

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 732**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/US2014/031957**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14729760 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2978861**

54 Título: **Marcadores de metilación de ADN no sesgados que definen un defecto de campo amplio en tejidos de próstata histológicamente normales asociados al cáncer de próstata: nuevos biomarcadores para hombres con cáncer de próstata**

30 Prioridad:

28.03.2013 US 201361806218 P

29.03.2013 US 201361806566 P

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

22.04.2021

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

**614 Walnut Street
Madison, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**JARRARD, DAVID, FRAZIER y
YANG, BING**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 820 732 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

Marcadores de metilación de ADN no sesgados que definen un defecto de campo amplio en tejidos de próstata histológicamente normales asociados al cáncer de próstata: nuevos biomarcadores para hombres con cáncer de próstata

Referencia cruzada a solicitud relacionada

[Eliminado]

[Eliminado]

Antecedentes

Se estima que 198.280 hombres fueron diagnosticados de cáncer de próstata y 27.360 hombres murieron de cáncer de próstata (PCa) en 2009 en los EE. UU. (Jemal *et al.*, (2009) CA Cancer J Clin 59, 225-249). Las herramientas predominantes para la detección temprana del cáncer de próstata son la prueba del antígeno prostático específico (PSA) y el tacto rectal (DRE). Sin embargo, del 65 % al 70 % de los hombres con un PSA total que varía entre 4,0-10,0 ng/ml tienen un resultado de biopsia de próstata negativo. Además, el 15% de los pacientes con PCa tienen niveles de PSA <4,0 ng/ml, lo que indica una capacidad predictiva débil (Thompson *et al.*, (2004) N Engl J Med 350, 2239-2246). La detección basada en el PSA también detecta cánceres no significativos lo que representa un 50 % estimado de sobrediagnóstico (Fritz *et al.*, (2009) The New England Journal of Medicine 360). Actualmente, la FDA está realizando ensayos de una prueba en orina que examina una molécula de ARN denominada PCA-3. La biopsia de próstata se usa para confirmar la enfermedad. Sin embargo, debido a errores en la recogida de muestras normalmente se requieren conjuntos repetidos de muestras para hacer un diagnóstico (Gann *et al.*, (2010) JCO 28, 7). Los esquemas de biopsia típicos incluyen 10-12 o más núcleos de tejido extraídos con anestesia local. A menudo, se requiere repetir la biopsia dos o tres veces para descartar cáncer debido a errores en la recogida de muestras. Los cánceres también pueden pasarse por alto debido a problemas en la recogida de muestras.

Existe una clara necesidad de biomarcadores que permitan un diagnóstico y pronóstico más fácil y preciso del cáncer de próstata. También se hace referencia a:

- US2012/135877 A1 que se refiere a marcadores de ADN para el defecto de campo del cáncer de próstata; y
- Truong *et al* (2012) J. Urol. 189(6): 2335-2341 que se refiere al uso del defecto de campo epigenético para detectar cáncer de próstata en pacientes con biopsia negativa.

Sumario de la invención

En una realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar cáncer de próstata en un sujeto humano que comprende cuantificar la metilación en el ADN genómico obtenido del sujeto humano en al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39, en donde los cambios de metilación significativos indican la presencia de cáncer de próstata o un defecto de campo del cáncer de próstata, en donde el cambio es respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata. También se proporciona un método en el que se seleccionan al menos dos, tres o cuatro regiones del grupo que consiste en regiones diana CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, NCR2, WNT2, EXT1 y SPAG4 en donde se seleccionan al menos EXT1 o SPAG4. Preferentemente, el cambio de metilación significativo es $p < 0,05$ o al menos ± 50 % de los porcentajes de pirosecuenciación o factores de cambio mostrados en la Tabla 1.

También se divulga el producto de amplificación descrito anteriormente.

También se divulga una combinación del producto de amplificación descrito anteriormente y materiales útiles para determinar el estado de metilación.

En otra realización, el ADN genómico se obtiene del tejido de próstata. En otra realización, el ADN genómico se obtiene del fluido corporal preferentemente seleccionado del grupo que consiste en orina y semen. Lo más preferentemente el fluido corporal es orina.

En una realización preferida, se utilizan conjuntos de cebadores para la amplificación de la región diana y se biotinila al menos un cebador dentro de cada conjunto de cebadores.

En otra realización preferida más, la metilación se cuantifica mediante pirosecuenciación.

También se divulga la cuantificación de metilación que comprende analizar si las regiones CAV1, EVX1 o MCF2L están hipermetiladas o si las regiones FGF1, WNT2 o NCR2 están hipometiladas como una correlación positiva con el defecto del campo del cáncer de próstata. Preferentemente, los loci diana comprenden secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6. Preferentemente, los loci diana se amplifican usando al menos un

conjunto de los cebadores de la Fig. 12.

En otra realización, la cuantificación de metilación comprende analizar si la región diana de SEQ ID NO: 39 está hipermetilada y la región diana de SEQ ID NO: 18 está hipometilada como una correlación positiva con el defecto de campo del cáncer de próstata. Preferentemente, los loci diana se amplifican usando al menos un conjunto de los cebadores de la Fig. 25.

En otra realización, la cuantificación de la metilación comprende analizar si la región diana de SEQ ID NO: 39 está hipermetilada o si la región diana de SEQ ID NO: 18 está hipometilada como una correlación positiva con el defecto de campo del cáncer de próstata. Si CAV1, EVX1 o MCF2L está hipermetilada o FGF1, WNT2 o NCR2 está hipometilada se puede analizar adicionalmente en aquellos loci diana que tienen las secuencia de SEQ ID NO: 1-6, 18 y 39. Preferentemente, los loci diana se amplifican usando al menos un conjunto de los cebadores de las Figs. 12 y 25.

En otra realización, el sujeto humano es un paciente con cáncer de próstata.

También se divulga un método para diagnosticar un defecto de campo del cáncer de próstata de alto grado en un sujeto humano que comprende las etapas de: (a) cuantificar la metilación en el ADN genómico obtenido de un sujeto humano en al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en la diana NCR2 y WNT2, en donde cambios de metilación significativos indican la presencia de un defecto de campo del cáncer de próstata de alto grado o cáncer de próstata, en donde el cambio es respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata; y (b) tratar al sujeto humano por un defecto de campo del cáncer de próstata de alto grado en función de los resultados de las etapas (a) y (b).

También se divulga un método de detección de biomarcadores para el cáncer de próstata que comprende las etapas de: (a) cuantificar la metilación en el ADN genómico obtenido de un sujeto humano en al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-6 y 18, 39; en donde los cambios de metilación significativos indican la presencia de un defecto de campo del cáncer de próstata o cáncer de próstata, en donde el cambio es respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata.

También se divulga un método de detección de biomarcadores para el cáncer de próstata que comprende las etapas de: (a) cuantificar la metilación en el ADN genómico obtenido de un sujeto humano en al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61-77 y 94-97; en donde los cambios de metilación significativos indican la presencia de un defecto de campo del cáncer de próstata o cáncer de próstata, en donde el cambio es respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata.

Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente memoria descriptiva detallada junto con los dibujos adjuntos.

40 Breve descripción de los dibujos

Este archivo de solicitud de patente contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La invención se comprenderá mejor y las características, aspectos y ventajas distintos de los expuestos anteriormente se harán evidentes cuando se considere la siguiente descripción detallada de la misma. Dicha descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en donde:

La Fig. 1 muestra la secuencia de la región diana de CAV1 (SEQ ID NO: 1).

La Fig. 2 muestra la secuencia de la región diana de EVX1 (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 muestra la secuencia de la región diana de MCF2L (SEQ ID NO: 3).

La Fig. 4 muestra la secuencia de la región diana de FGF1 (SEQ ID NO: 4).

La Fig. 5 muestra la secuencia de la región diana de NCR2 (SEQ ID NO: 5).

La Fig. 6 muestra la secuencia de la región diana de WNT2 (SEQ ID NO: 6).

La Fig. 7 muestra las secuencias de la sonda usada en la matriz de metilación para los genes CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, NCR2 y WNT2.

La Fig 8 es un diagrama que demuestra la microdissección del tejido de próstata.

La Fig. 9A muestra la distribución en todo el genoma de las diferencias de la matriz de metilación del ADN en 385.000 loci en tejidos de próstata asociados a tumores (TA) histológicamente normales en comparación con tejidos no asociados a tumores (NTA). Se generaron diferencias significativas en la metilación entre los tejidos de próstata TA y NTA utilizando un punto de corte de la puntuación de la sonda de $-\log_{10} [p]$ que varió de 2 a 10, lo que tuvo como resultado alrededor de 1.000 sondas en cada cromosoma y 18.101 sondas en total. Después del análisis estadístico que compara las relaciones \log_2 entre los grupos NTA y TA, se determinaron diferencias de metilación significativas entre los grupos usando una prueba t ($P < 0,05$). Un total de 615 sondas se metilaron diferencialmente en tejidos TA, 537 demostraron hipometilación y 78 hipermetilación. El porcentaje (eje) es el número de sonda significativamente alterado frente al número de sonda total analizado para cada cromosoma. Los

cromosomas 15 y 20 se metilaron diferencialmente en mayor medida que otros cromosomas.

La Fig. 9B muestra los cambios de metilación significativos en 41.522.036-4.2004.151 en el cromosoma 15p. Los datos se representan como una relación de TA/NTA media.

La Fig. 9C muestra los cambios de metilación significativos en 33.343.402.-33.565.080 en el cromosoma 20p. Los datos se representan como una relación de la TA/NTA media.

La Fig. 9D es un mapa de calor de cambios significativos en la matriz de metilación del ADN utilizando agrupación jerárquica no supervisada. Utilizando criterios más estrictos (prueba t, $p < 0,01$), se muestran 87 sondas comparando conjuntos de NTA (izquierda) con TA (derecha) y se ordenan jerárquicamente de arriba a abajo por hipermetilación a hipometilación relativa. El verde indica hipometilación relativa, mientras que las áreas sombreadas en rojo muestran hipermetilación. El mapa de calor se generó con JAVA TMEV™ (MultiExperiment View).

La Fig. 10 es una representación esquemática de las CpG analizadas por pirosecuenciación. La relación entre ObsCpG/ExpCpG y el porcentaje de GC para todas las regiones es: CAV1 1,2, 60 %; EVX1 0,8, 60 %; FGF1 1,0, 50 %; MCF2L 1,0, 60 %; NCR2 0,5, 50 %; WNT2 1,0, 50 %.

La Fig. 11A-D muestra las metilaciones de CAV1, EVX1, MCF2L y FGF1. Para analizar la metilación de CAV1, analizamos la metilación de diez CpG y ocho de las diez CpG mostraron un aumento significativo de la metilación en el tejido de próstata T (tumor), TAA (adyacente asociado a tumor) y TAD (distante asociado a tumor) en comparación con NTA (tejido de próstata normal no asociado a tumor). La figura muestra los porcentajes de metilación de la sexta CpG y son 14 %, 45 %, 27 % y 26 % para los tejidos de próstata NTA, T, TAA y TAD, respectivamente. *prueba t. Se utilizó $P < 0,05$ para todas las figuras siguientes. Para analizar la metilación de EVX1, probamos seis CpG para EVX1 y cuatro de las seis mostraron un aumento significativo de la metilación en T, TAA y TAD en comparación con los tejidos de próstata NTA. Esta figura muestra el porcentaje de metilación de la tercera CpG y son 22 %, 45 %, 31 % y 28 % para los tejidos de próstata NTA, T, TAA y TAD, respectivamente. Para MCF2L, la región detectada contiene nueve CpG y tres de las nueve CpG mostraron un aumento significativo de metilación en T, TAA y TAD en comparación con el tejido de próstata NTA. Esta figura muestra la metilación de la primera CpG y son 80 %, 88 %, 85 % y 85 % para los tejidos de próstata NTA, T, TAA y TAD, respectivamente. Para FGF1, las cuatro CpG que analizamos mostraron una metilación significativamente disminuida en TAA y TAD en comparación con el tejido de próstata NTA, pero no un cambio significativo en el tejido de próstata T. Esta figura muestra el porcentaje de metilación de la tercera CpG y son 71 %, 73 %, 60 % y 61 % para los tejidos de próstata NTA, T, TAA y TAD, respectivamente.

La Fig. 11E-F muestra las metilaciones de NCR2 y WNT2. Para NCR2, se analizaron tres CpG dentro de la región diana. En la próstata con grado alto (grado de Gleason ≥ 8 , H), la tercera CpG mostró una metilación significativamente menor en el tejido de próstata T y TAA en comparación con el tejido de próstata NTA. Sin embargo, en la próstata con grado intermedio (grado de Gleason 6 y 7, Int), el cambio de metilación de esta CpG solo fue significativo en la próstata T. Esta figura muestra la metilación de la tercera CpG y son 75 %, 69 %, 63 %, 68 % y 70 % para los tejidos de próstata NTA, T (Int), T (H), TAA(H) y TAD(H), respectivamente. Para WNT2, detectamos metilación de las cuatro CpG. En la próstata con alto grado, dos de ellas mostraron una metilación significativamente disminuida en los cuatro tejidos de próstata T, TAA y TAD en comparación con el tejido de próstata NTA. Sin embargo, en la próstata con grado intermedio, el cambio en la metilación fue solo significativo en el tejido de próstata T. Esta figura muestra la metilación de la tercera CpG y son 95 %, 87 %, 79 %, 89 % y 89 % para los tejidos de próstata NTA, T (Int), T (H), TAA(H) y TAD(H), respectivamente.

La Fig. 12 muestra las secuencias de los cebadores usados para la pirosecuenciación.

La Fig. 13 muestra la expresión de AMACR en los tejidos de próstata NTA, T, TAA y TAD que se usarán en la metilación cuantitativa por pirosecuenciación. La expresión de AMACR se ensayó con RT-PCR cuantitativa, los datos se muestran como ΔCT . Dos muestras de NTA y tres de TA (T,TAA,TAD) se excluyeron del grupo experimental debido a una mayor expresión de AMACR.

La Fig. 14 muestra la secuencia de la región ampliada de CAV1 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa.

La Fig. 15 muestra la secuencia de la región ampliada de EVX1 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa.

La Fig. 16 muestra la secuencia de la región ampliada de MCF2L para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa.

La Fig. 17 muestra la secuencia de la región ampliada de FGF1 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa. Dado que no hay una isla CpG dentro de la región promotora, todas las regiones mostradas están dentro de los intrones entre los exones uno y tres.

La Fig. 18 muestra la secuencia de la región ampliada de NCR2 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa.

La Fig. 19 muestra la secuencia de la región ampliada de WNT2 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa.

La Fig. 20 muestra la secuencia de la región diana de EXT1 (SEQ ID NO: 18).

La Fig. 21 muestra la secuencia de la región diana de SPAG4 (SEQ ID NO: 39).

La Fig. 22 muestra las secuencias de la sonda usada en la matriz de metilación para los genes EXT1 y SPAG4. (SEQ ID NO: 86-87).

La Fig. 23 es una representación esquemática de las CpG analizadas por pirosecuenciación. La relación entre ObsCpG/ExpCpG y el porcentaje de GC para todas las regiones es: EXT1 0,8, 60 %; SPAG4 0.55, 60 %.

La Fig. 24 muestra las metilaciones de EXT1 y SPAG4. Para analizar la metilación de EXT1, analizamos la

metilación de seis CpG y cuatro de las seis CpG mostraron un aumento significativo de la metilación en el tejido de próstata T (tumor), TAA (adyacente asociado a tumor) y TAD (distante asociado a tumor) en comparación con NTA (tejido de próstata normal no asociado a tumor). La figura muestra los porcentajes de metilación de las seis CpG. *prueba t. Se utilizó $P < 0,05$ para todas las figuras siguientes. Para analizar la metilación de SPAG4, probamos cinco CpG para SPAG4 y cinco de las cinco mostraron un aumento significativo de la metilación en T, TAA y TAD en comparación con los tejidos de próstata NTA. Esta figura muestra el porcentaje de metilación de las cinco CpG.

La Fig. 25 muestra las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de la diana y la pirosecuenciación (SEQ ID NO: 88-93).

La Fig. 26 muestra la secuencia de la región ampliada de EXT1 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa (SEQ ID NO: 94).

La Fig. 27 muestra la secuencia de la región ampliada de SPAG4 para la detección de los cambios de metilación asociados al PCa (SEQ ID NO: 95-97).

La Fig. 28 muestra la metilación de EVX1, CAV1, FGF1 y NCR2 en orina de pacientes con biopsias positivas o negativas para el cáncer de próstata.

La Fig. 29 muestra el aislamiento de ADN de biopsias de próstata incluidas en parafina.

Descripción de la presente invención

En general

Al igual que otros cánceres humanos, el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata viene determinado por la interacción de cambios genéticos y epigenéticos (Schulz *et al.*, (2009) *Semin Cancer Biol* 19, 172-180). Los cambios en la metilación del ADN somático constituyen una excelente fuente de biomarcadores del cáncer por varias razones. Estos cambios se pueden detectar utilizando métodos de PCR con sensibilidad de copia única y los fragmentos pequeños de ADN son más estables en sangre y fluidos corporales que el ARN o las especies de proteínas. Además, se han descrito diferencias de metilación del ADN adquirido para casi todos los cánceres humanos. Por último, la hipermetilación somática de secuencias de islas CpG puede ser más constante para un cáncer dado que los cambios genéticos (Nelson *et al.*, (2009) *Endocrinology* 150, 3991-4002). Los patrones de metilación del ADN en los tumores también pueden discriminar la enfermedad agresiva frente a la no agresiva y predecir la respuesta a tratamientos específicos (Nelson *et al.*, (2009) *Endocrinology* 150, 3991-4002).

Las alteraciones genéticas y epigenéticas no parecen estar limitadas a las células cancerosas, ya que datos recientes indican que el tejido adyacente o distante al tumor también es anormal (Nonn *et al.*, (2009) *Prostate* 69, 1470-1479). Este defecto de campo (también denominado efecto de campo) se ha identificado en el cáncer de colon y de cabeza y cuello, así como en el de próstata basándose en las alteraciones en la expresión génica (YP, Y. (2004) *Journal of Clinical Oncology* 22; Chandran *et al.*, (2005) *BMC Cancer* 5, 45) y en la pérdida de impronta genómica (Agnieszka *et al.*, (2009) *International Journal Of Oncology* 35, 87-96). Los patrones de metilación aberrante en los promotores GSTP1, RARb2, APC y RASSF1A se han detectado en tejido epitelial o estromal normal adyacente al cáncer (Aitchison *et al.*, (2007) *Prostate* 67, 638-644; Hanson *et al.*, (2006) *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 255-261; Henrique *et al.*, (2006) *Mol Cancer Res* 4, 1-8). Estos genes están alterados en el tumor y representan un enfoque de un solo gen para analizar el efecto de campo. Los resultados varían en cuanto a si este efecto de campo se limita al tejido adyacente al tumor o si se encuentra en un tejido "normal" distante.

Mediante el uso de la presente invención, se puede tranquilizar a los hombres que tienen una biopsia negativa de que no hay cáncer al probar la presencia del defecto de campo sin biopsias futuras adicionales y evitar las complicaciones directamente asociadas al aumento del número y la frecuencia de las biopsias. Si se detectan cambios de metilación asociados a un defecto de campo de la biopsia, normalmente se obtendrán imágenes más detalladas con resonancia magnética y una sonda endorrectal y una estrategia de detección más agresiva que requiera anestesia y 30-50 biopsias para detectar y/o caracterizar la enfermedad. Este enfoque está asociado a riesgos adicionales asociados a la anestesia, infección, hemorragia y otros, y no se realiza de forma rutinaria. Además, es probable que estos pacientes sean sometidos a un control más minucioso.

En el desarrollo de la presente invención, los inventores han analizado tejidos histológicamente normales de hombres con y sin cáncer de próstata utilizando una técnica de alto rendimiento que escanea simultáneamente 385.000 regiones del genoma. Usando una matriz de metilación ENCODE humana (Roche Nimblegen), los inventores han encontrado distintas alteraciones en la metilación en loci específicos o "regiones diana". Los inventores asociaron cambios de metilación en estos loci a la presencia de cáncer de próstata. El análisis de estos loci en muestras de tejido de pacientes mejorará la detección del cáncer de próstata.

Por "histológicamente normal", se entiende el tejido de próstata que no tiene signos de enfermedad en la propia muestra, según los criterios morfológicos e histoquímicos estándar utilizados en patología. Por "normal" o "no asociado a tumor (NTA)", se entiende una muestra de próstata que no solo no contiene cáncer en sí, como lo define un patólogo, sino que tampoco contiene cáncer en ninguna otra parte de la próstata. Por "asociado a tumor (TA)", se entiende una muestra de próstata que no muestra evidencia de cáncer, pero que se obtiene de una próstata con evidencia de cáncer en otra localización. Cabe apreciar que tanto las muestras de próstata "no asociadas a tumores" como las "asociadas

a tumores" en esta solicitud son muestras de próstata "histológicamente normales".

Los métodos de PCR estándar generalmente implican la amplificación de una región diana utilizando un par de cebadores directo e inverso que están diseñados para ser complementarios a las secuencias que flanquean la región diana. El tamaño de un fragmento que puede amplificarse mediante PCR puede variar desde menos de 50 pares de bases (pb) hasta más de 10.000 pares de bases. De manera similar, la secuenciación de una región diana se puede lograr diseñando cebadores de secuenciación que sean complementarios a una secuencia de menos de 50 pb en dirección 5' del gen diana o más de 1000 pb en dirección 5' dependiendo de la tecnología de secuenciación seleccionada. Por tanto, es posible diseñar muchas permutaciones de cebadores de secuenciación o conjuntos de cebadores de PCR que sean capaces de amplificar una región diana determinada. Por ejemplo, dada una muestra que contiene ADN genómico que comprende un gen o región diana de 500 pb, se puede diseñar un conjunto de cebadores para amplificar i) la región diana explícita; o ii) una región que abarca la región diana que incluye la secuencia en dirección 5' y en dirección 3'. Si el requisito mínimo es un cebador de 20 pb y el tamaño del fragmento amplificado puede oscilar de 500 a 10.000 pb, el número de conjuntos de cebadores potenciales que se pueden usar para amplificar la región diana es del orden de 10⁴.

Se divulgan y pueden emplearse varios cebadores preferidos para la amplificación de regiones diana específicas. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que las regiones diana divulgadas en la presente invención pueden amplificarse mediante otros cebadores distintos de los descritos, que se han presentado a título ilustrativo. Se contemplan varios esquemas de secuenciación y amplificación por PCR.

Candidatos a biomarcadores

Los inventores identificaron ocho candidatos a biomarcadores asociados a los genes CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, WNT2, NCR2, EXT1 y SPAG4 que mostraron cambios significativos (p <0,05) en la metilación en las regiones diana cuando se compararon tejidos normales y asociados a tumores (Tabla 1). Las regiones CAV1, EVX1, MCF2L y SPAG4 mostraron hipermetilación, y las regiones FGF1, WNT2, NCR2 y EXT1 mostraron hipometilación.

Tabla 1

Gen	Localización	Función	Factor de cambio Micromatriz	Pirosecuenciación
CAV1	7q31.1	Candidato a gen supresor del tumor Un regulador negativo de la cascada de la Ras-p42/44 MAP cinasa Regulación negativa de la cascada JAK-STAT Una proteína armazón dentro de las membranas caveolares	7,6	30 % incrementado en el tumor, 12 % en asociado a tumor, adyacente y distante
EVX1	7p15-p14	Unión al ADN específica de la secuencia, factor de transcripción Un papel en la especificación de tipos de células neuronales.	7,1	23 % incrementado en el tumor, 6-13 % en asociado a tumor, adyacente y distante
FGF1	5q31	Vía de señalización del receptor de crecimiento de los fibroblastos Regulación positiva de la proliferación de células epiteliales Desarrollo embrionario, crecimiento celular, crecimiento e invasión tumoral	0,77	11-15 % disminuido en asociado a tumor, adyacente y distante
MCF2L	13q34	Actividad del factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho	4,5	8 % incrementado en el tumor, 5 % en asociado a tumor, adyacente y distante
NCR2	6p21.1	Aumenta la eficiencia de los linfocitos NK activados Mediar en la lisis de células tumorales	0,6	11 % disminuido en tumor, adyacente y distante para alto grado 5 % disminuido en tumor para grado intermedio

(continuación)

Gen	Localización	Función	Factor de cambio Micromatriz	Pirosecuenciación
WNT2	7q31.2	Vía de señalización del receptor Wnt, vía de modulación del calcio Implicado en la oncogénesis y en varios procesos de desarrollo (embriogénesis)	0,7	16 % disminuido en tumor, 5 % en adyacente y distante para alto grado 8 % disminuido en tumor para grado intermedio
EXT1	8q24.11	exostosin glicosiltransferasa Es una posible proteína supresora de tumores, implicada en la biosíntesis de glicosilaminoglicanos, transducción de señales, regulación negativa del ciclo celular, así como del desarrollo esquelético.	0,6	5 % disminuido en tumor, tejido de próstata histológicamente normal adyacente y distante.
SPAG4	20q11.21	antígeno asociado a espermatozoides 4 Actividad de molécula estructural, Espermatogénesis.	2,1	9 % incrementado en el tumor, 8 % en tejido de próstata histológicamente normal adyacente y 12 % en distante

Por "loci de genes" o "región diana", se entienden las regiones de genes descritas en las Figs. 1-6 y 20-21. Estas son las regiones de genes en las que correlacionamos la hipermetilación o la hipometilación con un defecto de campo del cáncer de próstata. La Fig. 12 describe secuencias de cebadores preferidas para determinar las perturbaciones de metilación en estas regiones diana seleccionadas. Las Figs. 12 y 25 describen secuencias de cebadores preferidas para determinar las alteraciones de metilación en estas regiones diana seleccionadas. La invención emplea al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y 39.

Por "loci de genes" o "región diana", se entienden a las regiones de genes descritas en las Figs. y 20-21. Estas son las regiones de genes en las que correlacionamos la hipermetilación o la hipometilación con un defecto de campo del cáncer de próstata. La Fig. 25 describe secuencias de cebadores preferidas para determinar las perturbaciones de metilación en estas regiones diana seleccionadas. La invención emplea al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y 39.

15 Realizaciones de la presente invención

En una realización, se puede diagnosticar cáncer de próstata en un sujeto humano detectando un defecto de campo de cáncer de próstata en muestras de biopsia de tejido histológicamente normal tomadas de hombres que pueden tener cáncer de próstata. Basándose en los resultados de los métodos de detección descritos en el presente documento, el sujeto puede ser diagnosticado de cáncer de próstata y/o tratado para el cáncer de próstata mediante terapias convencionales. Una ventaja de la presente invención es que se necesitan menos biopsias para la detección del cáncer de próstata. En una realización preferida, la presencia de un defecto de campo de cáncer de próstata puede detectarse basándose en solo 1-2 muestras de biopsia con aguja gruesa tomadas de cualquier parte de la próstata. Preferentemente, se examinaría una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho dianas divulgadas en la Tabla 1. Además, en individuos que han tenido una biopsia negativa pero cuyos PSA continúan aumentando, el análisis de las muestras obtenidas previamente para el estado de metilación en las regiones diana determinará si es necesario realizar una evaluación adicional. Por ejemplo, si el estado de metilación en cualquiera de las regiones diana es anormal, se realizaría un conjunto de biopsias más intensivas que requieren anestesia. Si no, el paciente puede estar tranquilo.

En una realización típica, la invención se realiza en muestras de tejido de próstata obtenidas mediante protocolos de ecografía transrectal estándar y biopsia usando una aguja de calibre 18 (Brooks *et al.* (2010) J. Natl. Med. Assoc. 102(5), 423-429). En otra realización, la invención se realiza en tejidos de próstata obtenidos a partir de bloques de parafina de muestras de biopsia de próstata que ya se han obtenido y examinado.

Para examinar el estado de metilación de las regiones diana, normalmente se realizaría la invención en el ADN genómico obtenido de las muestras de tejido. El ADN genómico purificado se somete a continuación normalmente a una modificación con bisulfito de sodio. Presentamos datos que demuestran la capacidad de obtener suficiente ADN para el análisis utilizando tejido de próstata nuevo o incluido en parafina (Véase la Fig. 29).

En general, el ADN modificado con bisulfito se somete a una reacción de PCR que contiene uno o varios pares de cebadores y sondas en loci de genes específicos de al menos uno de los loci CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, WNT2, NCR2, EXT1 y SPAG4 detallados en las Figs. 1-6 y 20-21. La amplificación del ADN y la cuantificación de la metilación

se evaluarán en uno o varios tubos incluidos como parte de un kit. En una realización, a continuación se sometería el ADN modificado con bisulfito a PCR cuantitativa específica de metilación (MS-QPCR) tal como MethyLight (WO 00/70090) o HeavyMethyl WO 02/072880). Un kit típico para usar en el ensayo MethyLight de esta realización contendría cebadores y sondas de regiones diana detalladas en las Figs. 1-6 y 20-21, y cebadores de genes de referencia de tipo silvestre como Beta-Actina, tampón de PCR, dNTP, MgCl₂, polimerasa, controles de metilación positivos y negativos y una dilución de referencia. También se divulga el producto de amplificación descrito anteriormente. En una realización típica, las dianas de ADN son ADN modificado con bisulfito. En otra realización típica, el producto de amplificación comprende el producto de amplificación de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de las dianas combinadas en un recipiente, tal como un tubo o pocillo. Preferentemente, el producto de amplificación de ADN es al menos 90 % del ADN diana, lo más preferiblemente 95 % o 99 %.

También se divulga una combinación del ADN tratado con bisulfito descrito anteriormente y materiales útiles para determinar el estado de metilación.

En otra realización, se sometería el ADN modificado con bisulfito a amplificación por PCR para amplificar al menos una de las regiones diana detalladas en las Figs. 1-6 y 20-21 donde se amplifica al menos una de las SEQ ID NO: 18 y 39. Los productos de la PCR se someterían a pirosecuenciación para la detección de metilación. El kit para este ensayo contendría al menos un par de cebadores para las regiones diana detalladas en las Figs. 1-6 y 20-21, donde está presente al menos un par que permite la amplificación de la SEQ ID NO: 18 o 29, cebador directo o inverso biotinilado, tampón de PCR, dNTP, MgCl₂, Taq polimerasa para la amplificación del ADN modificado con bisulfito. También se incluyen normalmente un cebador de secuenciación y controles, que normalmente incluyen controles de metilación positivos y negativos y una referencia de dilución.

En otra realización, el ADN tratado con bisulfito (se necesita una amplificación por PCR inicial si el ADN modificado con bisulfito es inferior a 20 ng) se somete a un ensayo Invader® para detectar cambios en la metilación. El ensayo Invader® implica el uso de la química Invader® (Hologic Inc.; invaderchemistry.com; Day, S., and Mast, A. Invader assay, 2004; Capítulo en Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. Marcel Dekker, Inc., Patentes de Estados Unidos números 7.011.944; 6.913.881; 6.875.572 y 6.872.816). En el ensayo Invader®, se usaría una endonucleasa flap (FEN) específica de la estructura (FEN) para escindir un complejo tridimensional formado por hibridación de oligonucleótidos solapantes específicos de C/T con el ADN diana que contiene un sitio CG.

El kit para este ensayo contendría normalmente los cebadores y las sondas de regiones diana únicas o múltiples detalladas en las Figs. 1-6 y 20-21, donde está presente al menos un par que permite la amplificación de la SEQ ID NO: 18 o 39 y controles, que normalmente incluyen un gen de referencia, tal como beta-actina, controles de metilación positivos y negativos y una dilución de referencia.

En otra realización, los productos de PCR se purifican, se desnaturalizan a una sola hebra y se hibridan con un cebador de secuenciación para la cuantificación de la metilación mediante pirosecuenciación en los loci de genes específicos de al menos uno de los loci descritos anteriormente.

En todas las realizaciones, se examinarían los productos de amplificación en busca de un cambio significativo en el patrón de metilación. Se pueden examinar varios criterios para evaluar un cambio significativo. Por ejemplo, un hallazgo de ± 50 % del factor de cambio indicado en la Tabla 1 en los valores de metilación de al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y 39 indicaría la presencia de un efecto de campo de cáncer de próstata. CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, WNT2 y NCR2 se pueden empelar adicionalmente. Un cambio significativo también puede ser cualquier cambio estadísticamente significativo en el patrón de metilación en relación con el tejido normal de hombres sin antecedentes de cáncer de próstata. Por ejemplo, un cambio significativo puede caracterizarse por un valor p menor de 0,05. Como se describe a continuación, se desearía utilizar pirosecuenciación como método de cuantificación y evaluar la muestra en cuanto al porcentaje de pirosecuenciación, como se indica en la Tabla 1.

También es posible que se desee examinar el cambio en la metilación en islas CpG específicas. (El ejemplo siguiente divulga la caracterización específica de islas CpG para las ocho regiones diana). Preferentemente, se determinaría el estado de metilación de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los loci de genes detallados en las Figs. 1-6 y 20-21.

Como se ha descrito anteriormente, existen muchas técnicas para medir la metilación del ADN. Por ejemplo, se puede usar la PCR cuantitativa específica de metilación (MS-QPCR) o medir la metilación del ADN. (Véase: Eads C.A., MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2000 Apr 15; 28(8): E32; 2. Darst R.P., Bisulfite sequencing of DNA. Curr Protoc Mol Biol. 2010 Jul; Chapter 7:Unit 7.9.1-17, y Cottrell S.E., *et al.*, A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation specific blockers, Nucleic Acids Res. 2004; 32(1): e10.).

Los ejemplos se centran en un método preferido, pero un experto en la materia entendería que serían adecuados otros métodos. Simplemente se necesita evaluar el estado de metilación de las islas CpG dentro de las regiones diana. Los ejemplos 1 y 2 a continuación divulgan cambios de metilación en regiones ricas en CG específicas, y se prevé observar cambios similares en islas CpG adyacentes que no necesariamente se miden en los Ejemplos 1 y 2. Cualquier cambio

en la metilación de la isla CpG en uno o varios dinucleótidos CG dentro de esta isla, es considerado un marcador positivo para el defecto de campo del cáncer de próstata. Es posible que se desee comenzar con las regiones ampliadas descritas en el Ejemplo 3 a continuación.

5 Preferentemente, un cebador dentro de cada conjunto de cebadores se biotinila y los productos de PCR biotinilados se purifican, o capturan, con perlas de estreptavidina sefarosa. En una realización preferida, se utilizarían los cebadores detallados en las Figs. 12-25.

10 Preferentemente, la metilación se cuantifica con el sistema de pirosecuenciación PyroMark™MD (Qiagen) usando reactivos PyroPyroMark® Gold Q96 (Qiagen, N.º de cat 972804) (QIAGEN PyroMark Gold Q96 Reagents Handbook 08/2009, (36-38)). Otros enfoques para la cuantificación de la metilación incluyen, por ejemplo, QPCR específica de metilación o secuenciación cuantitativa de metilación con bisulfito.

15 Una ventaja de la presente invención es que los marcadores del cáncer de próstata se pueden detectar de forma no invasiva en los fluidos corporales, tales como la orina o el semen. El método de detección de fluidos corporales que se utiliza actualmente se basa en los niveles de PSA en suero y tiene una especificidad muy baja. Las biopsias son más específicas, pero pueden producir complicaciones clínicas importantes, incluyendo infecciones, hemorragia y retención urinaria. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, el estado de metilación de las regiones diana se determina a partir de una muestra de orina.

20 En otra realización, la presente invención es un método para identificar biomarcadores cuyos cambios de metilación del ADN se asocian al PCa de alto grado, usando el protocolo descrito anteriormente y en los Ejemplos siguientes. Por "alto grado", se entiende PCa con una puntuación de Gleason de 8-10 y un volumen tumoral del 25-80 %. Por ejemplo, un hallazgo de ± 50 % del factor de cambio en los valores de metilación de al menos un locus génico seleccionado de WNT2 y NCR2 indicaría la presencia de un efecto de campo de PCa de alto grado. Pueden identificarse biomarcadores adicionales para PCa de alto grado usando el protocolo descrito anteriormente y en los Ejemplos siguientes y también pueden incluirse en kits.

30 Por lo general, la orina del paciente se puede obtener, centrifugar y utilizar el sedimento celular para la extracción de ADN utilizando los protocolos publicados (Yoshida *et al.*, International Journal of Cancer, n/a-n/a; Mehrotra *et al.*, (2008) Prostate 68, 152-160). Se podría desear utilizar una prueba de detección en orina de la metilación del ADN para el PCa divulgado a continuación en el Ejemplo 4. A continuación, se analizarían las muestras de ADN genómico como se ha descrito anteriormente para muestras de tejido sólido. La presencia de cambios de metilación que se correlacionan con el diagnóstico del efecto de campo se analizaría de la misma manera como se ha descrito anteriormente.

40 Por lo general, cuando se usan cebadores de pirosecuenciación (tales como los cebadores preferidos en la Fig. 12), cambios de metilación significativos de al menos una de las ocho regiones diana indicarían un defecto de campo del cáncer de próstata. En diversas realizaciones, el cambio significativo se indica mediante un valor de al menos ± 50 % de los porcentajes de pirosecuenciación mostrados en la Tabla 1 o ± 50 % del cambio en el factor de cambio en la Tabla 1 o un cambio de $p < 0,05$ en patrones de metilación de islas CpG específicas.

45 En una segunda realización, cuando se usan cebadores de pirosecuenciación (tales como los cebadores preferidos en las Figs. 12 o 25), cambios de metilación significativos de al menos una de las dos regiones diana de acuerdo con las SEQ ID NO: 18 y 39 indicarían un defecto de campo del cáncer de próstata. En diversas realizaciones, el cambio significativo se indica mediante un valor de al menos ± 50 % de los porcentajes de pirosecuenciación mostrados en la Tabla 1 o ± 50 % del cambio en el factor de cambio en la Tabla 1 o un cambio de $p < 0,05$ en patrones de metilación de islas CpG específicas.

50 En una tercera realización, cuando se utilizan cebadores de pirosecuenciación (tales como los cebadores preferidos en la Fig. 12 y/o Fig. 25), cambios de metilación significativos de al menos una de las ocho regiones diana de acuerdo con las SEQ ID NO: 1-6, 18 y 39 indicarían un defecto de campo de cáncer de próstata. En diversas realizaciones, el cambio significativo se indica mediante un valor de al menos ± 50 % de los porcentajes de pirosecuenciación mostrados en la Tabla 1 o ± 50 % del cambio en el factor de cambio en la Tabla 1 o un cambio de $p < 0,05$ en patrones de metilación de islas CpG específicas.

60 Otra ventaja de la presente invención es que los cambios en los niveles de metilación de los marcadores divulgados para el cáncer de próstata pueden detectarse en tejido de próstata histológicamente normal o fluido corporal de hombres sin antecedentes de cáncer de próstata.

En otra realización más de la invención se reconoce que los marcadores también pueden usarse para controlar los cambios en la próstata como resultado de futuros tratamientos farmacológicos que modifican la metilación o para evaluar la gravedad clínica de un paciente con cáncer o en riesgo.

65 También se hace referencia a la evaluación del uso del estado de metilación de al menos una de las ocho regiones diana para el diagnóstico de otros cánceres, tales como el cáncer de mama o de colon.

En otra realización, la presente invención es un método para amplificar al menos una de las secuencias de ADN diana para diagnosticar el cáncer de próstata en un sujeto que comprende las etapas de

- 5 (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un ADN diana bicatenario modificado con bisulfito de un sujeto y (i) al menos un par de cebadores seleccionados del grupo diseñado para amplificar al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39, en donde el par de cebadores comprende un primer y un segundo cebador que son complementarios con la secuencia de ADN diana, (ii) una polimerasa y (iii) una pluralidad de nucleótidos libres que comprenden adenina, timina, citosina y guanina;
- 10 (b) calentar la mezcla de reacción a una primera temperatura predeterminada durante un primer tiempo predeterminado para separar las hebras del ADN diana entre sí;
- (c) enfriar la mezcla de reacción a una segunda temperatura predeterminada durante un segundo tiempo predeterminado en condiciones para permitir que el primer y segundo cebadores se hibriden con sus secuencias complementarias en el ADN diana y permitir que la polimerasa extienda los cebadores; y
- 15 (d) repetir las etapas (b) y (c) al menos 10 veces, en donde el aumento de metilación, respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata, indica la presencia de cáncer de próstata o un defecto de campo del cáncer de próstata.

20 En una realización, los cebadores están metilados. En otra realización, los cebadores no están metilados. En una realización, se usaría un par de cebadores diseñados para amplificar una diana. En otra realización, se usarían pares de cebadores diseñados para amplificar 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 regiones diana.

Kits

25 En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un kit para el diagnóstico del cáncer de próstata o la detección de defectos de campo del cáncer de próstata, comprendiendo el kit al menos un conjunto de cebadores, en donde el conjunto de cebadores consiste en un cebador directo y un cebador inverso diseñado para amplificar una región diana seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 39 y los componentes esenciales para la amplificación del ADN. Normalmente, el kit comprende al menos un conjunto de cebadores, en

30 donde los cebadores comprenden preferiblemente cebadores directos e inversos diseñados para amplificar una región diana seleccionada del grupo que consiste en las dianas CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, NCR2, WNT2, EXT1 y SPAG4 (SEQ ID NO: 1-6, 18 y 39), o seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61-77 y 94-97 y otros componentes esenciales para la amplificación del ADN, preferentemente, polimerasa, dNTP, tampón y una sal de magnesio que puede liberar Mg^{2+} . Normalmente, se puede usar $MgCl_2$ o $MgSO_4$. En otras realizaciones, el kit usado

35 comprende cebadores diseñados para amplificar dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho dianas.

En una realización, los cebadores comprenden preferiblemente un cebador directo seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52, 55 y 58, y un cebador inverso seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56 y 59, y otros componentes esenciales para la amplificación del ADN, preferentemente,

40 polimerasa, dNTP, tampón y una sal de magnesio que puede liberar Mg^{2+} . Normalmente, se puede usar $MgCl_2$ o $MgSO_4$.

En una segunda realización, el kit anteriormente mencionado utilizado comprende un conjunto alternativo de cebadores, en donde los cebadores comprenden preferiblemente un cebador directo seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 88 y 91, y un cebador inverso seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 89

45 y 92.

En una tercera realización, el uso mencionado anteriormente de un kit que comprende un conjunto combinado de cebadores, en donde los cebadores comprenden preferentemente un cebador directo seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52, 55, 58, 88 y 91, y un cebador inverso seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56, 59, 89 y 92 en donde al menos un cebador directo se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 88 y 91, y un cebador inverso se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 89

50 y 92.

En una realización preferida, el kit utilizado además comprende sondas específicas de metilación y desmetilación marcadas con fluoróforo FAM o Hex y es adecuado para un ensayo de tubo cerrado para MS-QPCR. En otra realización preferida, el kit utilizado además comprende cebadores de secuenciación y es adecuado para ensayos basados en pirosecuenciación con bisulfito. Preferentemente, los cebadores de secuenciación se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 y 60. Incluso más preferentemente, el kit utilizado además

60 comprende perlas de estreptavidina sefarosa, mezcla de enzimas, mezcla de sustrato y dinucleótidos.

En una segunda realización preferida, el kit usado además comprende cebadores de secuenciación seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 90 y 93.

65 En una tercera realización preferida, el kit usado además comprende cebadores de secuenciación seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57, 60, 90 y 93.

En otra realización, el kit utilizado comprende componentes para un ensayo Invader® para detectar cambios en la metilación. El ensayo Invader® implica el uso de la química Invader® (Hologic Inc.) que está compuesta por dos reacciones isotérmicas simultáneas. Una reacción primaria detecta de forma específica y precisa los cambios de un solo par de bases midiendo la metilación. Se utiliza una segunda reacción para la amplificación de la señal y la lectura de resultados.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

El cáncer de próstata (PCa) se presenta normalmente como una enfermedad multifocal lo que sugiere la posibilidad de defectos moleculares dentro del tejido morfológicamente normal. En el Ejemplo 1, los inventores compararon tejidos de próstata no asociados a tumor (NTA) con tejidos asociados a tumor (TA) histológicamente indistinguibles y detectaron un perfil distinto de alteraciones de metilación del ADN (0,2 %) utilizando matrices de ADN de todo el genoma. La hipometilación (87 %) se produjo más frecuentemente que la hipermetilación (13 %). El análisis de los tejidos TA adyacentes y distantes de los focos tumorales reveló una persistencia de este defecto de metilación. La evaluación y validación adicionales de seis loci distinguieron a los pacientes TA de los NTA. La evaluación y validación adicionales de dos loci adicionales distinguieron a los pacientes TA de los NTA. Los inventores descubrieron un subconjunto de marcadores que estaban asociados únicamente con la presencia de enfermedad de alto grado. Estos hallazgos demuestran que se produce un defecto de metilación generalizado en los tejidos de próstata periféricos de los hombres con PCa que puede utilizarse para identificar la presencia de la enfermedad.

25 Introducción

'Cancerización de campo', 'efecto de campo' o 'defecto de campo' fueron expresiones que se utilizaron por primera vez en los tumores de cabeza y cuello para describir una mayor frecuencia de desarrollo de cáncer que se encuentra fuera de los límites visibles del tumor primario¹. Estas células genéticamente o epigenéticamente comprometidas en tejidos de apariencia histológicamente normal tienen el potencial de dar lugar no solo a tumores multifocales, sino a cánceres adicionales después de la terapia. Aunque descrito en el cáncer colorrectal, de vejiga y esófago (Jothy *et al.* (1996) Field effect of human colon carcinoma on normal mucosa: relevance of carcinoembryonic antigen expression. *Tumour Biol* 17, 7; Takahashi, T., *et al.* (1998) Clonal and Chronological Genetic Analysis of Multifocal Cancers of the Bladder and Upper Urinary Tract, *Cancer Research* 58, 5835-5841; Miyazato, *et al.* (1999) Microsatellite instability in double cancers of the esophagus and head and neck, *Diseases of the Esophagus* 12, 132-136; Ushijima, T. (2007) Epigenetic Field for Cancerization, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 40, N.º 2, March 2007, pp. 142-150 40, 9), en el cáncer de próstata (PCa) no se ha definido claramente un efecto de campo. Las características que sugieren la presencia de un efecto de campo en el PCa incluyen la multifocalidad regional en el momento del diagnóstico, así como la mayor incidencia con el envejecimiento (Eastham, J.A., *et al.* (2007) Prognostic Significance of Location of Positive Margins in Radical Prostatectomy Specimens, *Urology* 70, 965-969). Definir un defecto del campo epigenético asociado al PCa tendría importantes ramificaciones clínicas con respecto a la recurrencia y el interés reciente en las terapias ablativas focales (Mouraviev, V., *et al.* Prostate cancer laterality as a rationale of focal ablative therapy for the treatment of clinically localized prostate cancer, *Cancer* 110, 906-910 (2007)).

El desarrollo y la progresión del PCa vienen determinados por la interacción de cambios genéticos y epigenéticos (Schulz, W.A. y Hoffmann, M.J. Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer, *Semin Cancer Biol* 19, 172-180 (2009)). Un proceso epigenético importante es la metilación reversible de la citosina en los dinucleótidos CpG, una secuencia subrepresentada en el genoma excepto en las islas CpG (Brid, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev* 16, 16 (2002)). La metilación del ADN regula la expresión génica y participa en la organización nuclear de organismos superiores. Las alteraciones en la metilación del ADN son un sello distintivo del cáncer. Normalmente, los tejidos adyacentes histológicamente normales son el estándar frente al cual se identifican muchas alteraciones genómicas y epigenéticas en cánceres. A la luz de la relevancia de un posible defecto de campo para los estudios clínicos y moleculares, se sabe poco sobre su distribución y extensión en el PCa. En parte, esto ha reflejado una limitación de las técnicas para evaluar la metilación del ADN en secuencias específicas en todo el genoma, así como una falta de muestras sin evidencia histológica de PCa.

En el ejemplo a continuación, los inventores utilizaron un enfoque de inmunocaptura para enriquecer el ADN metilado y combinarlo con micromatrices de ADN. Durante una evaluación de los tejidos de control para los perfiles de metilación de todo el genoma en el cáncer, los inventores descubrieron cambios de metilación marcados en tejidos de próstata de apariencia histológicamente normal asociados a tumor (TA) que se extendían a través de tejidos de próstata susceptibles.

65 Resultados

Los distintos patrones de metilación del ADN definen los tejidos de próstata asociados a tumor (TA) y no asociados a tumor (NTA). Como estudio inicial de los controles adecuados para los análisis de cáncer, los inventores llevaron a cabo un análisis

de los cambios de metilación en todo el genoma en tejidos de próstata histológicamente normales de hombres con cáncer y los compararon con los de hombres sin cáncer. Utilizamos 385.000 matrices de locus basadas en la secuencia de la Enciclopedia de Elementos de ADN (ENCODE) 18 que divide una serie de regiones biológicamente significativas en el genoma humano e incluye todos los cromosomas excepto los cromosomas 3 y 17. El ADN se preparó inicialmente a partir de cuatro muestras de próstata TA y cinco NTA, se digirió con enzimas de restricción para detectar el ADN metilado por inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo contra 5-metilcitosina como se ha descrito (User's, N.S.P.I.i.N. & Guide: DNA Methylation Analysis). Para estos estudios se utilizaron tejidos de próstata de la zona periférica ya que el PCa demuestra una predilección por esta región. Evaluamos cuidadosamente todas las muestras de NTA para confirmar la ausencia de PCa dentro de la próstata mediante tinción de HyE en tres dimensiones y la expresión de α -metilacil-Coa racemasa (AMACR) (Fig. 13). Asimismo, la proporción de epitelio a estroma fue similar entre los grupos de tejidos. Después del marcaje, la hibridación diferencial y el escaneo, utilizamos un punto de corte de la puntuación de la sonda del $-\log_{10} [p]$ del intervalo 2 - 10 para generar aproximadamente 1.000 sondas para cada cromosoma y un total de 18.101 sondas. A continuación comparamos las relaciones \log_2 en sondas individuales para tejidos TA y NTA para evaluar la metilación.

Se observaron diferencias notables en la metilación cuando se comparaban TA y NTA. Con $P < 0,05$, se identificaron 615 loci diferencialmente metilados en tejidos TA, con 537 (87 %) hipometilados y 78 (13 %) hipermetilados (Fig. 9A). El cromosoma 15 demostró el mayor número de loci diferencialmente metilados (1,13 %) en los tejidos TA, seguido del cromosoma 20 (0,9 %), 1 (0,57 %) y 9 (0,51 %). A través de las regiones genómicas, las áreas específicas demostraron hiper o hipometilación (Fig. 9B y Fig. 9C). Los factores de cambio en la metilación de las muestras de próstata TA frente a NTA variaron de 0,02-7,59 (datos no mostrados).

Usando parámetros estadísticos más estrictos ($P < 0,01$), los inventores identificaron 87 loci que mostraban una metilación significativamente diferencial en próstatas TA. Estos loci estaban sujetos a agrupaciones jerárquicas no supervisadas utilizando el software TMEV para generar un mapa de calor. Esta visión global del perfil de metilación distingue claramente los tejidos de próstata TA de los NTA (Fig. 9D). Entre los 87 loci, 69 estaban hipometilados y 18 hipermetilados en tejidos TA (Tabla 2). De estos, 49 sondas estaban asociadas a 38 genes y 38 sondas no estaban relacionadas con genes. Los números de registro para estos genes se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 2 - Localización de sondas diferencialmente metiladas

Localización cromosómica	N.º total de sondas	Asociada a tumor frente a normal	
		Hipometilación	Hipermetilación
1	5	P14KB (2), NR (3)	
2	3	ACCN4 (1), TRPM8 (1), NR (1)	
4	1		NR (1)
5	5	SEPT8 (2), FGF1 (1), NR (2)	
6	6	NCR2 (3), TFEB (1), NR (2)	
7	7	WINT2 (1), GRM8 (1), NR (1)	EVX1 (1), GRM8 (1)
			CAV1 (1), NR (1)
8	1	EXT1 (1)	
9	2	IER5L (1), NR (1)	
11	7	NRXN2 (2), NR (5)	
13	6	F7 (1), NR (2)	MCF2L (2), NR (1)
14	3	NR (3)	
15	11	TP53BP1 (1), MAP1A (2), FRMD5 (3), NR (1)	FRMD5 (2), SERF2 (1), NR (1)
16	3	RAB11FIP3 (1), NR (1)	DECR2 (1)
18	5	SERPIN2 (1), NR (3)	SERPIN8 (1)
19	3	LILRA5 (1), LENG12 (1)	CNOT3 (1)

(continuación)

		Asociada a tumor frente a normal	
Localización cromosómica	N.º total de sondas	Hipometilación	Hipermetilación
20	8	GDF5 (1), CEP250 (2), ERGIC3 (1), FER1L4 (1), NR (1)	FAM83C (1), SPAG4 (1)
21	7	NR (6)	NR (1)
22	4	DEPDC5 (1), SYN3 (1), PISD (1), NR (1)	
Total	87	69	18

Se generaron sondas metiladas significativas entre la próstata normal y asociada al tumor a partir de la matriz de metilación utilizando un punto de corte de la puntuación de la sonda de $-\log_{10} [p]$ que variaba de 2-10 para generar 18.101 sondas en total, y a continuación se compararon una relación de \log_2 para estas sondas entre TA y NTA, prueba t $P < 0,01$. Se hipometilaron sesenta y nueve sondas, 36 sondas relacionadas con 27 regiones sin genes. NR representa no relacionado con ningún gen.

Tabla 3

Símbolo del gen	Nombre del gen	N.º de Registro
P14KCB	Fosfatidilinosol-4-cinasa, catalítica, beta	NM_002651 (SEQ ID NO:7)
ACCN4	Canal catiónico sensible a amilorida, hipofisario	NM_182847 (SEQ ID NO:8)
TRPM8	Canal catiónico con potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 8	NM_024080 (SEQ ID NO:9)
SEPT8	Septina	AF440762 (SEQ ID NO:10)
FGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (ácido)	NM_000800 (SEQ ID NO:11)
NCR2	Receptor desencadenante de citotoxicidad natural 2	AJ010100 (SEQ ID NO:12)
TFEB	Factor de transcripción EB	NM_007162 (SEQ ID NO:13)
EVX1	Homeobox even-skipped 1	NM_001989 (SEQ ID NO:14)
CAV1	Caveolina 1	NG_012051.1 (SEQ ID NO:15)
WNT2	Miembro de la familia del sitio de integración MMTV tipo Wingless 2	BC078170 (SEQ ID NO:16)
GRM8	Receptor de glutamato, metaboprótico 8	NM_000845 (SEQ ID NO:17)
EXT1	Exostosis (múltiple) 1	BC001174 (SEQ ID NO:18)
IER5L	Similar a la respuesta temprana inmediata 5	NM_203434 (SEQ ID NO:19)
NRXN2	Neurexina 2	NM_138734 (SEQ ID NO:20)

ES 2 820 732 T3

(continuación)

Símbolo del gen	Nombre del gen	N. ° de Registro
MCF2L	Tipo secuencia transformante derivada de línea celular	NM_024979 (SEQ ID NO:21)
F7	Factor de coagulación VII	NM_019616 (SEQ ID NO:22)
TP53BP1	Proteína de unión a la proteína tumoral p53 1	NM_005657 (SEQ ID NO:23)
MAP1A	Proteína asociada a microtúbulos 1A	NM_002373 (SEQ ID NO:24)
SERF2	Factor rico en EDRK pequeño 2	BC015491 (SEQ ID NO:25)
FRMD5	Proteína que contiene el dominio FERM 5	NM_032892 (SEQ ID NO:26)
DECR2	2,4-dienoil CoA reductasa 2, peroxisomal	AK128012 (SEQ ID NO:27)
RAB11FIP3	Proteína de interacción con la familia RAB11 3 (clase III)	NM_014700 (SEQ ID NO:28)
SERPINB2	Inhibidor de serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 2	NM_002575 (SEQ ID NO:29)
SERPINB8	Inhibidor de serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 8	BC034528 (SEQ ID NO:30)
CNOT3	complejo de transcripción CCR4-NOT, subunidad 3	BC016474 (SEQ ID NO:31)
LILRA5	Receptor leucocitario tipo inmunoglobulina, subfamilia A (con dominio TM), miembro 5	NM_181985 (SEQ ID NO:32)
LENG12	Complejo de receptores leucocitarios (LRC) miembro 12	NM_033206 (SEQ ID NO:33)
FAM83C	Familia con similitud de secuencia 83, miembro C	NM_178468 (SEQ ID NO:34)
GDF5	Factor de diferenciación del crecimiento 5	NM_000557 (SEQ ID NO:35)
CEP250	Proteína centrosómica	AF022655 (SEQ ID NO:36)
ERGIC3	ERGIC y golgi 3	NM_015966 (SEQ ID NO:37)
FER1 L4	Tipo Fer-1 4	NR_024377.1 (SEQ ID NO:38)
SPAG4	Antígeno asociado a espermatozoides	NM_003116 (SEQ ID NO:39)
PISD	Fosfatidilserina descarboxilasa	CR456540 (SEQ ID NO:40)
DEPDC5	Proteína que contiene el dominio DEP 5	AJ698951 (SEQ ID NO:41)
SYN3	Sinapsina III	NM_003490 (SEQ ID NO:42)

Se eligió un subconjunto de los 20 genes para una evaluación adicional, basada en la localización genómica, la posible función biológica, el grado de metilación y el éxito del cebador en una validación separada utilizando un conjunto de 24 muestras de próstata TA y NTA. Se empleó pirosecuenciación cuantitativa para permitir una evaluación más precisa del grado de metilación del ADN^{11,12}. Se realizaron controles internos para la adecuación de la conversión de bisulfito. Seis loci, que estaban asociados a los genes CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, NCR2 y WNT2, mostraron cambios significativos en la metilación ($P < 0,05$). Los tres loci asociados a CAV1, EVX y MCF2L estaban hipermetilados y tres loci asociados a FGF1, NCR2 y WNT2 estaban hipometilados. La localización de las sondas y CG evaluados por pirosecuenciación cuantitativa se muestran en las Figs. 10 y 12. Los seis loci en la pirosecuenciación están cerca o se superponen a las regiones de la matriz de metilación, pero las secuencias son diferentes. Las secuencias enumeradas en las Fig. 1-6 han cubierto tanto la región de la matriz (Fig. 7) como las regiones de pirosecuenciación. Estos datos demuestran que los tejidos TA tienen un perfil de metilación distinto al de los hombres sin cáncer (NTA) y que estos cambios alteran regiones específicas del genoma.

15 Identificación de un defecto de campo de metilación generalizado en la próstata periférica.

La alteración preferencial en tejidos adyacentes a focos tumorales de PCa, es decir, defecto de campo, sugiere una respuesta peritumoral. Para evaluar si los tejidos adyacentes a los focos tumorales de PCa se alteran preferentemente, se evaluó la extensión del defecto de campo en 26 tejidos histológicamente normales adicionales observando el estado de metilación de estos seis marcadores metilados diferencialmente. Los inventores realizaron microdisecciones en sitios adyacentes (TAA, 2 mm) y distantes (TAD, >10 mm) a tejidos normales respecto del foco del tumor principal para cada una de las muestras (Fig. 8). Se aplicaron tinción histológica de HyE tridimensional y expresión de AMACR determinada por qPCR para descartar cualquier contaminación por células tumorales o la presencia de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN), un posible precursor de cáncer (Ayala, A.G. & Ro, J.Y. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Recent Advances, Archives of Pathology & Laboratory Medicine 131,1257-1266 (2007)). Se encontró un aumento de la expresión de AMACR en 2 tejidos NTA y 3 TA que posteriormente se excluyeron del análisis adicional (Fig. 13).

30 Cuando se compara con los tejidos NTA, la hipermetilación de las sondas asociadas a CAV1, EVX1, MCF2L y la hipometilación de FGF1 demostraron cambios significativos tanto en tejidos TAA, como TAD (Fig. 11A-D y Tabla 4). Cabe destacar que, no hubo diferencia en el grado de metilación visto a diferentes distancias del tumor cuando se compararon los conjuntos de tejidos TAA y TAD. También se observaron cambios de metilación significativos en muestras de tumores en comparación con los tejidos NTA para CAV1, EVX1, MCF2L, NCR2 y WNT2, lo que revela una persistencia de estos cambios en el cáncer asociado. Estos datos indican que el defecto del campo epigenético en la próstata está muy extendido y no se localiza únicamente en el entorno peritumoral inmediato.

Tabla 4 - Porcentaje de metilación de todas la CpG analizadas para cada gen

	CAV1			EVX1			MCF2L			FGF1			NCR2 ¹			WNT2 ¹		
	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD
CG1	4,5	8,8*	9,6*	30,5	38,8*	32,6	80,2	85,2*	85,3*	80,4	70,7*	70,8*	54,3	50,8	52,1	95,4	89,8*	89,8*
CG2	14,6	22,4*	21,3*	28,2	36,9*	29,9	77,0	85,3*	85,1	71,7	60,7*	59,8*	30,5	30,6	30,9	94,9	91,0*	91,5*
CG3	17,8	27,7*	25,8*	22,7	30,8*	27,8*	96,3	97,4	96,5	71,2	60,2*	60,9*	74,7	68,6*	70,7	100	99,5	100
CG4	13,8	24,3*	23,0*	50,4	55,4	48,3	84,8	82,1	80,7	81,1	72,9*	71,1*				99,8	99,5	100
CG5	15,3	25,0*	21,9*	46,5	51,7	47,2	79,9	86,1	87,5									
CG6	14,9	27,2*	26,4*	36,7	44,8*	40,6*	75,3	81,0	82,1									
CG7	18,9	28,0*	26,0				89,6	94,3	93,6									
CG8	8,25	15,4*	14,7*				57,8	57,2	55,8									
CG9	15,8	22,7	19,5				39,8	31,4	38,1									
CG10	17,9	26,7*	28,6*															

*P<0,05

¹ Solo tumor de alto grado

Los loci de metilación específica están asociados a un defecto de campo de PCa de alto grado.

Un importante aspecto en el PCa es la identificación temprana y tratamiento del PCa de alto grado letal. Los inventores analizaron un subconjunto de tejidos TA que estaban asociados a cáncer de grado intermedio o alto usando pirosecuenciación. Cuando se compara con los tejidos NTA, un análisis de NCR2 y WNT2 demostró hipermetilación e hipometilación significativas, respectivamente, en los tejidos TA asociados a muestras de alto grado (Fig. 11E-F). Esto no se observó en los tejidos TA asociados al PCa de grado intermedio.

Análisis

La investigación ha teorizado que un defecto de campo puede ser la base del desarrollo de cánceres multifocales (Slaughter D.P., Southwick H.W., Smejkal, W.; Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; Clinical implications of multicentric origin, *Cancer* 6, 6 (1953)). Los esfuerzos iniciales para caracterizar este proceso se centraron en las alteraciones genéticas (Braakhuis, B.J.M., Tabor, M.P., Kummer, J.A., Leemans, C.R. & Brakenhoff, R.H., A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization, *Cancer Research* 63, 1727-1730 (2003); García, S.B., Park, H.S., Novelli, M. & Wright, N.A. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets, *The Journal of Pathology* 187, 61-81 (1999)), but more recently epigenetic changes have been proposed as a etiology (Hu, M., *et al.* Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers, *Nat Genet* 37, 899-905 (2005); Wolff, E.M., *et al.*, Unique DNA Methylation Patterns Distinguish Noninvasive and Invasive Urothelial Cancers and Establish an Epigenetic Field Defect in Premalignant Tissue, *Cancer Research* 70, 8169-8178). En el presente estudio, demostramos de manera concluyente, utilizando matrices de metilación no sesgadas, que se producen cambios significativos en la metilación del ADN en loci específicos dentro de tejidos histológicamente normales asociados a PCa. Asimismo, estos cambios son generalizados y no se limitan al entorno peritumoral inmediato. Estos cambios también permiten una clara distinción entre tejido de próstata asociado a tumor y no asociado a tumor.

Hasta ahora, el perfil epigenético de tejidos histológicamente normales asociados a tumores no se ha realizado en tumores sólidos. Nuestra evaluación de todo el genoma de loci específicos demuestra que la hipometilación se observó con más frecuencia que la hipermetilación en los tejidos de la próstata TA. Estos cambios ocurrieron en el 0,2 % de los 385.000 loci estudiados. La hipometilación del ADN puede ocurrir al principio de la carcinogénesis de tumores sólidos según su identificación en lesiones precancerosas, incluida la neoplasia intraepitelial prostática (Feinberg, A.P., Ohlsson, R. & Henikoff, S., The epigenetic progenitor origin of human cancer, *Nat Rev Genet* 7, 21-33 (2006); Suzuki, K., *et al.* Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage, *Cancer Cell* 9, 199-207 (2006)). Esto puede conducir a la inestabilidad de la cromatina y contribuir al fenotipo neoplásico. Nuestros datos amplían estos hallazgos y sugieren que las alteraciones epigenéticas pueden preceder incluso a los cambios histológicos identificados con estas lesiones precursoras. Estos cambios de metilación del ADN pueden reflejar la dieta y otras exposiciones ambientales (Richardson, B.C., Role of DNA Methylation in the Regulation of Cell Function: Autoimmunity, Aging and Cancer, *The Journal of Nutrition* 132, 2401S-2405S (2002); Mathers JC, S.G., Relton CL, Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors, *Adv Genet.* 71, 37 (2010)) y representan una vía potencial de prevención.

Las alteraciones epigenéticas limitadas únicamente al entorno peritumoral inmediato sugieren una respuesta del tejido circundante al cáncer primario. Los estudios epigenéticos de un solo gen han identificado estos cambios en un subconjunto de muestras adyacentes al PCa primario (Mehrotra, J., *et al.*, Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer, *Prostate* 68, 152-160 (2008); Aitchison, A., Warren, A., Neal, D. & Rabbitts, P. RASSF1A promoter methylation is frequently detected in both pre-malignant and non-malignant microdissected prostatic epithelial tissues, *Prostate* 67, 638-644 (2007); Hanson, J.A., *et al.*, Gene Promoter Methylation in Prostate Tumor-Associated Stromal Cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 255-261 (2006); Henrique, R., *et al.*, Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis, *Mol Cancer Res* 4, 1-8 (2006)). Por el contrario, en el presente estudio de perfil epigenómico, descubrimos que estas alteraciones se extendían constantemente a regiones distantes de los focos tumorales. En el cáncer de vejiga, una enfermedad que también se caracteriza por multifocalidad y recurrencia, no hay dependencia de la distancia al tumor primario (Wolff, E.M., *et al.*, Unique DNA Methylation Patterns Distinguish Noninvasive and Invasive Urothelial Cancers and Establish an Epigenetic Field Defect in Premalignant Tissue, *Cancer Research* 70, 8169-8178). A similar widespread field defect was demonstrated during evaluation of Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) loss of imprinting in peripheral prostate tissues (Bhusari, S., Yang, B., Kueck, J., Huang, W. & Jarrard, D.F., Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer, *The Prostate*, 2011 Mar 22). Recientemente ha habido interés en el tratamiento del PCa mediante terapia ablativa focal (Mouraviev, V., *et al.*, Prostate cancer laterality as a rationale of focal ablative therapy for the treatment of clinically localized prostate cancer, *Cancer* 110, 906-910 (2007)). Los hallazgos actuales sugieren un campo de susceptibilidad que podría utilizarse para ayudar a seleccionar pacientes que serían malos candidatos para este enfoque.

En el estudio actual, nos centramos en un análisis de alta resolución de todo el genoma del estado de metilación en lugar de en regiones promotoras de genes específicas. El proyecto del genoma humano ENCODE18 incluye áreas enriquecidas con genes que se cree que son biológicamente significativas, un hecho que potencialmente puede generar un sesgo en nuestros análisis. La mayoría de las sondas entraban dentro de islas CpG (Saxonov, S., Berg,

P. & Brutlag, D. L., Un análisis de todo el genoma de dinucleótidos CpG en el genoma humano distingue dos clases distintas de promotores, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1412-1417 (2006); Fatemi, M., *et al.*, Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level, *Nucleic Acids Research* 33, e176), pero ninguno estaba incluida en regiones promotoras de genes definidas. Hypermethylation within promoters has been linked to decreased gene expression (JY, P., Promoter hypermethylation in prostate cancer, *Cancer Control* 17, 11; Cooper, C.S. & Foster, C.S., Concepts of epigenetics in prostate cancer development, *Br J Cancer* 100, 240-245 (2008)), pero la función de las islas CpG fuera de estas regiones sigue siendo incierta. Dado el potencial de silenciamiento epigenético de largo alcance, estos cambios pueden presagiar alteraciones en la expresión génica que afectan a regiones distantes (Clark, S.J., Action at a distance: Epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis, *Human Molecular Genetics* 16, R88-R95 (2007)), o, como alternativa, reflejan una estructura nuclear alterada.

Los hallazgos actuales tienen varias implicaciones adicionales. La detección basada en PSA ha sido ampliamente criticada por no identificar específicamente el PCa letal (Adami, H.-O., The prostate cancer pseudo-epidemic, *Acta Oncologica* 49, 298-304). Este estudio plantea la posibilidad de utilizar una prueba en tejido, o una prueba potencialmente en orina, para la detección de enfermedades (y específicamente enfermedades de alto grado) basadas en anomalías encontradas no solo en el tumor sino en los tejidos TA asociados. Se esperaría que esto demostrara una mayor sensibilidad al aumentar el porcentaje de células afectadas que se pueden detectar. Además, la evaluación de las alteraciones que ocurren en el PCa ha comparado normalmente el tumor con los tejidos "normales" dentro de la misma glándula prostática. El estudio actual indica que el tejido histológicamente normal de los hombres que tienen PCa ya contiene anomalías de metilación, lo que puede llevar a una subestimación de los cambios epigenéticos que existen en los cánceres asociados.

Ejemplo 2

Material y métodos

Muestras de tejido

Las muestras denominadas no asociadas a tumores (NTA, media 63, intervalo de edad 55-81 años) se obtuvieron de donación de órganos o cistoprostatectomía. La presencia de cualquier PCa asociado se descartó mediante una evaluación histológica extensa. Se obtuvieron tejidos de próstata asociados a tumor (TA, media 61, intervalo de edad 57-64 años) de pacientes que se sometieron a prostatectomía radical por PCa (Tabla 5). Este estudio fue aprobado por las juntas de revisión institucional de la Universidad de Pittsburgh y la Universidad de Wisconsin-Madison. También se evaluó un grupo de validación separado de 14 muestras NTA (media 60, intervalo de edad 55-70 años) y 12 TA (media 58, intervalo de edad 53-64 años).

Tabla 5
Características clínicas y patológicas del sujeto

	Matriz de metilación		Pirosecuenciación		
	NTA	TA	NTA	TA	T, TAA, TAD
Número	5	4	14	11	26
Edad (a)	63 (55~ 81)	61 (57~64)	60 (55~ 70)	59 (51~67)	58 (44~69)
Volumen tumoral (%)		6,3		5,1	27,1
Grado Gleason					
Intermedio		4		6	16
Alta					10
Estadio patológico					
T2				3	
T2a				1	1
T2b					2
T2c		3		6	14
T3a		1		1	2
T3b					4
PSA (ng/ml)		7,7		5,9	6,9

NTA: normal no asociado a tumor, TA: asociado a tumor, T: tumor, TAA: adyacente asociado a tumor, TAD: distante asociado a tumor. No se dispone de los estadios de tres pacientes. Intermedio: 3+3, 3+4; Alto: 4+4, 4+5, 5+5.

Para definir la relación de la metilación con los focos tumorales, se generaron cortes histológicos que contenían tanto regiones cancerosas como normales a partir de 26 (media 58, intervalo de edad 44-69 años) muestras de

prostatectomía radical bajo la dirección de un patólogo genitourinario. Se realizó microdissección para obtener tumor (T), tejido normal adyacente (2 mm) a focos tumorales (TAA) y a mayor distancia (10 mm, TAD) como se describió previamente (Fig. 8) (Bhusari, S., Yang, B., Kueck, J., Huang, W. & Jarrard, D.F., Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer, *The Prostate*, 2011 Mar 22). Las características clínicas y patológicas de la población del estudio PCa se presentan en la Tabla 5. De estos pacientes, 16 tenían un cáncer de grado intermedio (puntuación de Gleason entre 6 y 7; volúmenes tumorales 5-70 %) y 10 tenían cáncer de grado alto (puntuación de Gleason 8-10; volúmenes tumorales 25-80 %). Se confirmó que las muestras de próstata no tenían tumor mediante la tinción H&E en tres dimensiones y la expresión de AMACR. Para el análisis de AMACR, el ARN se extrajo usando un RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA) y se transcribió de forma inversa 300 ng de ARN con Omiscript® (Qiagen, CA). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real para AMACR total utilizando secuencias de cebadores como se ha descrito³³.

Micromatrices de metilación de ADN

El ADN genómico se aisló usando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, CA). El ADN utilizado para el análisis de micromatrices se incubó adicionalmente con ARNasaA durante 30 minutos a 37 °C para evitar cualquier contaminación por ARN. Se utilizaron matrices de metilación de ADN Roche NimbleGen ENCODE HG18. Estas matrices contienen 385.000 oligonucleótidos de 50-75 unidades (sondas) que cubren regiones piloto biológicamente significativas del genoma humano con un espaciamiento de 60 pb.

La preparación de la muestra para la micromatriz se realizó siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se digirieron hasta 6 microgramos de ADN genómico de alta calidad con MseI (New England Biolabs, Ipswich, MA) para producir fragmentos de 200-1.000 pb mientras se mantenían intactas las islas CpG, y a continuación se desnaturizó por calor a fragmentos de ADN de una sola hebra. Los fragmentos de ADN metilado se inmunoprecipitaron (IP) durante la noche a 4 °C con 1 µg de anticuerpo contra 5-metil citidina (Abcam, Cambridge, MA) y se incubaron con perlas de agarosa durante dos horas. La mezcla ADN: anticuerpo: perlas se digirió con proteinasa K durante la noche a 55 °C antes de purificarla con fenol-cloroformo. El ADN inmunoprecipitado metilado (MeDIP) y el flujo directo se validaron con cebadores de PCR específicos para regiones metiladas y no metiladas como describen Weber et al (Weber, M., et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37, 853-862 (2005)). El ADN enriquecido se amplificó con el kit WGA2 (Promega, Madison, WI). El marcaje de la IP y el ADN de entrada, la hibridación de micromatrices y el escaneo fueron realizados por NimbleGen (Reykjavik, Islandia) como se describe (Roche. NimbleGen Arrays User's Guide DNA Methylation Arrays Versión 7.2, (2010). Los datos se extrajeron de imágenes escaneadas usando el software de extracción NimbleScan 2.4 (NimbleGen Systems, Inc.). Las muestras se analizaron por duplicado.

Modificación con bisulfito de sodio y pirosecuenciación cuantitativa

La modificación del ADN genómico con bisulfito de sodio se llevó a cabo usando el EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, el ADN modificado con bisulfito se amplificó mediante PCR con el cebador biotinilado directo o inverso como preparación para la pirosecuenciación (Jorg Tost, El Abdalaoui, H., and Ivo Glynne Gut., Serial pyrosequencing for quantitative DNA methylation, *BioTechniques*, 40, 6 (2006)). La PCR y los cebadores de secuencia para la pirosecuenciación se diseñaron utilizando PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen), y se colocaron en los sitios de la sonda o adyacentes que mostraban cambios de metilación significativos ($p < 0,01$). Las regiones analizadas para loci específicos se enumeran en la Fig. 10, mientras que las secuencias de cebadores se enumeran en la Fig. 12. Los productos de PCR biotinilados se capturaron con perlas de estreptavidina sefarosa, se desnaturizaron a una sola hebra y luego se hibridaron con el cebador de secuenciación para el ensayo de pirosecuenciación. Se usó ADN convertido con bisulfito tratado con metilasa Sssl de HPEC (células epiteliales de próstata humana) y células PPC1 como controles positivos, y se sustituyó con agua para el ADN como control negativo. La metilación se cuantificó con el sistema de pirosecuenciación PyroMark™ MD (Qiagen, CA) dentro del intervalo lineal del ensayo. Todas las muestras se analizaron en al menos dos experimentos independientes, ambos por duplicado.

Análisis de los datos

Para el análisis de micromatrices se usó el fichero GFF y la relación a escala \log_2 y un valor P para el análisis de micromatrices. Estos fueron extraídos de imágenes escaneadas proporcionadas por Nimblegen (NimbleGen Systems, Inc.). Los datos de la relación a escala \log_2 es la relación entre la muestra de prueba y las señales de entrada cohibidas con la matriz. El escalado se realizó restándole la media biponderal de todas las características de la matriz. De los datos de la relación a escala \log_2 , se colocó una ventana de longitud fija alrededor de cada sonda consecutiva y se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) unilateral para determinar si las sondas se extrajeron de una distribución de relaciones logarítmicas de intensidad significativamente más positivas que las del resto de la matriz. La puntuación resultante para cada sonda es el $-\log_{10}$ del valor p. Las ID de la sonda se eligieron por primera vez basándose en el $-\log_{10}$ del valor p [p] que varió de 2 a 10 dando como resultado alrededor de 1.000 sondas en cada cromosoma y 18.101 sondas en total. Después del análisis estadístico que compara las relaciones \log_2 entre los grupos NTA y TA, se determinaron diferencias de metilación significativas entre los grupos usando una prueba t ($P < 0,05$). Se agruparon sondas significativamente modificadas mediante Java MultiExperiment View (MEV 4.6.2) con

agrupación jerárquica no supervisada (Saeed AI, B.N., Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, *et al.*, TM4 microarray software suite, *Methods in Enzymology* 411, 60 (2006)).

5 Para la pirosecuenciación cuantitativa, la metilación en cada sitio CpG se expresó como porcentaje. Se utilizó una prueba t para probar las diferencias entre los grupos, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se utilizó la prueba de Spearman para determinar las correlaciones, con una significancia establecida a $P < 0,05$; r representa la medida de la relación entre dos variables y varía de -1 a +1.

10 **Ejemplo 3**

Islas de CpG

15 Basándose en las enseñanzas de los Ejemplos 1 y 2, también se pueden verificar las islas CpG que están ubicadas en las regiones promotoras de los genes que muestran cambios de metilación significativos que se correlacionan con el PCa, preferiblemente la región dentro de aproximadamente 5 kb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción (TSS), porque la metilación de estas islas CpG cambiará las expresiones de los genes y afectará a las funciones de los genes. La investigación principal de los inventores (datos no mostrados) mostró que se podría desear comenzar con los genes CAV1, EVX1, MCF2L y WNT2. Las regiones expandidas de cada uno de los seis genes para la detección preferida de los cambios de metilación se detallan en las Figs. 14-19.

20 FGF1 y NCR2 no tienen islas de CpG dentro de las regiones promotoras. Para FGF1, las regiones expandidas para la detección preferida de los cambios de metilación serían 300 pb en dirección 5' y 1 kb en dirección 3' de la región diana descrita en el Ejemplo 1, así como aproximadamente 5 kb en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción ATG (detallado en la Fig. 17). Para NCR2, las regiones expandidas para la detección preferida de los cambios de metilación serían la región entre los exones dos y tres y las dos islas CpG entre los exones cuatro y cinco (detallado en la Fig. 18).

30 **Ejemplo 4**

Desarrollo de una prueba de detección en orina de metilación del ADN para el PCa letal

35 Como se divulga en el Ejemplo 1, los loci específicos asociados al defecto de campo parecen estar alterados preferentemente en el PCa letal, de alto grado, que es responsable de la mayoría de las muertes por PCa. Establecer el papel que juegan los cambios epigenéticos en el desarrollo del PCa letal puede conducir a un mejor diagnóstico y tratamiento del PCa de alto grado. Prevemos que el defecto de campo epigenético caracterizado por cambios en la metilación del ADN en células de apariencia histológicamente normal dentro de la próstata pueda utilizarse para identificar pacientes con enfermedad letal.

40 Introducción

45 En 2010, el PCa fue el cáncer más frecuentemente diagnosticado en los hombres de Wisconsin (Fu VX, Dobosy JR, Desotelle JA, Almassi N, Ewald JA, Srinivasan R, Berres M, Svaren J, Weindruch R, Jarrard DF., *Aging and cancer-related loss of insulin-like growth factor 2 imprinting in the mouse and human prostate*, *Cancer Res.* 2008 Aug 15;68(16):6797-802), y es la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer (después del cáncer de pulmón), habiendo fallecido más de 600 hombres a causa de la enfermedad (Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E., *Cancer statistics, 2010*. 1. *CA Cancer J.Clin.* 2010 Sep; 60(5):277-300). Más del 70 % de las muertes por PCa ocurren en hombres diagnosticados con enfermedad de grado alto (puntuación de Gleason 8-10) o enfermedad de grado intermedio de alto volumen (puntuación de Gleason 6-7), lo que hace que la detección de estas variantes en un momento anterior sea crítica (Stephenson A.J., Kattan M.W., Eastham J.A., Bianco F.J., Jr., Yossepowitch O., Vickers A.J., Klein E.A., Wood D.P., Scardino P.T., *Prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy for patients treated in the prostate-specific antigen era*, *J. Clin. Oncol.* 2009 Sep 10;27(26): 4300-5). Los cánceres de bajo volumen (<10 %) de grado intermedio y bajo tienen una historia natural mucho más indolente. Varias características sorprendentes del PCa incluyen su multifocalidad y un marcado aumento en la incidencia con el envejecimiento. Estas características sugieren que un "defecto de campo" puede ser un componente importante en la etiología del PCa. Hasta ahora, el diagnóstico de cáncer se ha centrado en el hallazgo de células cancerosas, generalmente mediante biopsia, sin embargo, la presencia de alteraciones asociadas con el tejido de próstata histológicamente normal es todavía un recurso sin explotar tanto en el diagnóstico como en la comprensión de la etiología de esta enfermedad.

60 En los Estados Unidos se realizan anualmente más de 600.000 biopsias de próstata diagnósticas. La tasa de falsos negativos es de hasta el 34 %, y aproximadamente el 20-35 % de los pacientes derivados para repetir la biopsia son finalmente diagnosticados de cáncer (Djavan B, Zlotta A, Remzi M, Ghawidel K, Basharkhah A, Schulman CC, Marberger M. *Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: A prospective study of 1,051 men*, *J.Urol.* 2000 Sep; 163(4): 1144-8). La biopsia de próstata se asocia con riesgo de hemorragia, dificultad para orinar y hospitalización por infección que aumenta con cada biopsia posterior. Como alternativa, los pacientes cuyas biopsias son inicialmente negativas con un PSA elevado representan un dilema clínico grave y corren el riesgo de costos de evaluación y procedimientos adicionales, incluida la biopsia de saturación que se realiza en el quirófano bajo anestesia.

Los hombres en esta situación también experimentan una ansiedad significativa (Katz DA, Jarrard DF, McHorney CA, Hillis SL, Wiebe DA, Fryback DG., Health perceptions in patients who undergo screening and workup for prostate cancer, Urology 2007 Feb;69(2): 215-20). El desarrollo de una prueba no invasiva para aumentar la detección de PSA sería de enorme beneficio para la sociedad.

5 Las pruebas de detección que se utilizan actualmente (el antígeno prostático específico (PSA) sérico y el tacto rectal tienen solo un valor predictivo modesto (Strope SA, Andriole GL, Prostate cancer screening: Current status and future perspectives, Nat.Rev.Urol. 2010 Sep; 7(9): 487-93). Las isoformas del PSA añaden poca especificidad. Los fluidos corporales, incluidos el semen y la orina, pueden contener información molecular sobre la presencia de PCa. El PCa
10 y las células epiteliales de la próstata se eliminan en fluidos biológicos, en particular cuando la próstata se somete a manipulación física, creando así la posibilidad de su detección no invasiva en la orina o en el líquido prostático exprimido. Los intentos de detectar células de PC en la orina mediante citología tradicional se ven frustrados por sensibilidades inaceptablemente bajas, aunque las especificidades fueron sistemáticamente altas (Fujita K., Pavlovich C.P., Netto G.J., Konishi Y., Isaacs W.B., Ali S., DeMarco A., Meeker A.K., Specific detection of prostate cancer cells
15 in urine by multiplex immunofluorescence cytology, Hum.Pathol. 2009 Jul; 40(7): 924-33). Esto se debe principalmente al bajo número de células de PC presentes en las preparaciones de citología de orina. El análisis de las células desprendidas de la próstata anormal evita este importante obstáculo y representa el primer esfuerzo de este tipo en el cáncer de próstata y muchos otros cánceres.

20 Hasta ahora, una de las pocas alteraciones de defecto de campo encontradas tanto en el tejido de próstata periférico no canceroso como en los tumores de próstata asociados es nuestro hallazgo de una pérdida en la impronta típica del gen IGF2 (Fu V.X., Dobosy J.R., Desotelle J.A., Almassi N., Ewald J.A., Srinivasan R., Berres M., Svaren J., Weindruch R., Jarrard D.F., Aging and cancer-related loss of insulin-like growth factor 2 imprinting in the mouse and human prostate, Cancer Res. 2008 Aug 15;68(16): 6797-802). Hemos demostrado que este no es un fenómeno peritumoral
25 (es decir, respuesta adyacente al cáncer), sino que está ampliamente presente en áreas distantes dentro de la próstata periférica (Bushari S., Yang B., Kueck J., Huang W., Jarrard D.F., Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer, Prostate 2011 Mar 22). Nuestro laboratorio ha ampliado estos estudios a otros fenómenos epigenéticos y, recientemente, utilizando una serie de matrices de metilación Nimblegen™ ENCODE18, que analizan todo el genoma humano, hemos identificado 87 loci (de 385.000 loci
30 analizados) que exhiben metilación alterada ($p < 0,01$) en el tejido de próstata periférico de los hombres que tienen la enfermedad en comparación con los que no la tienen (Fig. 9D). Curiosamente, estos defectos de metilación se encuentran tanto en áreas de genes como en áreas relativamente exentas de genes del genoma. Hasta ahora, hemos analizado 16 de estos loci y hemos validado 6 (CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1, WNT2 y NCR2) usando pirosecuenciación con bisulfito cuantitativa en una cohorte adicional de 40 pacientes (Fig. 11). Cabe destacar que, descubrimos que la metilación en el WNT2 y NCR2 estaba asociada al defecto de campo en cánceres de grado alto, pero no de grado
35 intermedio (Fig. 11E-F). Este sorprendente hallazgo sugiere que estos cánceres de alto grado pueden tener una huella molecular presente en los tejidos normales adyacentes que podrían ayudar en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Por último, los análisis de las asociaciones entre el volumen tumoral, el PSA y el grado de metilación demostraron una asociación significativa entre FGF1 y el volumen tumoral aumentado ($P = 0,036$, $r = 0,4616$) (véase el Ejemplo 1). Además de la confirmación histológica de la ausencia de cáncer en estos tejidos de próstata, también realizamos el análisis de expresión de AMACR, un marcador específico para la presencia de PCa (Ananthanarayanan V., Deaton R.J., Yang X.J., Pins M.R., Gann P.H., Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) expression in normal
40 prostatic glands and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): association with diagnosis of prostate cancer, Prostate 2005 Jun 1;63(4):341-6), para descartar la contaminación con células cancerosas (datos no mostrados). En resumen, estos datos demuestran que se producen cambios de metilación particulares en loci específicos en tejidos asociados a tumores y que varios de estos marcadores se alteran preferentemente en cánceres de alto grado.

Significancia

50 Al definir estos cambios epigenéticos, se puede aprovechar esta información para mejorar el diagnóstico y la cura del PCa de alto grado. Este análisis tiene el potencial de proporcionar un ensayo que disminuirá la morbilidad asociada al diagnóstico de PCa y mejorará el pronóstico. Este panel de marcadores se puede utilizar en tejido de biopsia de próstata no canceroso para validar los hallazgos negativos y disminuir a corto plazo el número y la frecuencia de
55 biopsias que se realizan en hombres con PSA elevado. Además, prevemos la aplicación de estos marcadores para desarrollar una prueba de orina no invasiva que pueda usarse como complemento para identificar aún más a los hombres con un PCa letal de mayor riesgo. Los enfoques para lograr estos objetivos se divulgan en detalle a continuación.

60 Confirmación de que las alteraciones de metilación asociadas a un defecto de campo en el PCa de alto grado/alto volumen pueden detectarse en la orina (Ejemplo predictivo)

Las células de la próstata se eliminan en la orina. Estudios anteriores más limitados se han centrado en alteraciones de metilación específicas del cáncer en la orina (Fujita K., Pavlovich C.P., Netto G.J., Konishi Y., Isaacs W.B., Ali S., De Marco A., Meeker A.K., Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence
65 cytology, Hum.Pathol. 2009 Jul;40(7): 924-33; Rogers C.G., Gonzalzo M.L., Yan G., Bastian P.J., Chan D.Y., Nelson

W.G., Pavlovich C.P., High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection, *J.Urol.* 2006 Nov;176(5): 2280-4) y han demostrado su viabilidad, pero una menor sensibilidad debido a la presencia de células cancerosas raras. Por el contrario, las células epiteliales de próstata normales se encuentran en la orina en una proporción mucho mayor (Fujita K., Pavlovich C.P., Netto G.J., Konishi Y., Isaacs W.B., Ali S., De Marco A., Meeker A.K., Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology, *Hum.Pathol.* 2009 Jul; 40(7): 924-33). Intentamos evaluar los cambios de metilación que se encuentran en las células normales asociadas al cáncer de próstata para determinar si estos cambios predicen la presencia de cáncer dentro de este biofluido. Cabe destacar que, nuestros marcadores también son anormales en las células cancerosas.

Tomaremos marcadores de tejido validados (seis marcadores divulgados en el Ejemplo 1 y otros validados a partir de los experimentos descritos anteriormente en este Ejemplo) y los aplicaremos a muestras de orina de hombres sometidos a biopsia de próstata en todo Wisconsin. Confirmaremos que se pueden detectar diferencias de metilación en la orina de hombres con cáncer frente a los que no lo tienen.

Prevedemos que las muestras de orina prospectivas de 250 hombres con valores altos de PSA sometidos a biopsia de próstata se obtendrán después de un examen rectal digital "atento". De estas muestras, 100 se obtendrán a través de la Wisconsin Network for Health Research (WNHR). Se recogerá el consentimiento para la inclusión de un grupo de control adicional de 50 controles de la misma edad vistos en la clínica de urología con valores normales de PSA, se obtendrá y se examinará. Brevemente, después del examen de la próstata, se recogerán 20 ml del chorro inicial, se mezclarán con EDTA y se almacenarán en hielo como se describe (Rogers C.G., Gonzalgo M.L., Yan G., Bastian P.J., Chan D.Y., Nelson W.G., Pavlovich C.P., High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection, *J.Urol.* 2006 Nov;176(5): 2280-4).

El ADN genómico se extraerá del sedimento usando una columna como se indicó anteriormente. A continuación, el ADN se tratará con bisulfito de sodio y se realizará la pirosecuenciación cuantitativa utilizando nuestro panel de loci CAV1, EVX1, MCF2L, FGF1 y NCR2, así como marcadores adicionales validados a partir de los experimentos descritos anteriormente en este ejemplo. La metilación de los loci individuales se comparará entre los grupos TA y NTA utilizando pruebas t de Student bilaterales realizadas a un nivel de significancia de 0,026 (una tasa aproximada de falsos descubrimientos). Se realizarán análisis adicionales usando regresión logística para determinar si múltiples loci, PSA total, PSA libre, densidad de PSA, o edad mejora la capacidad de predecir qué individuos pertenecen al grupo TA. Suponiendo que 150 de los 300 sujetos pertenecen al grupo TA y los otros 150 pertenecen al grupo NTA, tendremos al menos una potencia del 80 % para detectar como significativo un cambio en la desviación estándar de 0,3557 en el valor de metilación medio entre grupos. Se realizarán análisis de subgrupos adicionales según el volumen del tumor, la edad, el estadio patológico y el grado del cáncer.

Junto con los enfoques anteriores, buscaremos desarrollar tecnologías alternativas para cuantificar la metilación para permitir una aplicación generalizada. Las matrices de metilación originales de Nimblegen permiten la detección de metilación en sitios específicos, pero no en la resolución de pares de bases. Sin embargo, el análisis completo del potencial pronóstico de estos sitios requerirá un análisis completo de todo el locus para identificar nucleótidos específicos donde la metilación es predictiva del curso de la enfermedad. Aunque el enfoque de pirosecuenciación es una técnica establecida dentro de nuestro laboratorio, una de sus limitaciones es que solo puede escanear un número limitado de sitios de metilación que abarcan 100-300 pb dentro de un solo análisis y consume mucho tiempo y es costoso.

Confirmaremos tecnologías alternativas que mejoran la sensibilidad del ensayo y la aplicabilidad comercial mediante: i) el desarrollo de un enfoque multiplex de qPCR sensible a la metilación basado en la amplificación de múltiples loci metilados específicos (Campan M., Weisenberger D.J., Trinh B., Laird P.W. MethyLight. *Methods Mol.Biol.* 2009; 507: 325-37), y ii) la implementación de la secuenciación directa de muestras mediante el uso de tecnología de secuenciación de próxima generación (disponible en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Washington) para detectar digitalmente los sitios de metilación con una resolución de pares de bases. Confiamos en el cebado específico de metilación combinado con sondas fluorescentes específicas de metilación y desmetilación. Este ensayo es más rápido y tiene la capacidad añadida de detectar con sensibilidad frecuencias muy bajas de alelos hipermetilados (Campan M., Weisenberger D.J., Trinh B, Laird PW. MethyLight. *Methods Mol.Biol.* 2009; 507: 325-37). La secuenciación directa utiliza técnicas de captura de secuencia establecidas (para 25-30 loci) y a continuación análisis de metilación como se describe (Gu H., Smith Z.D., Bock C., Boyle P., Gnirke A., Meissner A., Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling, *Nat. Protoc.* 2011 Apr; 6(4): 468-81). Brevemente, se utilizará el sistema Agilent Sureselect™ para capturar aproximadamente 50 kb de nucleótidos que rodean cada uno de estos loci (aproximadamente el 0,1 % del genoma completo) para al menos 100 de las muestras. Las muestras enriquecidas pueden codificarse con códigos de barras y secuenciarse con alto rendimiento utilizando el instrumento Illumina HiSeq™ (o un aparato alternativo similar) en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Washington (80 millones de lecturas/línea) para identificar sitios específicos de metilación comparando secuencias con material convertido con bisulfito, proporcionando así una lectura digital del porcentaje de metilación en un sitio específico en una muestra determinada.

Prevedemos ser capaces de detectar diferencias de metilación en uno o varios loci en hombres que tienen cáncer y

específicamente cáncer de alto grado. Al aumentar el conjunto de marcadores validados en tejidos, disminuiríamos la probabilidad de que no se detecten marcadores significativos en la orina. Dado que los marcadores en los tejidos de la próstata TA identificados hasta ahora también son anormales en el cáncer en sí, prevemos que la sensibilidad de este enfoque será mucho mayor que los enfoques con marcadores alterados específicamente en el cáncer (Fujita K., Pavlovich C.P., Netto G.J., Konishi Y., Isaacs W.B., Ali S., De Marco A., Meeker A.K. Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology. Hum.Pathol. 2009 Jul; 40(7): 924-33). Es probable que los análisis estadísticos de los loci metilados mejoren mediante el uso de PSA, antecedentes familiares, y tacto rectal en los análisis estadísticos.

10 Realizamos aproximadamente 500 biopsias de próstata al año en la UW, proporcionando una mayor cantidad de muestras de orina si es necesario. La obtención de muestras de orina de la Wisconsin Network for Health Research (WNHR) validará nuestro hallazgo para los pacientes de todo Wisconsin. Se pueden extraer aproximadamente 10 µg de ADN de 20 ml de orina utilizando este método (Rogers C.G., Gonzalzo M.L., Yan G., Bastian P.J., Chan D.Y., Nelson W.G., Pavlovich C.P., High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection, J.Urol. 2006 Nov;176(5): 2280-4). La presencia de células competidoras de otra etiología (que incluyen vejiga, riñón y leucocitos) puede haber alterado los cambios de metilación. Si este es el caso, intentaremos enriquecer la población de células prostáticas mediante la utilización de anticuerpos anti-NKX3.1 como se ha descrito (Fujita K., Pavlovich C.P., Netto G.J., Konishi Y., Isaacs W.B., Ali S., De Marco A., Meeker A.K. Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology, Hum.Pathol. 2009 Jul; 40(7): 924-33). Dada la asociación con el cáncer de los marcadores identificados, sería poco probable que otros tipos de células se alteren en tejidos normales de otras fuentes.

Ejemplo 5

25 En un experimento análogo al del Ejemplo 1, se eligió un subconjunto de dos genes para una evaluación adicional, basada en la localización genómica, la posible función biológica, el grado de metilación y el éxito del cebador en una validación separada utilizando un conjunto de 24 muestras de próstata TA y NTA. Se empleó pirosecuenciación cuantitativa para permitir una evaluación más precisa del grado de metilación del ADN. Se realizaron controles internos para la adecuación de la conversión de bisulfito. Dos loci, que estaban asociados a los genes EXT1 y SPAG4, mostraron cambios de metilación significativos (P <0,05). El locus asociado a SPAG4 estaba hipermetilado y el locus asociado a EXT1 estaba hipometilado. La localización de las sondas y CG evaluados por pirosecuenciación cuantitativa se muestran en las Figs. 23 y 25. Los dos loci en la pirosecuenciación están cerca o se superponen a las regiones de la matriz de metilación, pero las secuencias (Fig. 22) son diferentes. Las secuencias enumeradas en las Fig. 20-21 han cubierto tanto la región de la matriz (Fig. 22) como las regiones de pirosecuenciación. Estos datos demuestran que los tejidos TA tienen un perfil de metilación distinto al de los hombres sin cáncer (NTA) y que estos cambios alteran regiones específicas del genoma.

Identificación de un defecto de campo de metilación generalizado en la próstata periférica.

40 La alteración preferencial en tejidos adyacentes a focos tumorales de PCa, es decir, defecto de campo, sugiere una respuesta peritumoral. Para evaluar si los tejidos adyacentes a los focos tumorales de PCa se alteran preferentemente, se evaluó la extensión del defecto de campo en 26 tejidos histológicamente normales adicionales observando el estado de metilación de estos dos marcadores metilados diferencialmente. Los inventores realizaron microdisecciones en sitios adyacentes (TAA, 2 mm) y distantes (TAD, >10 mm) a tejidos normales respecto del foco del tumor principal para cada una de las muestras (Fig. 8). Se aplicaron tinción histológica de HyE tridimensional y expresión de AMACR determinada por qPCR para descartar cualquier contaminación por células tumorales o la presencia de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIIN), un posible precursor de cáncer (Ayala, A.G. & Ro, J.Y. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Recent Advances. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 131,1257-1266 (2007)). Se encontró un aumento de la expresión de AMACR en dos tejidos NTA y tres TA que posteriormente se excluyeron del análisis adicional (Fig. 13).

55 Cuando se compara con los tejidos NTA, la hipermetilación de las sondas asociadas a SPAG4 y la hipometilación de EXT1 demostraron cambios significativos tanto en tejidos TAA, como TAD (Fig. 24 y Tabla 6). Cabe destacar que, no hubo diferencia en el grado de metilación visto a diferentes distancias del tumor cuando se compararon los conjuntos de tejidos TAA y TAD. También se observaron cambios de metilación significativos en muestras de tumores en comparación con los tejidos NTA para EXT1 y SPAG4, lo que revela una persistencia de estos cambios en el cáncer asociado. Estos datos indican que el defecto del campo epigenético en la próstata está muy extendido y no se localiza únicamente en el entorno peritumoral inmediato.

Tabla 6 - Porcentaje de metilación de todas la CpG analizadas para cada gen

	EXT1			SPAG4		
	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD
CG1	39,4	34,7*	34,2*	13,5	21,4*	25,2*

(continuación)

	EXT1			SPAG4		
	NTA	TAA	TAD	NTA	TAA	TAD
CG2	28,3	24,1*	24,5*	15,9	25,4*	27,3*
CG3	38,2	35,1*	35,0*	16,1	18,7*	18,1
CG4	27,2	24,3*	24,0*	11,6	15,9*	15,6*
CG5	14,8	12,8	14,0	9,0	11,5*	10,8
CG6	32,5	36,3	38,5			
*P<0,05						

Ejemplo 6Islas de CpG

5

Basándose en las enseñanzas de los Ejemplos 1, 2 y 5, también se pueden verificar las islas CpG que están ubicadas en las regiones promotoras de los genes que muestran cambios de metilación significativos que se correlacionan con el PCa, preferiblemente la región dentro de aproximadamente 5 kb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción (TSS), porque la metilación de estas islas CpG cambiará las expresiones de los genes y afectará a las funciones de los genes. La investigación principal de los inventores (datos no mostrados) mostró que se podría desear examinar los genes EXT1 y SPAG4. Las regiones expandidas de cada uno de estos dos genes para la detección preferida de los cambios de metilación se detallan en las Figs. 26-27.

10

Tanto EXT1 como SPAG4 tienen islas de CpG dentro de las regiones promotoras. Para EXT1, las regiones expandidas para la detección preferida de los cambios de metilación serían 373 pb en dirección 5' hasta 84 en dirección 3' del sitio de inicio de la transcripción (TSS) Fig. 26 (SEQ ID NO: 94). Para SPAG4 las regiones expandidas para la detección preferida de los cambios de metilación serían desde 1100 pb en dirección 5' del TSS hasta el primer exón (SEQ ID NO: 95), 1180 pb en dirección 3' del TSS (intrón 1 y exón 2, SEQ ID NO: 96) y 3640 pb en dirección 3' del TSS (intrón 9 y exón 10, SEQ ID NO: 97).

20

Ejemplo 7Prueba de detección en orina de metilación del ADN para el PCa

Se puede utilizar un defecto del campo epigenético generalizado para detectar el cáncer de próstata en pacientes con biopsias histológicamente negativas (Truong *et al.*, "Using the Epigenetic Field Defect to Detect Prostate Cancer in Biopsy Negative Patients" (2012) J Urol, *en prensa*). Las biopsias de próstata se realizan en los pacientes que tienen niveles elevados de PSA. A cada paciente se le dará un masaje prostático para aumentar la cantidad de células prostáticas que se excretan en la orina, y luego se recolectará la orina excretada. Los pacientes clasificados como adenocarcinomas se utilizarán en las muestras de biopsia positivas, y los pacientes con esta biopsia actual negativa y todas las biopsias negativas anteriores se utilizarán en las muestras de biopsia negativas. La orina se centrifuga durante 15 minutos a 1200 rpm a 4 °C, se retira el exceso de sobrenadante y se sedimenta a -80 °C inmediatamente.

30

El ADN genómico de la orina y el tejido de la biopsia se extrae con el kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue, Protocolo de laboratorio: Tejidos animales (Qiagen). A continuación, el ADN se trata con bisulfito sódico utilizando el protocolo del Qiagen EpiTect Bisulfite Handbook (Qiagen, Valencia, CA) para modificar el ADN y convertir toda la citosina no metilada en uracilo. El ADN modificado con bisulfito se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos de genes, con cebador directo o inverso biotinilado. Los genes amplificados incluyen CAV1, EVX1, WNT2, MCF2L, NCR2, FGF1, EXT1 y SPAG4. Se aplicarán cinco microlitros de los productos de la PCR para la pirosecuenciación para determinar el porcentaje real de metilación dentro del gen. El ensayo se realiza en un PyroMark™MD Pyrosequencing System (Qiagen). Todas las muestras se analizan con dos ensayos independientes y la prueba t se utilizará para comprobar las diferencias en la metilación entre las muestras de orina de biopsia positivas y negativas, considerándose una p <0,05 estadísticamente significativa.

40

La Fig 28 muestra la metilación de los genes en la orina de los pacientes que tienen biopsias positivas o negativas para el cáncer de próstata. Hemos probado la metilación de los seis marcadores EVX1, CAV1, FGF1, MCF2L, WNT2 y NCR2. EVX1, CAV1, FGF1 y NCR2 mostraron una diferencia de metilación significativa entre los grupos positivos y negativos para la biopsia, prueba t *P<0,05.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar cáncer de próstata en un sujeto humano que comprende cuantificar la metilación en el ADN genómico obtenido del sujeto humano en al menos una región diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39, en donde los cambios de metilación significativos indican la presencia de cáncer de próstata o un defecto de campo del cáncer de próstata, en donde el cambio es respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el ADN genómico se obtiene del tejido de próstata.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el ADN genómico se obtiene del fluido corporal seleccionado del grupo que consiste en plasma, orina y semen.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la cuantificación comprende analizar si la región diana de SEQ ID NO: 39 está hipermetilada y la región diana de SEQ ID NO: 18 está hipometilada como una correlación positiva con el defecto de campo del cáncer de próstata.
5. El método de la reivindicación 4, en donde las regiones diana se amplifican usando al menos un conjunto de cebadores en las SEQ ID NO: 88-93.
6. Un método para amplificar al menos una de las secuencias de ADN diana para diagnosticar el cáncer de próstata en un sujeto que comprende las etapas de
 - (a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un ADN diana bicatenario modificado con bisulfito de un sujeto y (i) al menos un par de cebadores seleccionados del grupo diseñado para amplificar al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39, en donde el par de cebadores comprende un primer y un segundo cebador que son complementarios con la secuencia de ADN diana, (ii) una polimerasa y (iii) una pluralidad de nucleótidos libres que comprenden adenina, timina, citosina y guanina;
 - (b) calentar la mezcla de reacción a una primera temperatura predeterminada durante un primer tiempo predeterminado para separar las hebras del ADN diana entre sí;
 - (c) enfriar la mezcla de reacción a una segunda temperatura predeterminada durante un segundo tiempo predeterminado en condiciones para permitir que el primer y segundo cebadores se hibriden con sus secuencias complementarias en el ADN diana y permitir que la polimerasa extienda los cebadores; y
 - (d) repetir las etapas (b) y (c) al menos 10 veces, en donde el aumento de metilación, respecto al tejido de un segundo sujeto humano que no tiene cáncer de próstata, indica la presencia de cáncer de próstata o un defecto de campo del cáncer de próstata.
7. Uso de un kit para el diagnóstico del cáncer de próstata o la detección de defectos de campo del cáncer de próstata, comprendiendo el kit al menos un conjunto de cebadores, en donde el conjunto de cebadores consiste en un cebador directo y un cebador inverso diseñado para amplificar una región diana seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 39 y los componentes esenciales para la amplificación del ADN.
8. Uso del kit de la reivindicación 7, en donde el conjunto de cebadores consiste en un cebador directo seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 88 y 91, y un cebador inverso seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 89 y 92.
9. Uso del kit de la reivindicación 7, en donde los componentes esenciales para la amplificación del ADN comprenden polimerasa, dNTPs, y una sal de magnesio que puede liberar Mg^{2+} .
10. Uso del kit de la reivindicación 7, en donde el kit además comprende sondas específicas de metilación y desmetilación marcadas con fluoróforo FAM o Hex y es adecuado para un ensayo de tubo cerrado para MS-QPCR.
11. Uso del kit de la reivindicación 7, en donde el kit además comprende cebadores de secuenciación y es adecuado para ensayos basados en pirosecuenciación con bisulfito.
12. Uso del kit de la reivindicación 7, en donde los cebadores de secuenciación se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 90 y 93.
13. Uso del kit de la reivindicación 7, que además comprende perlas de estreptavidina sefarosa, mezcla de enzimas, mezcla de sustrato y dinucleótidos.
14. Uso del kit de la reivindicación 7, en donde el kit comprende conjuntos de cebadores seleccionados del grupo que consiste en dos conjuntos, tres conjuntos, cuatro conjuntos, cinco conjuntos, seis conjuntos, siete conjuntos y ocho conjuntos.

CAV1 (caveolina 1, proteína caveolar), Cr7

SEQ ID NO:1

```

agaagc ctgcggctgc cccctgcgcg ccgaggctcct gcgggtcctg cgggtcctgc
gtgctgagcc ggggcgtgcg cgggcggggg ccttcggacc gcgcggcggg gcctgccttg
acccttgcg gcgggcgggg gaggcaggcg cgccctgcag agtacagagg ggtgtggtgt
cctctgcgag atcctcttaa aaagctggct acgcgcaggc ggtttctgtg cacggagccg
tagctgtcgg agcggttagt tcgatttcga gctcgaggtt tccccgcgcg ccaggctgac
ttctcatcgc ttgtttttct ttttgcatth ttctcccac cgccgttgcc gccctccccg
tctggcogt ccgcccctcg cctctgcag ggacatctct acaccgttcc catccgggaa
cagggcaaca tctacaagcc caacaacaag gccatggcag acgagctgag cgagaagcaa
gtgtaogacg cgcacaccaa ggagatcgac ctggtcaacc gcgacctaa acacctcaac
gatgacgtgg tcaaggtaag ccaaggcgac caacagggaa gggctgggac agctctctc
tggcagttag cccgtgcate cttcttttagc attgcccgtgt acgcacaccc caccocgccc
cctacacgcg cacacacaca cacacacaga gttttgtggg tttgatgtgt gggagctccc
gcagtcggca gaaacgttac atctcccttc ccccatctcc ccccaatagt tagttcagct
gaaattcagc taaagtgagt tttgtagaag ttctataac tacactttta tctagcaaa
tgagcctatt gacctcagca acagacggcc catactcctt gggacgggtga gatggttcct
atccattccc aggttgaaaag tctagtgaca ggtccccact gcacgtggca ttaagacagt
cagataattg tgtcagggtct tgtgctgagg atgagtcaga atacaagatg ggcatgttcc
cccaactaaa acgatgggaa gtgattttct taaa
    
```

Fig. 1

EVX1 (homeobox even-skipped 1), Cr7

SEQ ID NO:2

accgtgcccc tccgctcccc gggcctccca ctgcgcccaac ccttcacttc ggcgcaggcc
 aggaggaaga cactcccttc ccctagggca ggatggctgg ggggaccac ctgagcaact
 ctctctgcta tctgcgttct ggogggggtc tctactgtg ttctggcatt ggcgggactg
 agggtgacag cagtgccttg agtgoggggt gctgaggggg cggatgcaag tcttgactt
 gggggattcg aagctcacc caagcacc caagcacc caagcacc caagcacc caagcacc
 tgctcgggga agacacttcc cccagggcag ggcaagatca aacgccgac cgggcagttt
 gtggctggca ggggtgaaga ggcattggag cgcggaagcc aggagtccat aaaggaccgt
 aaaattgcgg cccacttggg cagcccggtt gctgcagccc tccgaccagt ttgcacgtcg
 gtcagaggtc caaattacct tgctacttcc cgggcttcgc ggcgccagggt cggaaatggt
 cccaatggtc taattgcctt tggctctcgg ttgcatttga aaaggcagag atcgggtcct
 ccccccttcc cctttccttc ctagtcccaac ttctccacc aaaggaaaag gagctgcagg
 gggctggagc cccacccttc tcagaggtag gcccaaagg gggctggttt aactggagaa
 cccctcccc ccaaaggcta atgggaaagg ggtggatagc ccggaaggga gtttccctct
 gtgccaacaa tcacctcccc agaaggggggt agaaaactgg gcgcggggtg gtggggggga
 ggagagggga gccaccagc agacactcct ccacagaact gtaggagtgg gtggaaagag
 cctgggggag ggggggagaa agaccacccc ctggtcttgg cagccaacgc cttgttgaat
 acctgcacct accccttact atcttatcac cgatttcacc cagcctcctt ccataaccc
 tcagaacaac ctggactcca ctcacatata

Fig. 2

MCF2L (tipo secuencia transformante derivada de línea celular), Cr13

SEQ ID NO:3

```
cc tgaggggtct gttccagggg agccagggct ctccgtgtcc cgacgcggtt
gcctcacccc atgcccctca ggaaatgctg aaatacagca ggaactgcga gggggctgag
gacctgcagg aggcgctgag ctccatcctg ggcatcctga aggcctgtaa cgactccatg
cacctcactg ctatcaccgg ctatgacgta aggcgcccag atgcccggtc tccccgcgg
cctccgtgga atacaccagc ccagcaactt ggcggcctcc ctgcacacgc cctcgcgttt
gggtggaatg tgcaggttct gggcaggagg tctgggggtg tccctagata agcccactcc
caggccccac agccgggtcc acagacccca cagccgggtc cacagacccc actgggctct
ctgggacgtg gagaaaatca ggaagcgtcc cttgcttggg gggcacgcat ctccagcagg
aacgcagctc agacctcctc actccttgtc ttctcctggg gaggaggcgt ggctcggagc
agacgtgact tctgttttct gggctgcgat ttgcaggctg gtgacttaga gcaagtggcc
ccagaaggca gatgtcactt tccccgtaga gccccacatc aggtcacagc ttattcatct
tttgtccgtc tttatgtcca ccagcactc attctcaggt gttttttttt taactaatag
agttgattta ttgcagcaat ttttggtttg tgagataatt gagtataaat cagaggccct
gaggcttccc ctagtgttga catttagcat gggtgccaca cctgccacac atggtgaaact
agcgtgatg ctgattagtg actgagggcc gttccccttg gagctcactc tgggtgctgt
gcattctgcg gtttgacag gcgtgtaaca tctacacccc agcgctagag catcacacag
agcagcttca ctgtcctaga agccatgtg ccccgccagt ccatccctcc tccccagcc
cctggcacct gctgacctgt cagtctccac gagcttgc
```

Fig. 3

FGF1 (factor de crecimiento de fibroblastos 1), Cr5

SEQ ID NO: 4

ATAATCGTGAGAAGGAAGCTCATGCTTCTGTCCCTCGACTGGCTTGTAGTCTAGTCAAGAAGACTTGAGGGC
TGATGAGCTTTTCAGAGATGGAAATAGAGGATACTGTGCCCCGTGGCCTCTGCTCTGCCAGCCCCCTACC
AGTAACCAACAATTTTCCAGAAGAATTTCCAAATTCCTTCTCCAAAGTCTCCACTGGCTCCACTTTCATT
TGCTTGAGAAAAAAGTCTAAATGCTTTGGAACAGCATCATTCAAGGTCCTCFATGATCTGACTCCAAGCT
AGCTTGCACTAACCCCTGTGTGTCCCTGAAAACCCCCGCTCAGCGGCATCAGCCATGCATGCTGGGCGAAG
ATGCCCTCTACTTGCCCCCCCCCTGGGCCTCTGTTCAAGTGATTCCCTTTATTCCATGCCACATATGTA
CCTGTTTGTCTTCTGCTGAGATGCCACATCTTCCAGAAAGTCTCCTGACCCCTTCTCTTACGCCCTC
CATCCATCCCCCAGCCCTTGGCACAACCTTACAGCACTTATCATAGCTTGTGATGGTATTTATGACTTA
GCTTCTCACCTTCTTTCAAGGACAGGAAGCTTATCTCATTTCCTGAATAATCACAAACAAAAATAATAGC
TAAATTTATGAGATGTTAGAATGCATATTTTATTTATATGAGGCAATGTGCTAGGTGCTTCCCTTGCACTA
TCTTGTGCAACCTTTTGACAAACACGTGAGGTAGGTATATCACTGGCCTCCTTTTATAAAGGAAGCTCAG
AGAGATGAATTGACTTTCTGGACTTAAGTTCAGGAAGCTTCACTTCAAAAACCCATGCCCTTGACCATGACT
TCACCTTTATTACCTAACTGTGTCTGGGTGAGTTCCTTGTATATAAGTCCTTACTGGGGCCGGGGCAGGGA
GGGGTGTCAAGAGGATGGGACAGTGAAGACAAGAGCAGCCTCCCCAAGGTCATGTGACAAGTCACGGTCAC
ATAAACATCACGAATGCGGGAGCTTTAGCGACCACATTTTCTCCTACACCTTTTACCTAGGAAATGGAAGT
CACAGTTTTCAAAGGGAACTAAACGTTTTTGGACTGTGCAAAGGATTAGATGACAGTATGTTGAATGCAAA
TTGATTGAGTCTGATTTAATTTGGATGGTGTGATGTGCCAAGTCACACAGCCCTGTTGGACCAGGTGCCTGAA
GCAAAGAACTTTCTTGACCCAGCTACCATGGCCTCTGCCTGAGCCTGGGAGGAGACATTTAACAAGGGA
AATTCCTTCTCCCTCCCTCACTGGACTGAACCTGTCCCTTTTCTTAAAGAAAGGGAGTGGCCTGGAGCCCA
GGCCCTCCCCAGGGGCTGCCTGCTCAGCTCCAGAC

Fig. 4

NCR2 (receptor desencadenante de citotoxicidad natural 2), Cr6

SEQ ID NO:5

```

tt tagagggagt gaggtgtaga agaaagcaga ctcaactgtg acacagcaga
gaccatctgc ctttccagag cttactgcag ctgaaaagac agataatagt gtgtgggcag
aggggtgaacc tggagacttg aaggaaacag gccctcttc ttggtggaca gtagaggaaa
ataaaggaaa aaatcagggg gaggaaactg accaaactgg gctcaaaatc catgcatgct
cactgacact tttctggcag cagtggccag gagcagactt catccttgtg aggtgggtat
ggcaaccaac cctgcgagta gtgggatggg gaaggggttg cctctgcacc tatgtgcaat
tatgtgggag tctctgacca cttctctggt ttctctgctt gattgcaggg gggacatatg
gtggaaaacc atgatggagc tcaggagcct ggatacccaa aaagccacct gccaccttca
acaggtcacg gaccttccct ggacctcagt ttctcacct gtagagagag aaatattata
tcacactggt gcaaggacta agataagcga tgatgatgat gaacacactt tgtgaataat
aaaattatct gaatgtttta ttctgttgt ttcttaagtt tccttcaaac tctgtctgca
tcgcacatt tgatctctag gggaccagct tctctagttt gccctctttc ctccatcata
accttttctt atcttcagtt cacctgatgt cccctgtaag tctgggagct gccttagatg
ctgttataat caggggaaggg cactgtacac aagcccagtg agtagaaagg ctgtgggcga
gcaaggcttg gaaacaagac ctgggtttgt tttctcagct cagccctgta tgaactcgga
cagataggtc actgccccctc tctgaacgtc cgtttctttc tctagaaaat gaaggggggtg
gagatgagtt ctgaaacccc ttccccatga ggataagtca ataagcatga actcaacacc
tgctgtgcc cagctcaggg accaagcacc acaggacaca aacaaaagga gccagcctgg
gaacacagtt gtgagtcctat aggtggcggg gccctgtgc aagattccag cacaggctga
gggaagggga cagtggaggg ggagcaaagc tgaaaatag tggctggaga gggatagaaa
agcaggacac tagtgggtac cagacagtgg gggaaggagc ccaacaagga tgaggaactt
tgctgtgaag tcatgttagt caggatgcca tgaccttcca tgagcccgaa agagggcaca
cagtcccagg aag
    
```

Fig. 5

WNT2 (miembro de la familia del sitio de integración MMTV tipo wingless 2), Cr7

SEQ ID NO:6

```
aaacacccaa cttcacttta agaacatcct tcattgatac
aaaggtttgt gatcttgat cagagataat gaactgcaat cctggcacag ttcttggtg
tgcagttaat aatattatgt agatgtttat tgtttttaa ttttagaatc aaaatttact
tatagttaca gaacagaggt cctcgacttt agtcactcat tcttttatca tccaaataaa
atgtctocag tcctocato agcggctgtg catgggaaac caccctcca cccaaccaa
gctccttgcc cagtgcctct gaagacccca gggggagtat cctgccgcta tagcctgtg
ctctgggtgtg gccacttat ccattgatcc attggtattt ggcttgaca ctggccacca
cccatctttc attcctcca aagcagcact agcagagatt gtcactggtg acacattttc
cttgagatto tgatgtcttg gaggcatagg gtaggaaaca atctctaatt gaataacgat
ttcccogtto ttagaaatgt aatgcoagct tctgccgcag gaattcttoa ccgctgtaac
cctccatagg ccccagactc ccgccacggt gcagggggtt ctaccttct cctctgcac
cctgggtctg gatgattctg aacctgact gcatattaga atcaatcaac tgaggaacca
caagtacctt caaggcccag gcctcacgtc caccctaggt tctaatttgc ccagtctggg
gagaggctgg aatgatccc caggtgattt taatatgtag ccaggagtga cacctactga
cctgccctct ccagttgcc ggaagaaagc ctcaaattcc tgttatttta ctatgtggag
taatttcacc ctttttgttt ccctctott tcaagaccat gaaatcctc aaactgtagc
cagattgtaa aagaacattt ttccttttt ccgccagcta tacacacata tgcaggcctt
taaaaactgg atcataccac atatattggt ctacattttg cttttatcgc ttgactt
```

Fig. 6

Secuencias de sondas para la matriz de metilación

CAV1:

CHR07FS115953929 115953929 115953978
ATCGACCTGGTCAACCGCGACCCTAAACACCTCAACGATGACGTGGTCAA
(SEQ ID NO:78)

EVX1:

CHR07FS027250107 27250107 27250156
TTGTCACTTCCCGGGCTTCGCGGCGCCAGGTCCGAAATGGTCCCAATGGT
(SEQ ID NO:79)

MCF2L:

CHR13FS112788866 112788866 112788915
TCTTCTCCTGGGGAGGAGGCGTGGCTCGGAGCAGACGTGACTTCTGTTTT
(SEQ ID NO:80)

FGF1

CHR05FS142028596 142028596 142028645
ACAAGCTATGATAAGTGCTGTGAAGTTGTGCCAAGGGCTGGGGGGATGG
(SEQ ID NO:81)

NCR2:

CHR06FS041426494 41426494 41426555
GTTTCCTCACCTGTAGAGAGAGAAATATTATATCACACTGTTGCAAGGACTA
AGATAAGCGA (SEQ ID NO:82)

CHR06FS041426614 41426614 41426665
GTTTCCTAAGTTTCCTTCAAACCTGTGTCTGCATCCGCACATTTGATCTCTAG
(SEQ ID NO:83)

CHR06FS041426769 41426769 41426818
TTATAATCAGGGAAGGGCACTGTACACAAGCCCAGTGAGTAGAAAGGCTG
(SEQ ID NO:84)

WNT2 :

CHR07FS116730563 116730563 116730619
CGGCAGAAGCTGGCATTACATTTCTAAGAACGGGGAAATCGTTATTCAATTA
GAGAT (SEQ ID NO:85)

Fig. 7

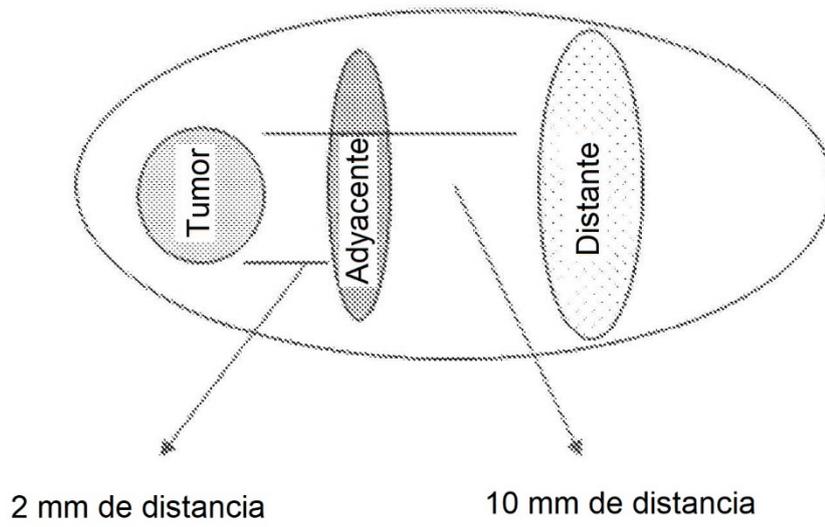


Fig. 8

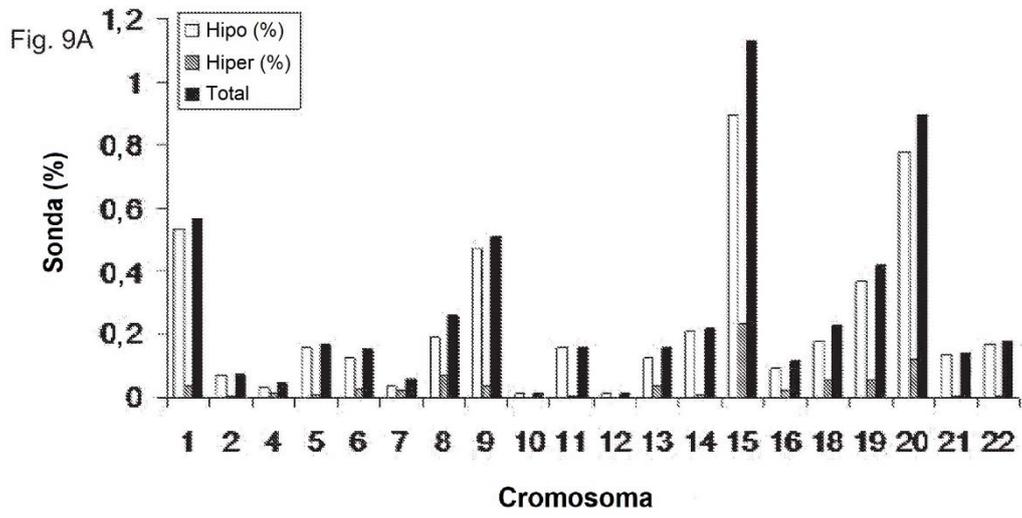


Fig. 9A

Cr 15

Fig. 9B

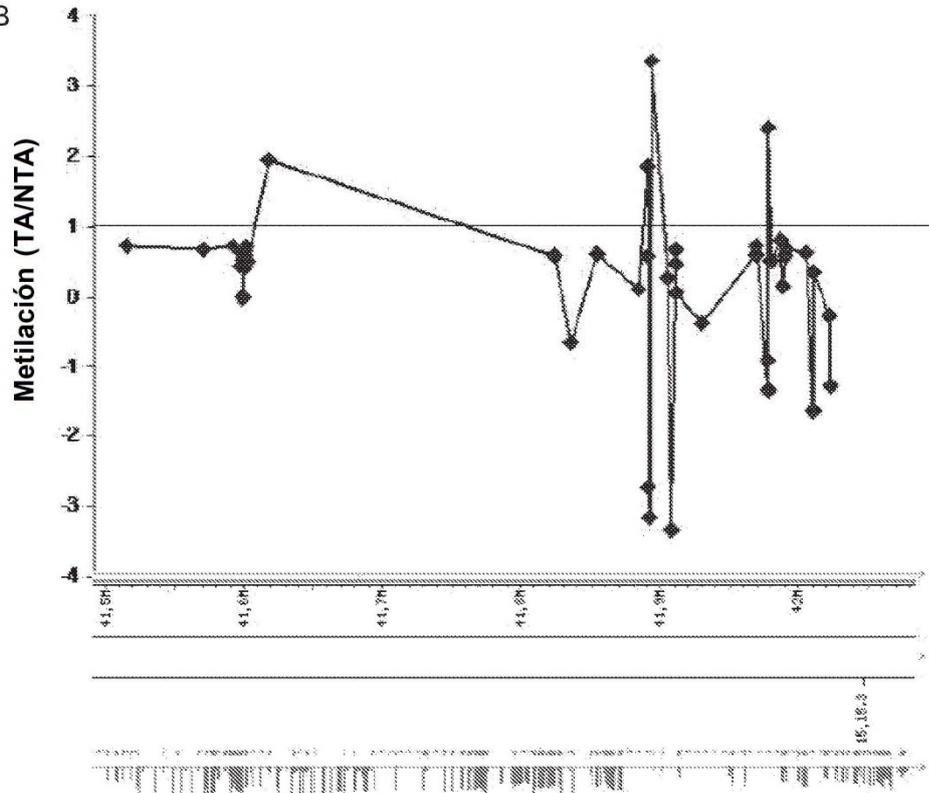


Fig. 9B

Cr 20

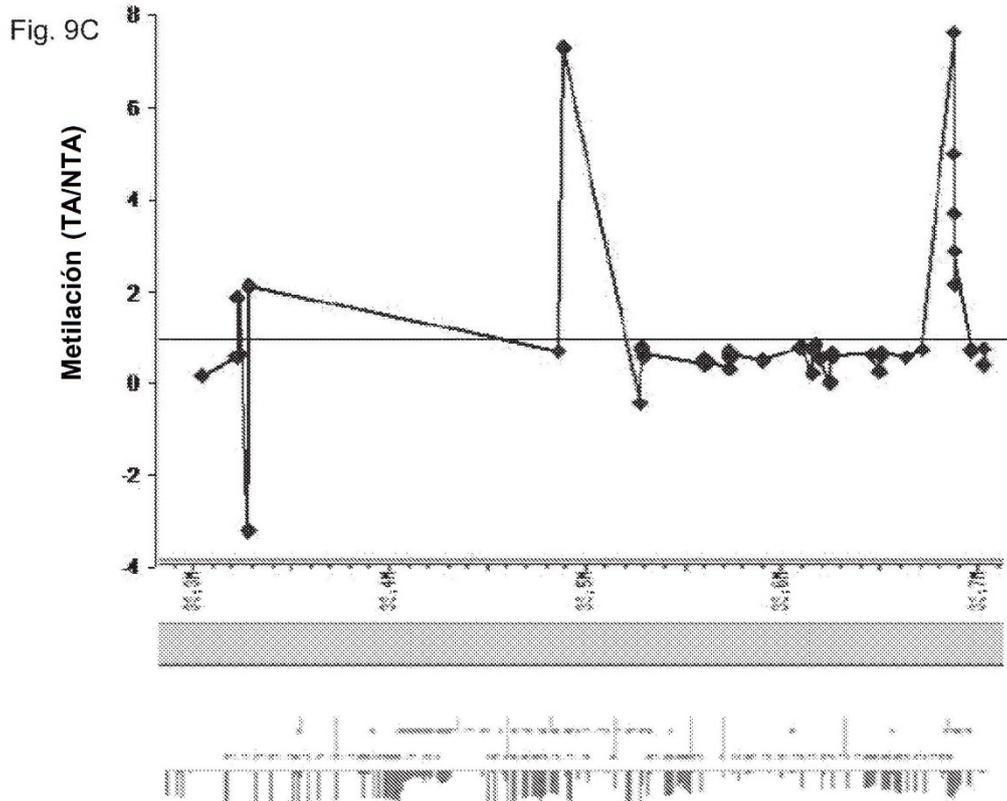


Fig. 9C

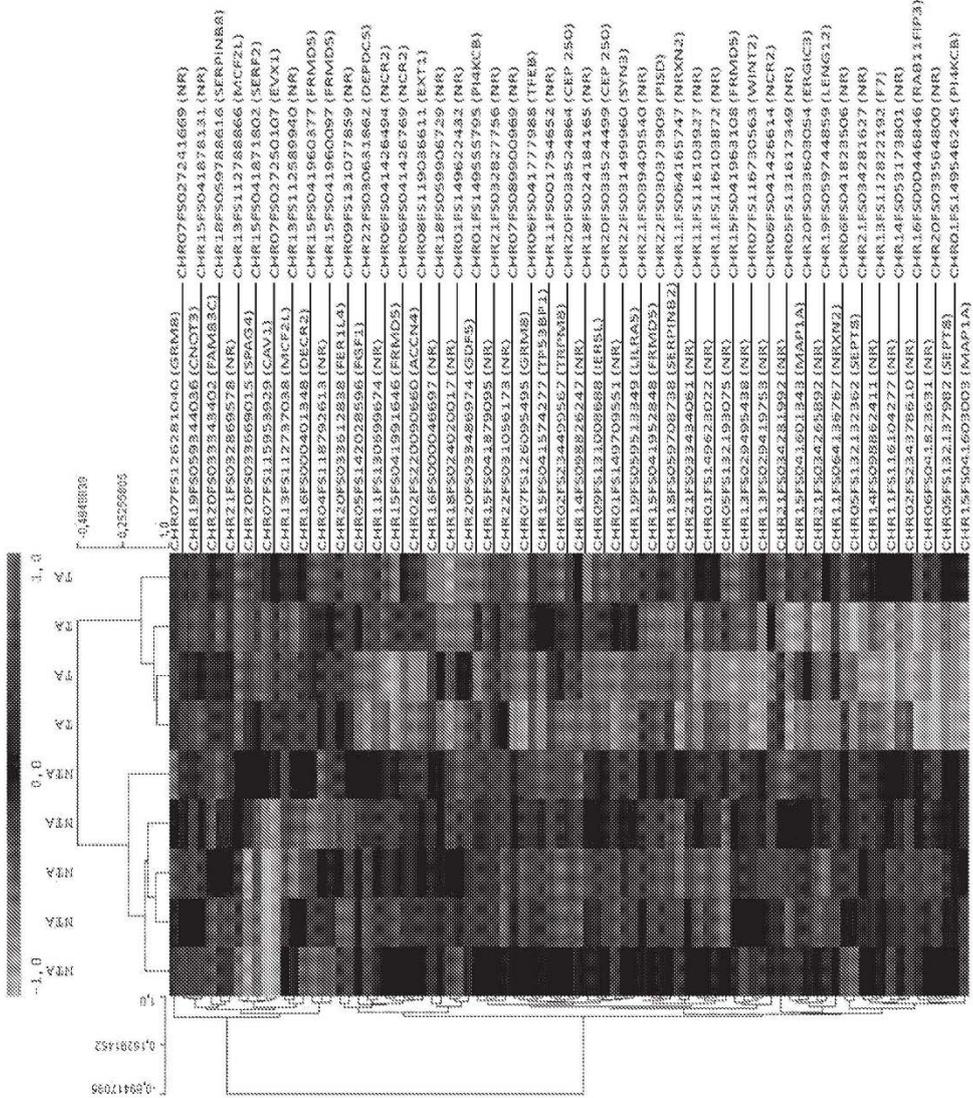


Fig. 9D

Fig. 9D

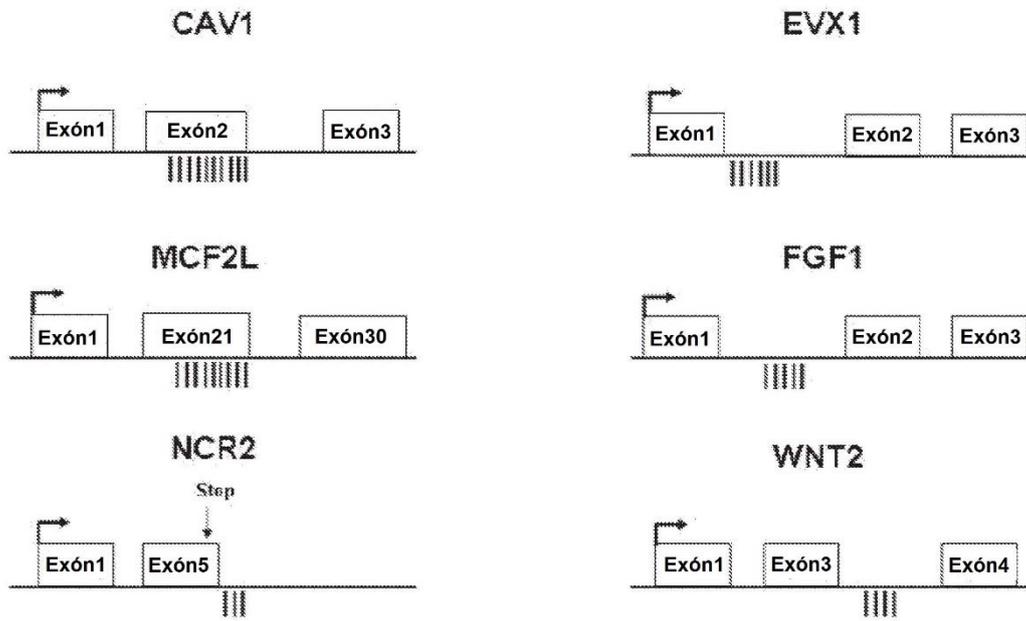


Fig. 10

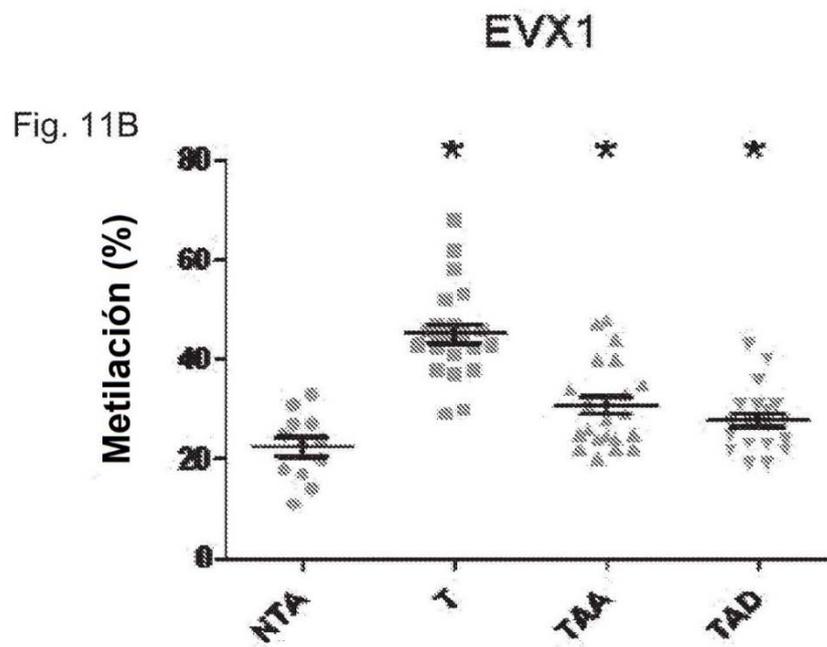
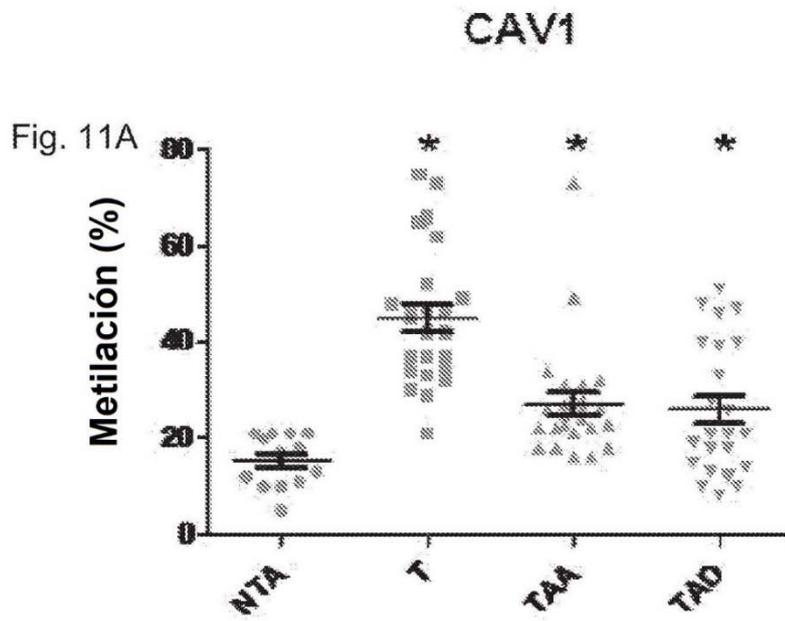


Fig. 11 A y B

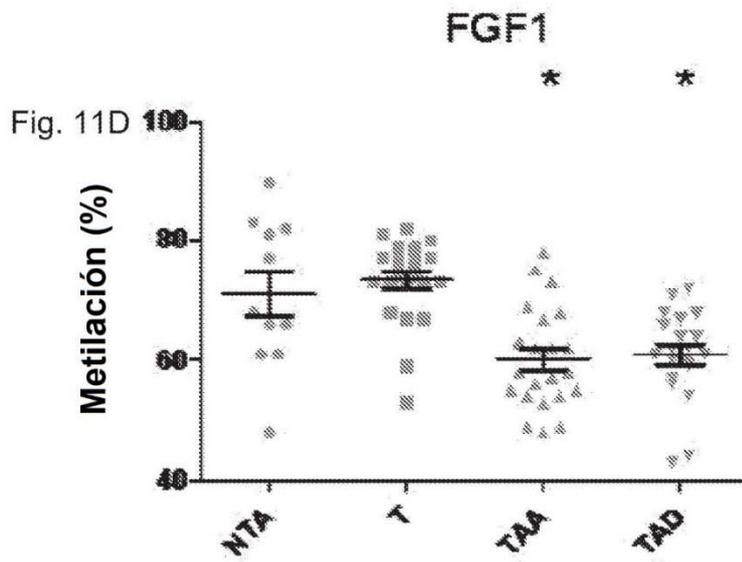
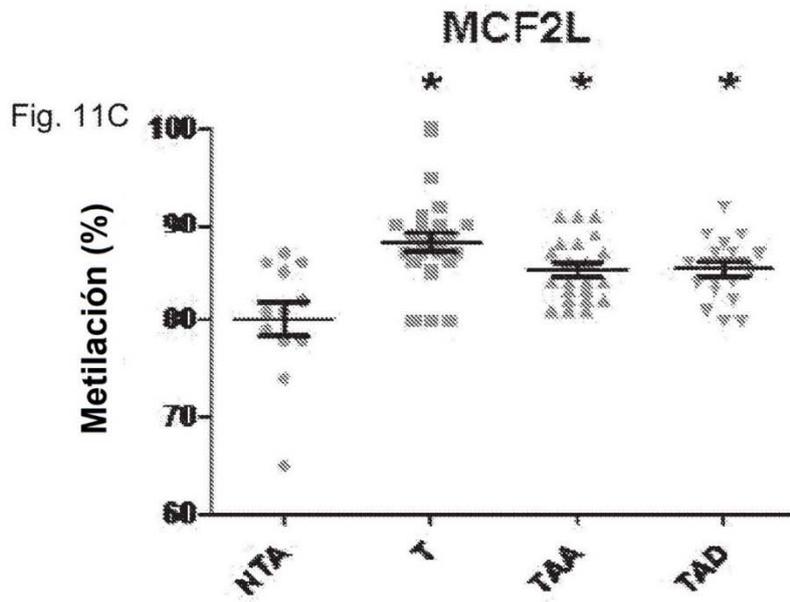


Fig. 11 C y D

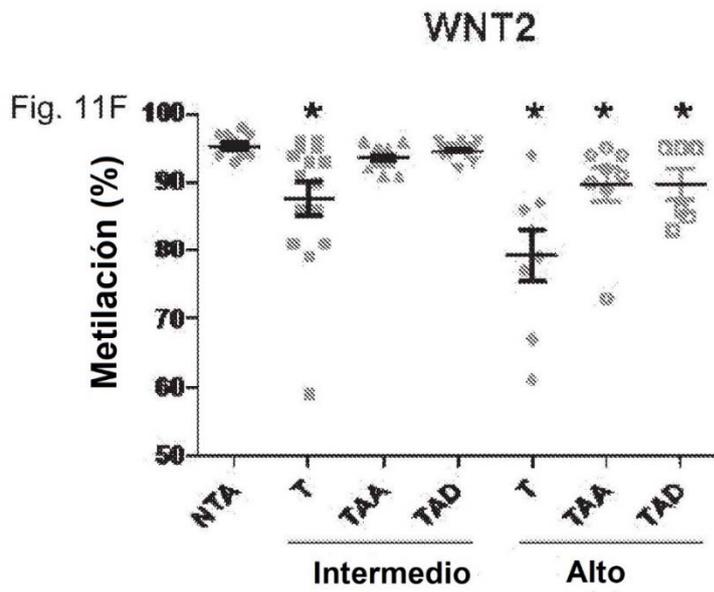
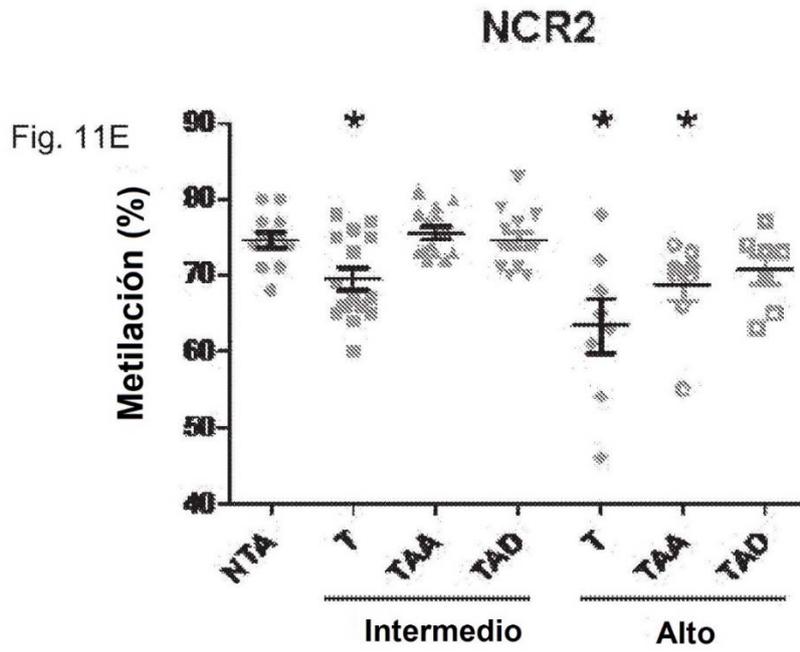


Fig. 11 E y F

CAV1	F-GGGTAATATTTATAAGTTTAATAATAAGGT (SEQ ID NO:43) R-biotin-TAAAACTATCCCAACCCTTC (SEQ ID NO:44) Seq-AAGTTTAATAATAAGGTTATGGTAG (SEQ ID NO:45)
EVX1	F-GGAGGAGAGGAAGTTAGGAGTTTATAAAGGA (SEQ ID NO:46) R-biotin-CAAATACAACCCAAAACCAAAAACAAT (SEQ ID NO:47) Seq-GAAGTTACGAGTTTATAAAGGAT (SEQ ID NO:48)
FGF1	F-GGATGGGATAGTGAAGATAAGAGT (SEQ ID NO:49) R-biotin-TTCAACATACTATCATCTAATCCTTTACAC (SEQ ID NO:50) Seq-TTTTTTTAAGGTTATGTGATAA (SEQ ID NO:51)
MCF2L	F-biotin-GAGTTGAGTTTTATTTGGGTATTTTGAAG (SEQ ID NO:52) R-ACCCCCAAATTACTAAACTAATATATTCC (SEQ ID NO:53) Seq-CAAATTACTAAACTAATATATTCCA (SEQ ID NO:54)
NCR2	F-biotin-GTTGTGGGAGAGTAAGGTTTGGAAATAA (SEQ ID NO:55) R-CTCATCTCCACCCCTTCATTTT (SEQ ID NO:56) Seq-CCCCCTTCATTTTCT (SEQ ID NO:57)
WNT2	F-TTTTGGAGGTATAGGGTAGGAAATAA (SEQ ID NO:58) R-biotin-AATTCAAATCATCAAACCCAAA (SEQ ID NO:59) Seq-AGGAAATAATTTTTAATTGAATA (SEQ ID NO:60)

Fig. 12

AMACR

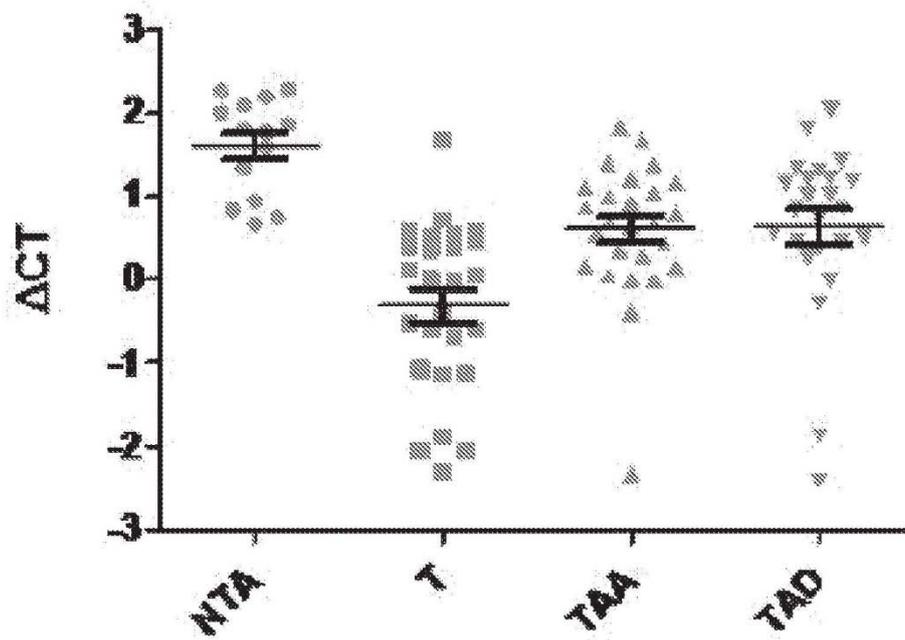


Fig. 13

Promotor CAV1 (SEQ ID NO:61)

catgtgtttt aaggcagaga tggaaacttgg gcgatgggcg gggggtgggg
gaggtgggaa gggacggctt aggacagggc aggattgtgg attgtttctg
ccgccttggg tgcccatact gggcatctct gcaggecgt cggtccctc
caccctgct gagatgatgc actgcgaaaa cattcgtct ccccgggacg

Fig. 14

Promotor EVX1

Isla 1 (SEQ ID NO:62)

agctgccaag gcagaagggg gaagcgggtc ccagaaccac ccacctcgg ctgtcccac
 cgcgaggacc cagcagtctg gcgccccac cacggcctgg aagatgacgg agggcccaag
 actaatattc acgacagcca gaccacgctt attgtttaga aggaagctcc ctttgttctt
 actttttaac caaagagaag cgaaaacatt ttttctga tcacatttc accgacacct
 gagccgacaa gccagctcct ggccccggc tcaggactcc tcgctctctc cttctcggg
 gccctgtcgc cgttgaaagg cccgctgcag gctggggagg gtgatcgggg ccgcgggcca
 tctccccga gccgggggg cagactgogg aggcaggccc cacacgcgcc gcttttcga
 gcccggtttt cttoaggagc gaagctgttc cagctgacc gcgctctgg gggcctatgc
 cggcttccg attccattta aaacgaccg cgcatttat ctccgtcgc tccccgggt
 tcccaccac cccctcgg ccggggccag gccagcccag cccggcgga agccaagctg
 ggagcttttg aagtccggag aatttcaatc cgagaggagc cggctggacc ggagccctc
 gcccagcgg gggaagggac gggggcctg ccgtgtggca ggtgggggat ggggtgccc
 cgccgcgaga aatgagaagc cgccggcct ggagcggcct ccacctcagc tgctatcacc
 cctctcgc tgctatggga tt

Isla 2 (SEQ ID NO:63)

tttttgt cttcttctt ttaaaaacc aaccgctctt aatgtgagg tgatgaaagg
 atgcttttg aagaagtac atttggtaa aacgtttcc cctaatacgc cgggtggaaa
 gggcggggg tgggtgtgtt tcctaggct cctaagactg gccagtcagc tttgaaagag
 cggggcagaa gtccggagag gg

Fig. 15

Promotor EVX1

Isla 3 (SEQ ID NO:64)

cttatgagtc aaacctctat gaacccaac cttttgtac tcggggaggc tgaaccctg
ccaaaatag cgcggtgaaa gctactgcct totoccaagt aggggcctcc agtaactgcca
cagcaggggc cgcattcctg ggcctcttc attogaaaa cctctttcca ggagacttcg
ctgattctga acgaatactt

Fig. 15 (Continuación)

Promotor MCF2L

Isla 1 (SEQ ID NO:65)

actataagg gggagtactg cgtcaccttc atctttttat ccttttgcc ttgctccgtg
 cctgaaagct caccacactg gaacgtccag gtgcacatgt gccactggac accgggatgt
 tgccggatgc tcttttgac gctggaatgc tgggtcattg ttgccggatg ctggaatggt
 gcacgcacgc tctgttgac gctggaatgc tgggtcattg ttgccggatg ctggaatggt
 gcacgcacgc cctgttgac tctggaatgc tgggtcattg ttgccaaatg ccggaatggt
 acacggatgc tctgttgac gctggaatgc tgggtcattg ttgccggatg ctggaatggt
 gcacgcacgc tctgttgac gctggaatgc tgggcacatg g

Isla 2 (SEQ ID NO:66)

a accacaaaag gatagctgcg gttttgggcg aggagagctc agagagtctc ttgcatatgg
 cctgtgatg gcggccatgg cctgcatag acacgagctg gaatctgcag gtggcagcca
 ggaocgtgcg tgtgtcgagt gcacagtgtg gcttgggtcc aacctggcg agggtgaga
 gcccgtgcc tgcagcgcgc gcttccctca ctgggtcctg cgtccttggg caggcgatgc
 cctgcggggg aggggctggt ccctccccg ccagccacgg acccaocgat ggaocacgg
 acccaocggac ctgcttacct gggcgcgcg cggtggcat gcggccacac ggaagggggg
 cgctgggctg ctgcggcctc tgcagcttct acacctgcca cggggcgcc ggaggtaaag
 ggaggcgcg gccaggcgcg gcccgcgga ggcagctgca ctcgctoggt cactcgcgg
 ctgcgggct gcccgcaaac caggaggcg tggagaccog gaaccggggg gaagggcggg
 ggcacttgtg cggcaccgc ggggtccca ggggacctg gcggtgacac gaatttctag
 gtgaccttg cggtgacacg aatttctagg tgacctgtg gatacactag gtgacctagt
 gacacagggtg acacttccag gtgaccgcgg cggtgaccog cgggctccc aggtgacctc
 gttggtgagc ccgggggctc ccgacgacc gcggcggtga cacgcggggc tcccagggtg
 cccggcggt gcactcacag gactcccagg tgaccgcgg tggtagaca ccggggcggg
 cgcgcgcgc ttcgcttc gcgagcgc cccccccc ccggcgca gcgcgcgc
 cctccccgt ggcgggaac caatcctgg cagggagcg gcgctggag gctgaaagcg
 ctgcgtgcc cccctcccc cctcgcgc gccctcc

Fig. 16

FGF1

Isla 1 (SEQ ID NO:67)

gcttc tctgtgctt gctcatatt ctgggttctc tccagagctc gcgccactg
cctgccagtc agcagatgga tgactctggt cacctcagcc gcgacacgcc ccacagcgag
tgcagcagtc gtctgccag atgggctgct cctggetgog tccattctct cagtaaatag
cctctccatt catctctccg gtccctctat gcccg

Isla 2 (SEQ ID NO:68)

a gccgtctctg tcattctccc tttctctctc cccatcagcc tgcgagggac taaaagccgg
cgatttttcc ttgtgttatt ttttctttt ttttttttt tttttgagac ggagtctcgc
tctgtcccc aggctggagt gcagtggccc gatctcagct cactgcaagc tcgcctccc
aggttcacac ctttctctctg cctcagcctc ccaagtagct gggactacag ggcgcccca
ccgcgccag ctaattttt gtatttttag tagagacggg gtttcaccga gttagccagg
atggtctcga tctctgacc tcatgaccg cccacctcg cctcccaaag tgctgggatt
acaggcgtga gccacgcgc ccggcctgtt ttttctctt ttttcttgag accgagtctc
gctctgttgc ccaggctgga gtacagtggc atgatctcag ctcaactgaa cctctgtctc
ccaggttcaa gcaattctcc tgctcagcc ttccgagtag ctgggactaa aggctcccgt
caccaccgtt gccagctaa ttttt

Isla 3 (SEQ ID NO:69)

gattattt tggaatagca cagggttttg ttttttttc gttttttggt tttcttgag
acggagtttc gctgttgttg ctccagctgg agtgcaatgc cacaatctca
gtcatcaca acctccgct ccgggttca agcgattctc ctgcctcagc
ctctgagta gctgggatta caggcatgog ccaccatgoc cg

Fig. 17

Isla 4 (SEQ ID NO:70)

cct ccttcacggg tattccacat tgcttacaca gtgacagga ttaaaaacaa aactaaaggc
tgggcgtggg ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg aggetgaggc ggggtggatca
cgaggtcagg agatcgagac catcttggct aacacgggga aacccgtct ctactaaaa
tacaaaaaat tagccgggcg cgggtggcagg cgctgtagt cccagctact caggaggetg
aggcaggaga atggcgtgaa cctgggaggc ggagcttgca gtgagccgag attgtgocac
tgcaatccgg cctgggctaa agagcgggac tccgtct

Isla 5 (SEQ ID NO:71)

a tgtattgatg atcacattca ctactcacac ttacaaagta cagctcccag gccgggcgcg
gtggcttacg cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag gcaggcggat cacgaggtoa
tgagttcaag accagcctgg ccaacatggt gaaacccat ctctactaaa aatataaaaa
ttagcctggt gtggtggcg

Fig. 17 (Continuación)

NCR2

Isla 1 (SEQ ID NO:72, localizada entre los exones dos y tres)

gtt gtgaacttgt gtttttccgt tttatatgta tatgccactt gtttttttgt tttgttttat
ttcgtttttga ggcggagtct cgcctctgtct ggagtgoagt ggtgcaatct cggctcaactg
caacctccac ctccagggtt caagcgattc tcttgccctca gcctccggtg tagctgggac
tacaggcgcc tgccacc

Isla 2 (SEQ ID NO:73, localizada entre los exones dos y tres)

aag tagctgggat tacaggcgcc tgctaccacg cctggctaatt tttttgtatt ttagtagaga
cgtggctctca ccattgttgc caggctggtc tcaaaactct gacctcaagt gatccacctg
cctcggcctc caaaactgcc gggattacag gcgtgagcca ccaagccttg ccgctaacaa
gtaattttaa agtatca

Isla 3 (SEQ ID NO:74, localizada entre los exones cuatro y cinco)

tttaacttt tgaacttttc cgaagctttc catattttct atgtcctcca agtgccactc
atatotttta ttttctcctt tcattgacct ctgtttttct tcagagcttt ctggaaacct
ttgcogcttc tcggccacc ccttgcttag aagcccatg cgggcccggg ggtgctgtgg
gctccaggcg gattggggcg g

Isla 4 (SEQ ID NO:75, localizada entre los exones cuatro y cinco)

ccagaatcc caactcagta agaccttgta aatccatgac attagcccca attccactc
gtcccaaatc ccataacctt tccaccctgc acctgaagtg cgcagtcactc agcacaagct
cctgtatgct cagcttctct gaacgtcacc gcggtactct cctgacactc tgctgtttct
ccgaggacaa tgctttctcc g

Fig. 18

Promotor WNT2

Isla 1 (SEQ ID NO:76)

gc caaccacctt ttctttccta agtgtctgga ttacttcaa gaaaatgcg gacaaagaag
 ggtggaggta agctttogtt tattcccctg cttcacgggg gaaggagggt tgtgagcata
 agcatgtaag tacatgagag gcggtgtgct ctttgggtgc taccataccc tccccatggc
 cggcgtgcac acacggcgag cagaaacgct cccccgcccc gctgectgcc gccccacgcg
 cctcccctgc acctcccgcc cgaccgacgc agaccaagca gaacttccct gggtcgcggc
 ccagcgatac ggagcggccc tggcgaggag cctgctctt cccgagtcgt ggggtggcgcg
 gtgcttgttt cctcccctc cctttccgga cccaaacggg gatgtatctg ggtcagcctg
 ggagggggccg gacctgccag ggaccagcgt gggggaaggg ggtggcgatg acagcatctt
 tcaggttttt ggcgtctctg agcttcgctt cgtccagcct ctcaccgcgc tcgctgccgg
 cgagggtga cgtctggcc agtccaggcc cgagggtggg ctggagagag ggagagcccg
 tccttcgat ctgggcggca cccctcccc caccgctgc gaacaattcg cctcccacac
 atacacacag ggcatactc tattcccag agcacgctcc tcgggcgggc agtgagtccc
 tccgccccag gaaaagagca atggaacagt tcacggccgc caccagttcc tggctcttct
 tcctttccgg tgataaacgg cgcggctaca agccagctac tgctcaaat gctccaccgg
 cgggcccag cccctctctc ttggctgggc gggggcccag gtcaggacc gagggtccct
 taacctcac aaggcgaca ggctgagcgc ccaggcggca ggaggtgcaa gggcgcacac
 ccccgcgaa cgctggctg cctcggttc tctctatgtg

Fig. 19

Isla 2 (SEQ ID NO:77)

ataga cgcggcagct ccaaatttac aagtgctagc ttttcatccc agcttcaggg agagaagcga
agcaatgagt tgagaatcat ctctggattc ttgtatcca tgcatagtaa tctcattatc
ccctggcccc ctctctggtt tcttcacatt gcacgctcag ggacttggtt gccagoggat
ggcctcggca atccggaacg cacgctccga gagccccagg atgctotttg gcttgagct
tcctaaagg ttctgtatt cgcgtgtgct cgtaaccatg cagcagatgt ccccttccc
cgctcacct catccccaga catctcttgc catcatttca tgcaccctg tctaaaacc
cgcgtttctc cccacccccg ccaggcgcag caccc

Fig. 19 (Continuación)

EXT1 (exostosin glicosiltransferasa), Cr8

SEQ ID NO:18

catctttttg agtattgttt attgtaatgt aagaaccagt catgcctggg
 gtacactcaa gctggatcct tgccataagg gcaggctggg gtgaatggtg
 gtacactcct ggtaaagtgt acatgataag aaatatatat ttgggccagg
 cacattgtcc tgcacctgta atcacagaac ttggggaggc taaggcaggc
 aaattgcttc aggccaggag ttagagacca gcctggccaa catggtgaaa
 acctcctctc aactaaaaat acgaagatta gctgggcgtg gtggctcctg
 cccgtagtcc cagctactcg ggagggtgag gcatgagaat cgcttgaacc
 cgggagggtg aggttgcagt gagctgagat cacaccactg ctttccagcc
 tgggcaacag agtgagactc tgtctcaaaa atttggtctc tgcccctga
 cacccaactg ctaaaacocct tgtaatttcc tgagtgatag aggtgataag
 aatgtcttcc acagaattcc caaatccctt ggaatttccct gggtgataaa
 ccttttgctc taatgagggtg attccttagtg ggttcctgga tagcttcaaa
 gtggtgatgt catcagaaaag actaaactgt cattagaagc ttggaacttc
 taaccacccc taccocctatt ctccagggag gagagagggg ctggaaattg
 ttttaattatc tatcatgcct atgtgatgaa accccctcaa aatttctaaa
 ctatgagggtt tggagagcct ccagggtgat aaccatatcc acatgccggg
 aggatggtgc accccgactc catggggata gaagcctctg tgtttgggac
 ttttctggac atcacacagt gtacctcttc atctggctgt tcatgtgtat
 ccattatgtc ctttttaata aatcagtaat agtaagctgt tttcttgagt
 tctgtgacct cttctagcaa acgattgaac ttgaggaggg agtcatgaga
 tcccctgact tgtaggcagt tggtgagaag tataggagac ccagacttgt
 gattggcatt tgaagtgagg gataatcttg tggctctgag ccctaacct
 gtggtgtctg cattaactct gggtaattac tgtcagaatt gaattcaatc
 attagatatc aagtaggttt ccaggaagtt ggagaacttg ttggtggtgt
 gaggggaaga aaccataag tttggtgtca gagcattgcc agtagagaaa
 caggtcccc ccacatatga gttggatggt gttatgctct tggtagggca
 tttgttttga

Fig. 20

SPAG4 (antígeno asociado a espermatozoides 4), Cr20

SEQ ID NO:39

tctcccga ccttggatct gaggcaggag atgcctcccc cgcgggtggt
caagagcttt ctgagtacgg gccaggccag ctgcgatccc ctctgaccct
cgggttcccc tctccgaact ccagttctct ctgagcccc ggcccccggt
tgagtatcga gcccctctcc gagcctcaac tcattcctag cccccatcca
attatcctag ccgaccctct ctctctgagc cccaggccca cccccggccc
ctcccaagcc ccttctgaac ccggacacca cgcaggctga gccccgcctc
tccttgccgt gggcccctct ctgaccctct gtcttggcct caggcctgct
cttcagggg ctgagcgtgt tgttatccct ggcaggagac gtgctggtca
gcatgtacag gtcagaggaa gggacgctgg cgcgccagga acagctcttt
ggagggggtg gggagcaggg ccggaacctt gctggcgctt gagccgattc
agatctgatt gagtcatggt ggcaagagct gggcttagga cctgggggtg
gggactggag ggttgagcag gtcggggcct cagcctccct ccggttcccc
agggaggtct gttccatccg ctctctgttc acggctgtgt cgctgctgag
cctctttctg tcaggtgagg ggcagtgaat tcctgggagc ccttgcctg
ggtgctttgg aggcaaacce agcacatttt ctctacatc ctcggtcctg
cagctcctgg cattcccctg cagaaccccc taattcccc tcagactccc
acggtcctcc ccaggcttaa ccccctcaag cctctttcca ctgtccccct
atgccgggga aaccattct ctctcttttc cttctgagac ccctccctct
ctttctccag cattctgggt ggggcttctg tacctggctt ctcttttggg
gaatgtgagt tggggagact gtcttggggg aggggggttg caggttgtga
accggagat tgtgggggtc cctggactg tcggctctgct ggggtggggg
ta

Fig. 21

Secuencias de sonda para la matriz de metilación

EXT1:

CHR08FS119036611 119036611 119036660
CACCATCCTCCCGGCATGTGGATATGGTTATCAACCTGGAGGCTCTCCAA
(SEQ ID NO:86)

SPAG4:

CHR20FS033669015 33669015 33669064
ATCTGATTGAGTCATGTTGGCAAGAGCTGGGTCTAGGACCCTGGGGTGGG
(SEQ ID NO:87)

Fig. 22

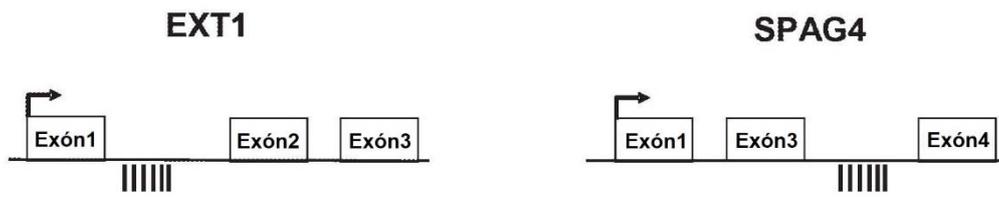


Fig. 23

Fig. 24A

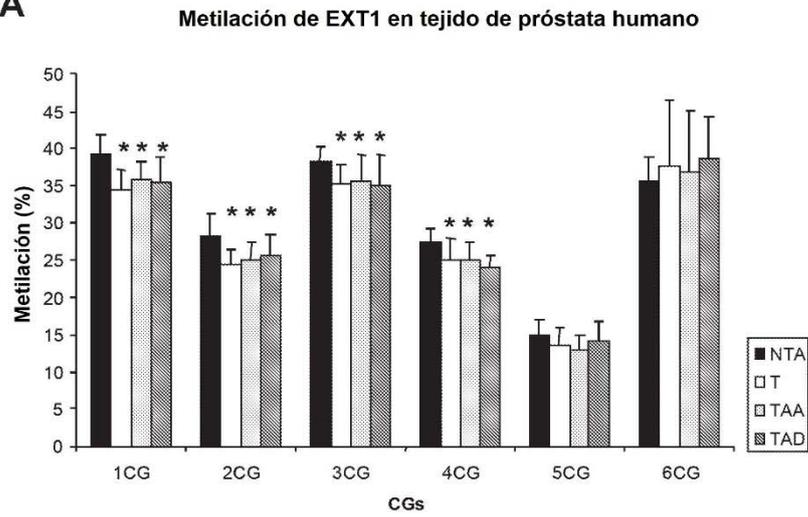


Fig. 24B

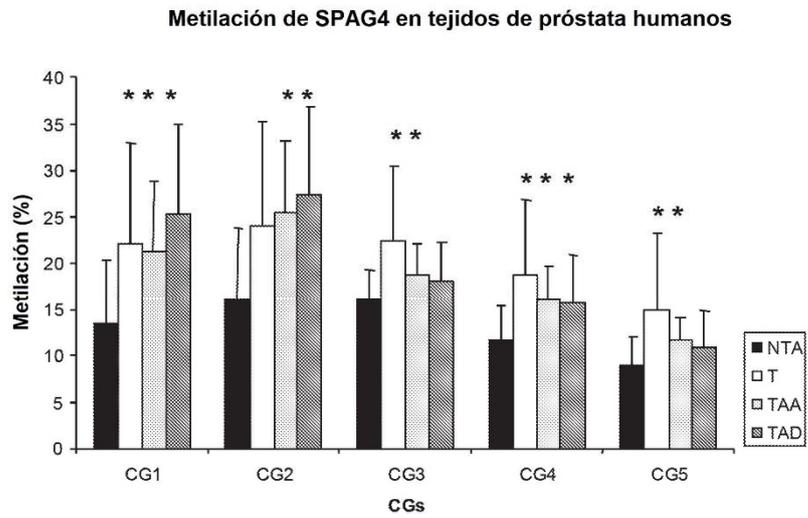


Fig. 24 A y B

EXT1	F-TAGGAGTTAGAGATTAGTTTGGTTAATATG (SEQ ID NO:88) R-biotin-CCAAATTTTTAAAACAAAATCTCACTCTAT (SEQ ID NO:89) Seq-CAACTCACTACAACCTCCA (SEQ ID NO:90)
SPAG4	F-GGTAGGAGAAGTGTTGGTTAGTATGT (SEQ ID NO:91) R-biotin-CCTAAACCCAACCTTACCA (SEQ ID NO:92) Seq- TTAGTATGTATAGGTTAGAGGAAG (SEQ ID NO:93)

Fig. 25

EXT1

Isl1 (SEQ ID NO:94), 458pb

```
CGTCCTCCCCGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGCAGCGCTTCGCAGGCCCCC  
GCGCGAACGCTGCCGACCGCCGCTTCGGTCGCCGAATGTTACCCGGTTC  
TGAATGTTACACTTACACATTCCATTCCCGACACGACAGCGCTGACCTCA  
TCCATCCACGCAGCCCGCGCTGCCATTGGCCGAGCGTCACGTCCGGGGGG  
GGCGGTGCTTCCGCTGCGCCCATTCATAACCCCCGCGCGGGCCGAGGC  
GCCGGCGCGGGCGTTGGGGGCGTAGGGGGCGCAGGGAGCCGGGGCTCCCGG  
GTTGCAAGCTGCCGGCGGGCTGCCGGGCAGGTGGAGCGCGGGACGGCCCG  
GTGCGAGCCCCGCGGCCCTCGGCGCGCCAGGCCCGGATCTCGGCCTGC  
GCCGTGCCGGGGACCAGAGGCGCTGCGGAAACGCGGCGGCCGGGAAGG  
AGGCACCG
```

Fig. 26

SPAG4

Isla 1 (SEQ ID NO:95), 2190 pb

GAGGTCAGGAGTTTCACGACCAGCCTGGCCAACATGGTAAAACCCCGTCTC
TACAAAAATACAAAAATTAGCCAGGCATGATGGCGGGTGTCTGTAATCCC
AACTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCGGA
GGTTGCAC TGAGCCGAGATTGCACTACTGCCCTCCAGCCTGGGCGACACA
GCAGGACTCTGTCTCAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATGCTGG
GCGCAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTAGGAGGCCGGGGCGGG
TGGATCACCTGAGATCGGGAGTTCAAGACCAGCCTGACTAACATGGAGAA
ACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCAGGCATGGTGGTGCATGT
CTGTAATCCCAGCCACTCAGGAGGCTGAGGCGGGAGAATCGCTTGAACCC
GGGAGGCGGAGGTTGCAGTGGACCAAGATCGCGCCATTGCACTCCAGCCT
GGGCAACAGAATGAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAG
AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA
AGAAAAAACTGTTATAGACTGAGTGCCATTTTAGATGGGGTTTTCTGGG
AAGTGCTGTGACATCATCGCTTGCTGTAAGAGAGGCCGGGGCGCGGTGGCT
GACGCCGTACTCCCAGCGCTTTGGGAGGCCGAGGCGGGAGGATCGCTTG
AGCCTAGGAGTTCGAAGTTACAATGAGCTATGATCAGGCCACTGCACTCC
AGCCTGGGCAATGAGAAAGACCCTGTCTCTTAACAACAACAAGTCAAG
AGGAGAGGCTGCCATGGCTACGGCTCCAGGTGACGTACGGCCAGCTCCG
TGACGCGCGGCCAGGGCAGCCCGCGGAGACCAGGCTCCTCTGTGACTC
AGCAGCCGGCCGGGACACAGCGGGAGGGCAGGTGCGGGCCGGGGCCTGC
CGACTTCACGCAGGGTCCGTGGGGTCCCCGCGGCGCGCAGCGGCTGAAGG
AGGCCCCAGGGCCTTGGCGACCGCAGCGGCGGCTTTAGCGTCAGTACTA
GGCAGCAGGGGGTCAAGATGCGGCGAAGCTCCCCCGGGGCTCGGCCTCG
TCCTCGCGCAAGCACAGCCCAACTTTTTTCAGCGAGAACAGCTCAATGAG
CATCACCTCGGAGGACAGCAAAGGGCTCCGGTCAGCGGAGCCCGGGCCTG
GGGAGCCCGAGGGCAGAAGAGCCCGGGGCCGAGCTGCGGTGAGCCCGCC
TTGAGCGCGGGAGTGCCCGGAGGAACACATGGGCAGGAAGCTCTCAGCA
GAAGCCAGCGCCTCGGAGCCACAAC TGGCAGACAGCCTGTGGCGCGGCAA
CCGTGAGGGGCGGGGCTCGGGTGCGGGCGGGTGCACCCCGGGTGAGCC
AGTGGAGGGGGCGGGGCTAAAGGGCGGTGCTGGGCGGGGACGGGGCTAA
GATGATATCTGGGCACCTCCTACAAGGTGGGTCTGTAGGGTAAAGGGAT
GGTGCTAAATGAGATCCC'TAAGGGGCGGAGCCTCGGTGTCTTGACGGT
TATGGGAAGGGGCGGGGAAAATCTTGTGGTTGGGTGCCACTGAGGGGGCG
CGGCCTCAATGTTAGCGTGAGTGGCTCCCAGGACAATGGGTTCCACCAA
GATCTAAGGCTGGGGGCGGGTCAATCCGTTTGGGGGAGGGACCAACTCTTT
TTTTTTTTTTTTTGCAACGGAGTTTCGCTCCTGTTGCCCATGCCATGCAA
TGGCATGATCTCGGCTCACCGCAACCTCCGCCTCCCGGGTTCAAACGATT
CTCCCCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGTGCGCCACCAT
GCCCCGCCAATTTTTGTGTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTTCTCCGTGTTAA
TCAGGCTGGCCTCGAACTCCCAGCCTCAGGTGATCCGCCCCGCTCGGCCT
CCCAAATCGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGCCCGGCCAGGAGAC
CAACTCTTGACGGAGCCTCCCTGAGGGGCGGGGCTTCAAGGGGCGGAGCT
GGAGCCGGGATAGGGCTGCGGTGGGACCAAAGCCTGTGAGAGACTTCCCA
GCTGTCTGGCTTGTGGACTGAGCAATCTGCGGCCCGGTCT

Fig. 27

SPAG4

Isla 2 (SEQ ID NO:96), 282pb

CGGCCCGGTCTCGAGGGGAAAAATAGGTCTGTGGTCCGCAAGGCCCCAGTG
GAGCCCTTGGGTTCCCGCAGAACCGACTGGGTCTCCAGTAGTCTCTGAGG
AGCCGCTCGACCTTCTCCCGACCCCTGGATCTGAGGCAGGAGATGCC'TCCC
CCGCGGGTGTTC AAGAGCTTCTGAGTACGGGCCAGGCCAGCTGCGATCC
CCTCTGACCCTCGGGTTCCTCTCCGAACTCCAGTTCTCTCTGAGCCCC
CGGCCCCCGTTTGAGTATCGAGCCCCCTCTCCG

Isla 3 (SEQ ID NO:97), 234pb

CGGCAGCAGTCGCTCTGTCCGACGGTTCGGATGGTCCCTCCGCCCGCCTG
CAGCCCCACGTGTTCCCTGGGAATTGCTGGGCTTTTGAAGGCGACCAAGG
CCAGGTGGTGTATCCAAC'TGCCGGGCCGAGTGCAGCTGAGCGACATCACTC
TGCAGCATCCACCGCCAGCGTGGAGCACACCGGAGGAGCCAACAGCGCC
CCCCGCGATTTGCGGGTCTTTGTGAGTGCGGACG

Fig. 27 (continuación)

Fig. 28A

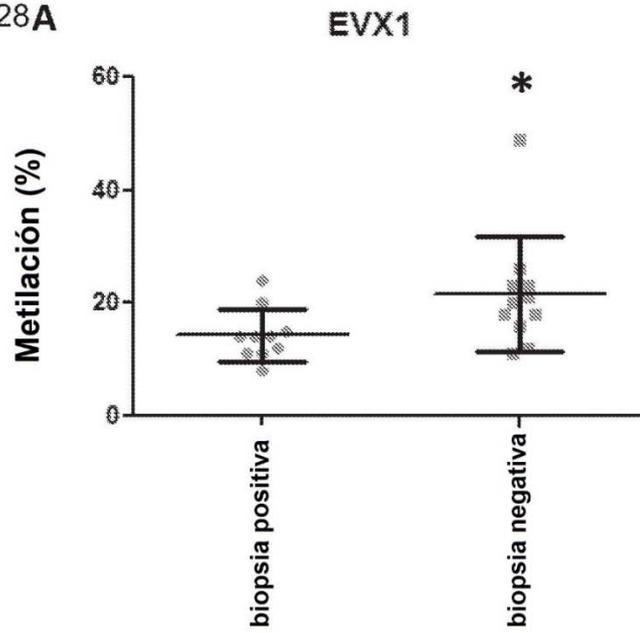


Fig. 28B

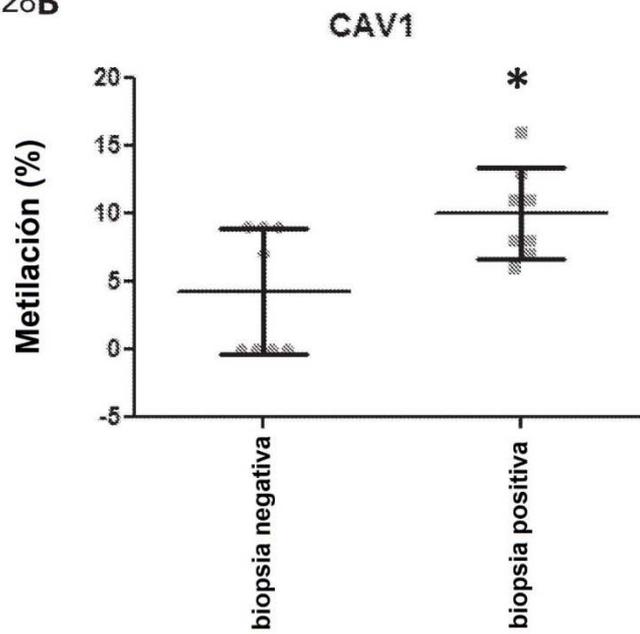


Fig. 28 A y B

Fig. 28C

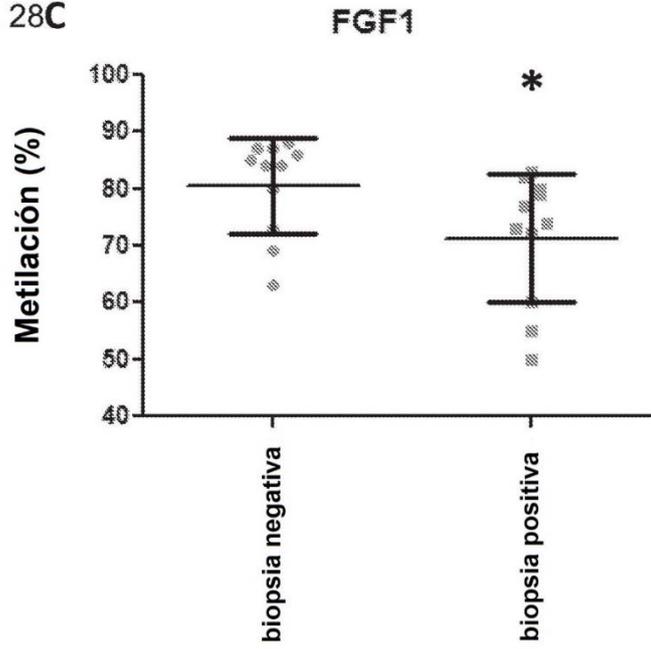


Fig. 28D

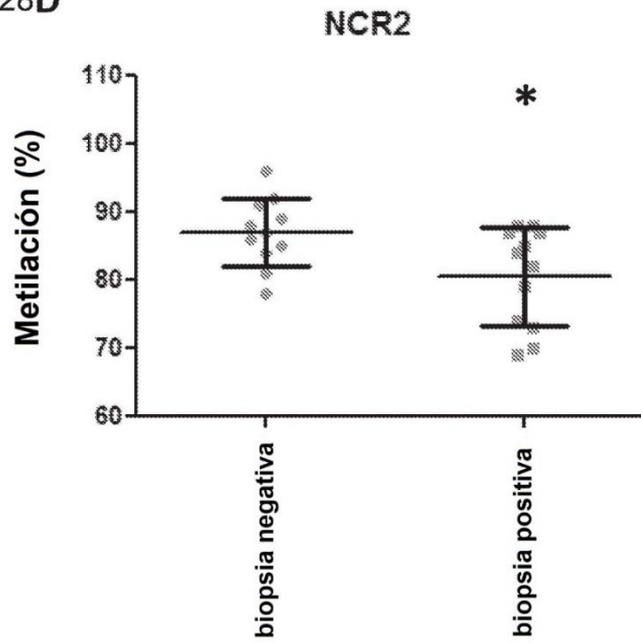


Fig. 28 C y D

Aislamiento de ADN a partir de biopsias de próstata incluidas en parafina

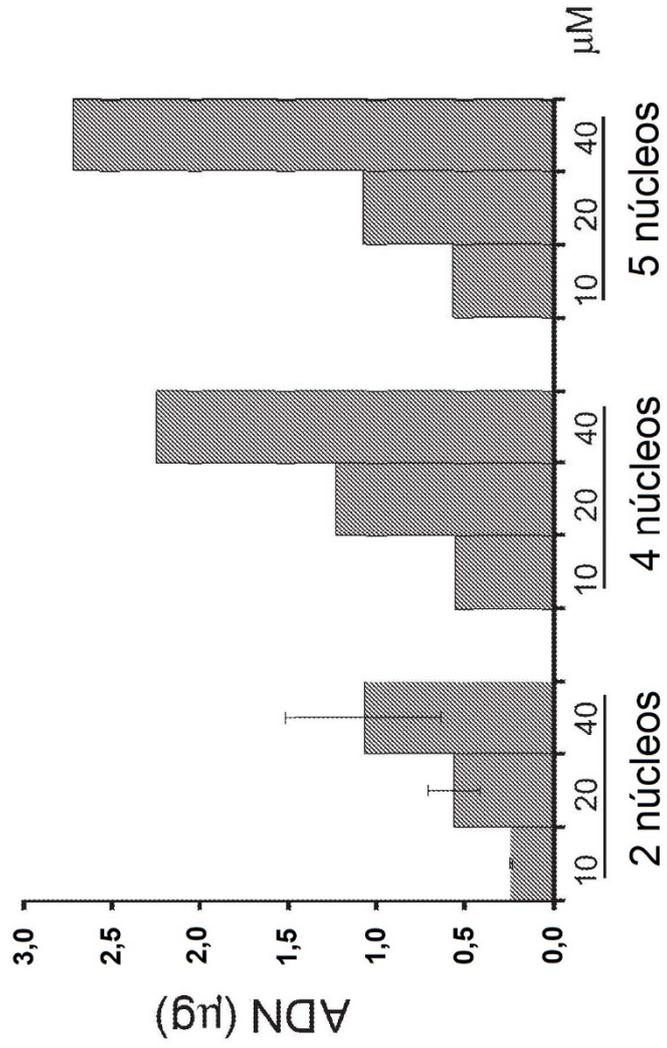


Fig. 29