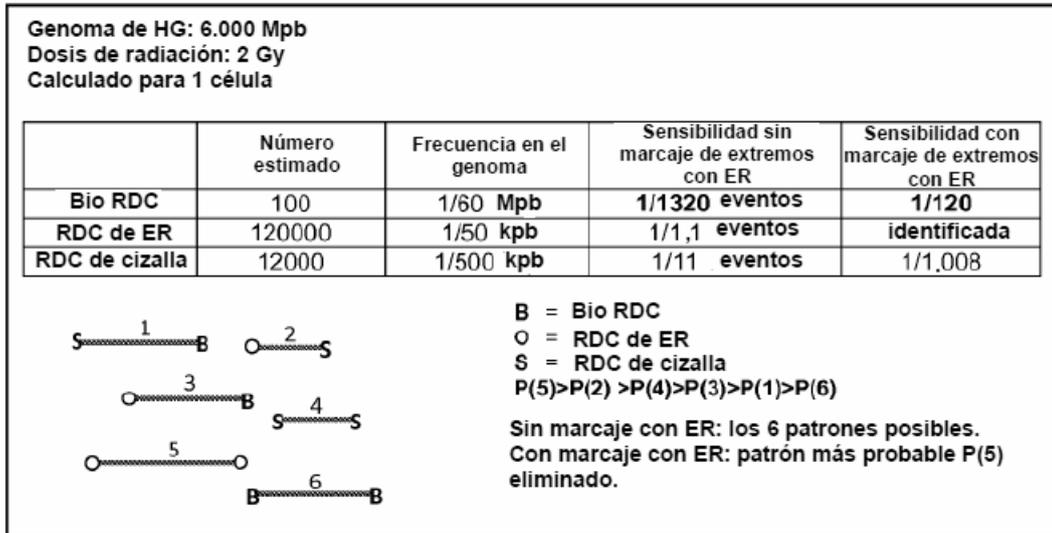


Figura 9