



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 784**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07788578 .8**  
96 Fecha de presentación : **05.06.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2138848**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer vesical.**

30 Prioridad: **20.03.2007 ES 200700727**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2011**

73 Titular/es: **FINA BIOTECH, S.L.U.**  
**Camino de las Huertas, nº 2 - Edificio 1**  
**28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Alcaraz Asensio, Antonio;**  
**Mengual Brichs, Lourdes;**  
**Burset Albareda, Moises;**  
**Ribal Caparrós, María José y**  
**Ars Criach, Elisabet**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 784 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

Procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer vesical.

5 **Campo de la invención**

El campo de aplicación de la presente invención está dentro del sector sanitario, principalmente en los campos de la “Urología Oncológica” y “Biología Molecular”. En concreto, la presente invención está dirigida a procedimientos de diagnóstico y pronóstico del cáncer vesical.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de vejiga, o cáncer vesical, es el segundo tumor más frecuente del tracto genitourinario, después del cáncer de próstata [Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. *Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin* 2002; 52:23-47]. En un contexto global representa aproximadamente el 3 y el 1%, en hombres y mujeres respectivamente, de todas las muertes por cáncer. En valores absolutos, esto significa que aproximadamente 95.000 hombres y unas 35.000 mujeres mueren cada año debido a esta patología. La proporción entre incidencia y muerte es distinta dependiendo del grado de desarrollo de cada país. Como ejemplos extremos, se podría mencionar que en la zona de América del norte esta proporción se encontraría próxima a 0,2, mientras que en las regiones subsaharianas aumentaría hasta 0,6 [Edwards BK, Brown ML, Wingo PA et al. *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1407-27; Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. *Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int J Cancer* 1999; 83:18-29].

A diferencia de otros tumores, por el momento no se han detectado prácticamente factores genéticos familiares de predisposición. En cambio, se han detectado diversos factores ambientales fuertemente relacionados con los tumores de vejiga. Uno de los factores más importantes, no solo por su relación con la enfermedad sino también por su incidencia en la población, es el tabaquismo. Se ha observado que los fumadores tienen un riesgo tres veces superior a los no fumadores de desarrollar un tumor de vejiga. De hecho, un tercio de los tumores de vejiga se encuentran asociados al consumo de tabaco. Desgraciadamente, los agentes carcinógenos presentes en el tabaco aún no han sido claramente identificados [Burch JD, Rohan TE, Howe GR et al. *Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. Int J Cancer* 1989; 44:622-28; Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA. *The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. World J Urol* 2004; 21:392-401].

A nivel celular podemos encontrar distintos tipos de alteraciones en la vejiga. Existen cambios benignos como las hiperplasias epiteliales, las metaplasias uroteliales y los nidos de Von Brunn, entre otras. Las displasias, en cambio, corresponderían a alteraciones más o menos intermedias entre el epitelio normal y el carcinoma. Finalmente, en la vejiga se encuentran distintos tipos de carcinomas uroteliales, que se pueden dividir en adenocarcinomas, tumores escamosos y carcinomas de células transicionales (CCT).

Más del 90% de los tumores de vejiga son CCT. En el momento de su diagnóstico, aproximadamente el 75% son tumores superficiales, el 20% están invadiendo las capas musculares (CCT infiltrantes o invasivos) y un 5% ya son metastáticos. De los casos superficiales, aproximadamente un 20% se curan mediante una única intervención quirúrgica, mientras que entre un 50 y un 70% recurren tras la cirugía una o más veces, pero nunca se transforman en infiltrantes. Entre un 10 y un 30% de estos tumores superficiales se transforman en infiltrantes. Éstos son tumores agresivos, de mal pronóstico, con una mortalidad a los 5 años del 50% y en aquellos casos metastatizados la mortalidad a dos años es del 100% [Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E et al. *Molecular profiling of bladder cancer using cADN microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. Cancer Res* 2002; 62:6973-80; Adshad JM, Kessling AM, Ogdan CW. *Genetic initiation, progression and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: a summary of the structural and transcriptional changes, and the role of developmental genes. Br J Urol* 1998; 82:503-12; Babaian RJ, Johnson DE, Llamas L, Ayala AG. *Metastases from transitional cell carcinoma of urinary bladder. Urology* 1980; 16:142-44].

Las vías genéticas de los CCT superficiales e invasivos, aunque relacionadas, parecen ser bastante distintas. La progresión más habitual en los tumores superficiales parece ser la hiperplasia, la atipia y, finalmente, los CCT papilares de bajo grado. En los tumores invasivos lo más habitual es progresar desde una atipia a una displasia, para luego pasar a un tumor *in situ* (Tis) y terminar en un tumor infiltrante [Knowles MA. *What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. Mol Pathol* 2001; 54:215-21].

Los sistemas de diagnóstico actuales se basan en una combinación de la citología urinaria (a partir de células escamosas en la orina) y de la observación directa de la vejiga mediante cistoscopia. Esta última es, de hecho, la principal técnica diagnóstica y de seguimiento de los tumores. Se realiza vía transuretral, por lo que es una técnica invasiva y bastante molesta para los pacientes. Se creía que la sensibilidad y la especificidad de esta técnica eran bastante elevadas, aunque mejoras en la propia técnica (cistoscopia fluorescente) indican que probablemente no sea así y que parte de la recurrencia observada en los tumores superficiales podría deberse a la falta de resección total de partes no visibles de los mismos [Jones JS. *ADN-based molecular cytology for bladder cancer surveillance. Urology* 2006; 67:35-45]. La citología urinaria, por su parte, es una técnica diagnóstica no invasiva y con una alta sensibilidad y especificidad para los tumores de alto grado. Sin embargo, esta técnica muestra limitaciones para la detección de tumores de bajo grado [Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP, Murphy WM. *The accuracy of urinary cytology in daily*

practice. *Cancer* 1999; 87:118-28]. Además, la interpretación de la citología depende mucho del observador, con lo que pueden existir diferencias entre observadores, especialmente en los tumores de bajo grado.

Todas estas limitaciones han llevado a la búsqueda de marcadores de cáncer de vejiga no invasivos más fiables. Encontrar un marcador no invasivo con sensibilidad y especificidad elevadas para el CCT de vejiga sería de gran ayuda a la práctica clínica. De hecho, en varios estudios se describen nuevos marcadores tumorales en orina, como el ensayo para el antígeno de tumor de vejiga NMP22 [Wiener HG, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G, Marberger M. *Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer?* *J Urol* 1998; 159:1876-80; Soloway MS, Briggman V, Carpinito GA et al. *Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment.* *J Urol* 1996; 156:363-67], productos de degradación de la fibrina [Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL et al. *A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer.* *J Urol* 1997; 158:801-5.], telomerasa [Takahana Y, Tsuchida T, Fukasawa M, Araki I, Tanabe N, Takeda M. *Real-time quantitative analysis for human telomerase reverse transcriptase mRNA and human telomerase RNA component mRNA expressions as markers for clinicopathologic parameters in urinary bladder cancer.* *Int J Urol* 2006; 13:401-8], ensayos basados en hibridación *in situ* fluorescente [Halling KC, King W, Sokolova IA et al. *A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine.* *J Urol* 2002; 167:2001-6] o citometría de flujo [Takahashi C, Miyagawa I, Kumano S, Oshimura M. *Detection of telomerase activity in prostate cancer by needle biopsy.* *Eur Urol* 1997; 32:494-98; Trott PA, Edwards L. *Comparison of bladder washings and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer.* *J Urol* 1973; 110:664-66], pero aunque la mayoría de ellos tienen una mayor sensibilidad que la citología urinaria, ésta sigue siendo la más específica [Bassi P, De M, V, De Lisa A et al. *Non-invasive diagnostic tests for bladder cancer: a review of the literature.* *Urol Int* 2005; 75:193-200].

Se sabe que en los tumores uroteliales se encuentran muchas alteraciones genéticas y muy variadas, por ello, la tendencia actual es la búsqueda de marcadores genéticos (ya sea a nivel de ADN, ARN o proteínas) que puedan indicar la presencia de carcinomas en la muestra analizada. Además, sería muy interesante poder discriminar con estos mismos marcadores la agresividad del tumor que presenta un paciente, ya que esto podría permitir un tratamiento mucho más personalizado y efectivo. Finalmente, algunos de estos marcadores podrían ser posibles dianas terapéuticas para desarrollar nuevos fármacos para combatir el cáncer.

Hasta hace poco tiempo, la capacidad de análisis de los patrones de expresión génica se encontraba limitada a pocos genes por experimento. Nuevas tecnologías, como los microarrays de ADN, han cambiado completamente el panorama. Actualmente, se pueden analizar miles de genes en un único ensayo [Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. *Expression profiling using cADN microarrays.* *Nat Genet* 1999; 21:10-14; Granjeaud S, Bertucci F, Jordan BR. *Expression profiling: ADN arrays in many guises.* *Bioessays* 1999; 21:781-90]. Por tanto, han empezado a aparecer en la literatura resultados de expresión masivos de todos los tipos tumorales, entre los que se encuentran los tumores de vejiga [Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E et al. *Molecular profiling of bladder cancer using cADN microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes.* *Cancer Res* 2002; 62:6973-80; Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R et al. *Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:15149-54; Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ et al. *Gene discovery in bladder cancer progression using cADN microarrays.* *Am J Pathol* 2003; 163:505-16; Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. *Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome.* *Am J Pathol* 2003; 162:609-17; Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M et al. *Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays.* *Nat Genet* 2003; 33:90-96], aunque la gran mayoría de resultados no se han hecho públicos en su totalidad. Sin embargo, hasta el momento, los estudios que se han realizado con marcadores específicos de cáncer de vejiga se han centrado en uno o en muy pocos genes [Olsburgh J, Harnden P, Weeks R et al. *Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer.* *J Pathol* 2003; 199:41-49; Fichera E, Liang S, Xu Z, Guo N, Mineo R, Fujita-Yamaguchi Y. *A quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction assay for human IGF-II allows direct comparison of IGF-II mRNA levels in cancerous breast, bladder, and prostate tissues.* *Growth Horm IGF Res* 2000; 10:61-70; Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y. *Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31.* *Oncogene* 1999; 18:157-63].

Dado que la naturaleza de estos tumores es muy heterogénea, parece poco probable poder identificar todos o la gran mayoría de carcinomas con un único marcador. Así, para poder caracterizar la mayoría de los tumores parece imprescindible combinar varios de los mejores marcadores en algún tipo de medida.

Además, aunque el análisis directo de tejido urotelial sea la alternativa más cómoda para desarrollar un procedimiento diagnóstico rutinario, sería de gran interés, como se ha comentado anteriormente, que dicho procedimiento no fuera invasivo, ya que éstos disminuyen la calidad de vida de los pacientes y representan una carga económica para la sanidad mucho mayor.

Los fluidos vesicales (orina o lavado vesical) que están en contacto con todo el epitelio vesical y, por lo tanto, con la masa tumoral, parecen una buena alternativa para la detección de marcadores tumorales, dado que representan una manera fácil y no invasiva de obtención de la muestra a analizar. Así, un gran número de trabajos se ha centrado en el estudio de marcadores tumorales en orina en busca de un procedimiento diagnóstico no invasivo para el CCT de vejiga. De hecho, se han comercializado diferentes ensayos con este objetivo (NMP22, UroVysion, ImmunoCyt, Accu-Dx, etc.).

Una alternativa, que aún no ha sido comercializada, es la detección del CCT de vejiga en muestras de orina mediante la determinación de la expresión génica de marcadores de cáncer vesical. De hecho, hay algunos estudios que sugieren la utilidad de esta metodología, aunque se han realizado con uno o pocos genes marcadores [Parekattil SJ, Fisher HA, Kogan BA. *Neural network using combined urine nuclear matrix protein-22, monocyte chemoattractant protein-1 and urinary intercellular adhesion molecule-1 to detect bladder cancer. J Urol* 2003; 169:917-20; Eissa S, Kenawy G, Swellam M, El Fadle AA, Abd El-Aal AA, El Ahmady O. *Comparison of cytokeratin 20 ARN and angiogenin in voided urine samples as diagnostic tools for bladder carcinoma. Clin Biochem* 2004;37:803-10; Larsson PC, Beheshti B, Sampson HA, Jewett MA, Shipman R. *Allelic deletion fingerprinting of urine cell sediments in bladder cancer. Mol Diagn* 2001; 6:181-88].

En respuesta a estas necesidades, los autores de la invención, tras una importante labor de investigación, han identificado 14 genes marcadores del tumor vesical, a partir de los cuales han desarrollado un procedimiento diagnóstico y pronóstico de cáncer vesical basado en la detección y cuantificación de la expresión génica de estos genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real, en ARN extraído de fluidos vesicales, y su posterior combinación informática mediante un “sistema de alarmas”.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1 (A-J): Electroferogramas obtenidos con el Bioanalyzer Agilent 2100 de las muestras de ARN intacto (LV0) (Figura 1.A) y parcialmente degradado (LV1, LV2, LV3) (figuras 1.B, 1.C, 1.D) de lavado vesical, tumor de vejiga (T0, T1, T2, T3) (figuras 1.E, 1.F, 1.G, 1.H) y combinación de muestras control (C) (figura 1.I) y gel con las bandas de los ARN ribosómicos (28S y 18S) de cada una de las muestras analizadas (figura 1.J). Los números 0, 1, 2 y 3 se asignan a las muestras en orden creciente de degradación y para las muestras con ARN de calidad comparable.

Figura 2: (a) Semi-matriz de comparación entre parejas de arrays de los 100 genes más diferencialmente expresados en cada array. La parte superior e inferior sombreada en gris de la semi-matriz muestra el porcentaje de genes diferencialmente expresados en común entre las parejas de arrays de lavado vesical (LV) y entre las parejas de arrays de tumores (T), hibridados con ARN de diferente grado de degradación. La parte no sombreada de la semi-matriz corresponde al porcentaje de genes expresados diferencialmente en común entre las parejas de arrays de lavado vesical y tumor. (b) Cluster no supervisado de todos los clones contenidos en el microarray, incluyendo los duplicados con intercambio de fluorocromos (*dye swap*) (DS).

Figura 3: Validación mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de 4 genes (KRT20, GSN, IGF2 y CCL2) expresados diferencialmente en los microarrays de ADNc y relacionados con cáncer de vejiga, en 36 muestras adicionales de lavado vesical tumoral. Los valores positivos indican sobre-expresión en los lavados vesicales tumorales respecto a los controles. Las muestras están agrupadas en el gráfico en función del  $\log_2$ ratio según estadio y grado tumoral: tumores superficiales de bajo grado (8 pTa y 3 pT1), tumores superficiales de alto grado (5 pTa, 5 pT1 y 4 pTis) y tumores invasivos (9 pT2 y 2 pT4).

Figura 4: Clasificación de las muestras mediante cluster global no supervisado (distancia euclidiana y UPGMA). pT2\_1, pT2\_2 y pT2\_3 (tumores infiltrantes); pT1 AG\_1, pT1 AG\_2 y pT1 AG\_3 (tumores superficiales de alto grado); pT1 BG\_1, pT1 BG\_2, pT1 BG\_3 (tumores superficiales de bajo grado).

Figura 5: Resultados de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los pools y las muestras individuales contenidos en los mismos. La tabla se encuentra dividida en combinaciones (parte izquierda) y en muestras individuales (derecha). Las columnas de las combinaciones indican el número de combinación (N°), los niveles de expresión observados en los microarrays ( $\mu$ arrays) y los niveles cuantificados mediante qRT-PCR (qRT-PCR). La primera columna de las muestras individuales corresponde a la media aritmética de las expresiones de las muestras individuales contenidas en el *pool* (*media*), las cuales se indican en las columnas siguientes (1-5). Cada fila corresponde a un gen (TCN1, SORBS1, MYH11, SRPX, CRH, KRT14, RRM2, FOSB, CEACAM6, CES1), con los diferentes niveles de expresión para cada combinación.

Figura 6: Clasificación de las 60 muestras individuales de fluidos vesicales mediante un cluster global no supervisado de 384 genes (distancia euclidiana y UPGMA). La nomenclatura de las muestras sigue las siguientes normas: si la muestra empieza con la letra “B”, se refiere a una muestra de fluido vesical tumoral; si empieza por “CB”, se refiere a una muestra de fluido vesical control; si después del número de muestra aparecen las iniciales “RV”, se refiere a una muestra de lavado vesical; si por el contrario aparece la inicial “O”, se refiere a una muestra de orina y después del guión bajo se indica el grado tumoral y el estadio patológico de la muestra tumoral. Las flechas indican una mala clasificación de la muestra que señalan en relación a las categorías establecidas: T\_AG (tumores de alto grado); T\_BG (tumores de bajo grado), y C (controles).

Figura 7 (A y B): Clasificación de las 140 muestras individuales de fluidos vesicales mediante un cluster global no supervisado de 96 genes (distancia euclidiana y UPGMA). Las flechas indican una mala clasificación de la muestra que señalan en relación a las categorías establecidas (C, controles; figura 7.A y T, muestras tumorales; figura 7.B). La nomenclatura de las muestras sigue la siguiente norma: si la muestra empieza con la letra “B”, se refiere a una muestra de fluido vesical tumoral; si empieza por “CB”, se refiere a una muestra de fluido vesical control; si después del número de muestra aparece la inicial “R”, se refiere a una muestra de lavado vesical; si por el contrario aparece la inicial “O”, se refiere a una muestra de orina.

## ES 2 357 784 T3

Figura 8 (A-T): Listado de 384 genes de diagnóstico, pronóstico y controles endógenos para cáncer vesical. Este listado se ha obtenido del análisis mediante microarrays de Affymetrix de combinaciones de muestras de tejido tumoral de vejiga de diferentes estadios y grados tumorales y de muestras de mucosa vesical control.

5      Figura 9 (A-D): Listado de 96 genes de diagnóstico, pronóstico y controles endógenos para cáncer vesical. Este listado se ha obtenido mediante el análisis de 60 muestras de fluidos vesicales en tarjetas microfluídicas que contienen los 384 genes de la figura 8. Se indica el símbolo del gen y el nombre del TaqMan Gene Expression Assay seleccionado para la tarjeta microfluídica TaqMan Low Density Array.

10     Figura 10 (A y B): Listado de 48 genes de diagnóstico, pronóstico y controles endógenos para cáncer vesical. Este listado se ha obtenido mediante el análisis de 140 muestras de fluidos vesicales en tarjetas microfluídicas que contienen los 96 genes de la figura 9. Se indica el símbolo del gen y el nombre del TaqMan Gene Expression Assay seleccionado para la tarjeta microfluídica TaqMan Low Density Array.

### 15    **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* no invasivo de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer vesical basado en la detección y cuantificación en fluidos vesicales de la expresión génica de determinados genes y/o sus combinaciones que actúan como marcadores genéticos de dicha enfermedad.

20     Asimismo, es objeto de la presente invención el empleo de dichos genes como marcadores genéticos de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer vesical.

Finalmente, otro objeto de la invención se refiere a un kit de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical basado en el empleo de dichos genes como marcadores genéticos de la enfermedad.

### **Descripción de la invención**

La presente invención tiene como principal objetivo el desarrollo de un procedimiento *in vitro* no invasivo para diagnosticar y/o pronosticar cáncer vesical basado en la detección y cuantificación de determinados genes que actúan como marcadores genéticos de la enfermedad.

Para la realización del procedimiento se parte de una muestra de fluido vesical obtenida de un sujeto sobre la que se lleva a cabo un análisis para la detección y cuantificación del patrón de expresión de determinados genes y/o sus combinaciones. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales para así establecer el diagnóstico y/o pronóstico.

El término "sujeto" empleado en la presente invención se refiere a un ser humano.

La muestra de fluido vesical obtenida del sujeto puede ser una muestra de orina o de lavado vesical y puede ser obtenida mediante cualquier procedimiento convencional.

En la presente invención, se entiende como procedimiento de diagnóstico de cáncer vesical a aquel que permite detectar y cuantificar genes diferencialmente expresados entre tumores y muestras control (de individuos sanos) (genes de diagnóstico).

El procedimiento de pronóstico se refiere a aquellos que permiten detectar genes diferencialmente expresados en los diferentes tipos de tumores (genes de pronóstico), lo que permite clasificar los tumores según agresividad y personalizar el tratamiento en cada caso.

La clasificación tumoral de los diferentes tipos de carcinomas de células transicionales (CCT) se basa actualmente en la observación macroscópica y microscópica en el laboratorio de anatomía patológica. Mediante unas observaciones más o menos estandarizadas, basadas en la profundidad del tumor y en el aspecto microscópico de las células, se decide su clasificación. Estudios moleculares recientes parecen indicar que en realidad hay dos perfiles genéticos diferenciales que mayoritariamente separan los tumores de tipo superficial y los tumores infiltrantes.

Así, los carcinomas superficiales de vejiga se denominan como Ta, Tis y T1. El carcinoma Ta es un carcinoma exofítico no invasivo o confinado al epitelio. Tis es un carcinoma *in situ* (tumor superficial plano) y T1 es un tumor que invade el tejido conectivo subepitelial o que invade la lámina propia.

En la presente invención se emplea las siglas AG para determinar tumores de Alto Grado y BG para aquellos de Bajo Grado.

Los carcinomas Ta y T1 se pueden extirpar mediante resección transuretral (RTU). Los Tis y T1 de Alto Grado (AG), aunque son carcinomas superficiales confinados a la mucosa, por ser tumores de Alto Grado se ha demostrado con técnicas de biología molecular y por la experiencia clínica, que tienen gran potencial de malignidad y de invasión.

## ES 2 357 784 T3

Por otra parte, los carcinomas infiltrantes de vejiga se clasifican en T2, T3 y T4. Así, T2 se refiere a un tumor que invade la capa muscular vesical. A su vez, este tipo se divide en T2a, que invade la capa muscular superficial o la mitad interna y T2b, que invade la capa muscular profunda o la mitad externa. T3 se refiere a un tumor que invade más allá de la capa muscular o que invade la grasa perivesical. A su vez, este tipo se divide en T3a, de invasión microscópica y T3b, de invasión macroscópica. Finalmente T4 se refiere a un tumor que invade estructuras adyacentes a la vejiga urinaria y que se divide a su vez en T4a, con invasión de la próstata, útero o vagina y T4b, con invasión de la pared pélvica o pared abdominal.

La detección y cuantificación de la expresión génica de los genes se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica de Biología molecular no invasiva adecuada a los fines de la invención, como por ejemplo microarrays de expresión, PCR cuantitativa a tiempo real, transferencia de tipo *northern*, PCR convencional, etc.

Concretamente, el empleo de arrays de ADN permite obtener resultados de expresión de un número de genes muy elevado, permitiendo testar miles de genes en cada experimento. El empleo de esta técnica requiere grandes cantidades de ARN y de buena calidad (no degradado).

De forma preferida, en la presente invención se emplea la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para detectar y cuantificar los genes de diagnóstico y/o pronóstico. Esta técnica es más precisa, además de permitir la utilización de ARN con importante grado de degradación, sin que esto afecte al resultado final. Asimismo, permite cuantificar el ARN específico de los genes de interés. En realizaciones particulares, las sondas de hibridación empleadas son sondas Taqman.

Los resultados obtenidos en la detección y cuantificación de la expresión de los genes en la muestra de fluido vesical, se comparan con los valores normales, de referencia, para dichos genes en muestras procedentes de sujetos sanos. En general, el incremento o la disminución en los niveles de los genes marcadores se estiman mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis de las muestras correspondientes a los sujetos del ensayo con los resultados de las muestras controles, que se analizan en paralelo. La decisión final de clasificación de cada muestra se lleva a cabo mediante un “sistema de alarmas” basado en los valores de expresión de los genes marcadores, de forma que si alguno de los valores observados muestra una desviación muy significativa respecto a lo esperado en una muestra control, aumenta mucho la probabilidad de que la clasificación final sea tumoral, independientemente del gen que haya “dado al alarma”.

De forma más específica, en un aspecto principal de la invención, el método de diagnóstico y/o pronóstico, no invasivo, de cáncer vesical descrito comprende recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación en dicha muestra del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6, TERT, ASAM y MCM10. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

De forma preferida, la muestra de fluido vesical es orina, dado que su obtención es mucho más sencilla. No obstante, el lavado vesical, en ocasiones, se hace de manera rutinaria y se obtiene un ARN de mejor calidad.

El gen ANXA 10 (anexina A10) (también denominado ANX14), localizado en 4q32.3, participa en la regulación de la división celular y en diferentes vías de transducción de señales, pero su función exacta todavía no ha sido determinada.

El gen C14orf78 (marco de lectura abierto 78 del cromosoma 14) (también denominado AHNK2 o KIAA2019), está localizado en 14q32.33. Su función aún no ha sido determinada.

El gen CTSE (catepsina E) (también denominado CATE), localizado en 1q31, codifica para una proteasa intracelular.

El gen CRH (hormona liberadora de corticotropina) (también denominado CRF), localizado en 8q13, codifica para la hormona de liberación de la corticotropina, segregada en el hipotálamo en respuesta al estrés.

El gen IGF2 (factor de crecimiento 2 similar a la insulina (somatomedina A)) (también denominado 11orf43, FLJ22066, FLJ44734, INSIGF), localizado en 11p15.5, codifica para el factor de crecimiento similar a la insulina.

El gen KLF9 (factor 9 similar a Kruppel) (también denominado BTEB1), codifica para un factor de transcripción.

El gen KRT20 (queratina 20) (también denominado K20; CK20; KRT21; MGC35423), localizado en 17q21.2, codifica para una proteína que forma parte de los filamentos intermedios responsables de dar la estructura e integridad a las células epiteliales.

El gen MAGEA3 (familia A del antígeno del melanoma, 3) (también denominado HIP8; HYPD; MAGE3; MAGEA6; MGC14613), está localizado en Xq28. Su función es desconocida.

## ES 2 357 784 T3

El gen POSTN (periostina, factor específico de osteoblastos) (también denominado PN; OSF-2; PDLPOSTN; MGC119510; MGC119511; periostin; RP11-412K4.1), está localizado en 13q13.3, y tiene una función relacionada con la movilidad celular.

5 El gen PPP1R14D (proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora (inhibidora) 14D) (también denominado GBPI-1; FLJ20251; MGC119014; MGC119016; CPI17-like), está localizado en 15q15.1 y codifica para una fosfatasa.

10 El gen SLC1A6 (familia de transportador de solutos 1 (transportador de aspartato/glutamato de alta afinidad), miembro 6) (también denominado EAAT4; MGC33092; MGC43671), localizado en 19p13.12, participa en el transporte intracelular.

El gen TERT (telomerase reverse transcriptase) (también denominado TP2; TRT; EST2; TCS1; hEST2), localizado en 5p15.33, codifica para una polimerasa de los telómeros con actividad transcriptasa reversa.

15 El gen ASAM (molécula de adhesión específica de adipocitos) (también denominado ASAM; ACAM; CLMP; FLJ22415), localizado en 11q24.1, participa en la adhesión celular.

20 Finalmente, el gen MCM10 (deficiente de mantenimiento de minicromosoma 10 (*S. cerevisiae*)) (también denominado CNA43; PRO2249; MGC126776), localizado en 10p13, codifica para una proteína implicada en el inicio de la replicación genómica.

25 También se divulga el procedimiento *in vitro* no invasivo para diagnosticar y/o pronosticar cáncer vesical comprendiendo recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación en dicha muestra del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6, TERT, y MCM10. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

30 También se divulga el procedimiento *in vitro* no invasivo de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical comprendiendo recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación en dicha muestra de fluido vesical de la expresión de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D, ASAM y sus combinaciones. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

35 También se divulga el procedimiento diagnóstico y/o pronóstico basado en la detección y cuantificación individual de la expresión del gen C14orf78.

También se divulga dicho procedimiento diagnóstico y/o pronóstico basado en la detección y cuantificación individual de la expresión del gen KLF9.

40 También se divulga dicho procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico basado en la detección y cuantificación individual de la expresión del gen POSTN.

También se divulga dicho procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico basado en la detección y cuantificación individual de la expresión del gen PPP1R14D.

45 También se divulga dicho procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico basado en la detección y cuantificación individual de la expresión del gen ASAM.

50 También se divulga un procedimiento *in vitro* no invasivo para diagnosticar y/o pronosticar cáncer vesical basado en la detección y cuantificación de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D, ASAM y sus combinaciones y, adicionalmente, al menos un gen seleccionado entre ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6, TERT y MCM10.

55 Se contempla un método *in vitro* no invasivo centrado en el diagnóstico de cáncer vesical que comprende recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6 y TERT, según el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

60 El procedimiento *in vitro* no invasivo de diagnóstico de cáncer vesical comprende recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6 y TERT. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

65 El procedimiento *in vitro* no invasivo de diagnóstico de cáncer vesical comprende recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación de la expresión de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D y sus combinaciones. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

## ES 2 357 784 T3

También se proporciona un procedimiento diagnóstico basado en la detección y cuantificación del gen C14orf78.

También se proporciona un procedimiento diagnóstico basado en la detección y cuantificación del gen KLF9.

5 También se proporciona un procedimiento diagnóstico basado en la detección y cuantificación del gen POSTN.

También se proporciona un procedimiento diagnóstico basado en la detección y cuantificación del gen PPP1R14D.

10 También se proporciona un procedimiento diagnóstico basado en la detección y cuantificación de la expresión de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D y sus combinaciones y, adicionalmente, al menos, un gen seleccionado entre ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6 y TERT.

15 Se contempla un procedimiento *in vitro* no invasivo para pronosticar cáncer vesical que comprende recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ASAM y MCM10. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

20 También se proporciona un procedimiento *in vitro* no invasivo para pronosticar cáncer vesical que comprende recoger una muestra de fluido vesical de un sujeto para llevar a cabo la detección y cuantificación de la expresión del gen ASAM. Los resultados obtenidos se comparan con los valores normales de referencia para dicho gen en fluidos vesicales.

25 En otro aspecto de la invención, se contempla el uso de la combinación de genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6, TERT, ASAM y MCM10 como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

También se proporciona el uso de la combinación de genes ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6, TERT, y MCM10 como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

30 Se contempla el uso de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D, ASAM y sus combinaciones, como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

Se contempla el uso del gen C14orf78 como marcador de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

35 Se contempla el uso del gen KLF9 como marcador de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

Se contempla el uso del gen POSTN como marcador de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

Se contempla el empleo del gen PPP1R14D como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

40 Se contempla el empleo del gen ASAM como marcador de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

45 Otro aspecto se centra en el uso de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D, ASAM y sus combinaciones, en combinación con al menos un gen seleccionado entre ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6, TERT y MCM10, como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la combinación de genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6 y TERT como marcadores de diagnóstico de cáncer vesical.

50 Otro aspecto de la invención se centra en el uso de la combinación de genes ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6 y TERT como marcadores de diagnóstico del cáncer vesical.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D y sus combinaciones como marcadores de diagnóstico del cáncer vesical.

55 Se contempla el uso del gen C14orf78 como marcador de diagnóstico del cáncer vesical.

Asimismo, se contempla el empleo del gen KLF9 como marcador de diagnóstico del cáncer vesical.

Se contempla el uso del gen POSTN como marcador de diagnóstico del cáncer vesical.

60 Se contempla el uso del gen PPP1R14D como marcadores de diagnóstico del cáncer vesical.

65 Se contempla el uso de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D y sus combinaciones, en combinación con al menos un gen seleccionado entre ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6 y TERT, como marcadores de diagnóstico de cáncer vesical.

Se contempla el uso de la combinación de genes ASAM y MCM10 como marcadores de pronóstico del cáncer vesical.



## ES 2 357 784 T3

Se contempla el uso del gen ASAM como marcador de pronóstico del cáncer vesical.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical que comprende un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6, TERT, ASAM y MCM10.

En otro aspecto de la invención, el kit de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical comprende un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6, TERT y MCM10.

En otro aspecto de la invención se contempla un kit de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical basado en un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D, ASAM y sus combinaciones.

El kit de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical, basado en el set de sondas para la detección y cuantificación de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D, ASAM y sus combinaciones, comprende adicionalmente un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación de un gen seleccionado entre ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6, TERT y MCM10.

En otro aspecto de la invención, se contempla un kit de diagnóstico del cáncer vesical, basado en un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6 y TERT.

En otro aspecto de la invención, el kit de diagnóstico del cáncer vesical, comprende un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6 y TERT.

En otro aspecto se contempla el kit de diagnóstico del cáncer basado en un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D y sus combinaciones.

En otro aspecto, dicho kit, basado en el set de sondas adecuado para la detección y cuantificación de un gen seleccionado entre C14orf78, KLF9, POSTN, PPP1R14D y sus combinaciones, comprende, adicionalmente, sondas adecuadas para la detección y cuantificación de al menos un gen seleccionado entre ANXA10, CTSE, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, SLC1A6 y TERT.

En otro aspecto se contempla un kit de pronóstico del cáncer vesical, basado en un set de sondas adecuado para la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de genes ASAM y MCM10.

En otro aspecto, el kit de pronóstico se basa en una sonda adecuada para la detección y cuantificación del gen ASAM.

En la tabla 1 se muestran los 14 genes identificados como marcadores genéticos de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer vesical. Los genes ASAM y MCM10 son los 2 genes específicos para pronóstico.

A continuación se presentan algunos ejemplos que sirven para ilustrar pero no limitar la presente invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Determinación de la importancia de la degradación en las muestras de fluido vesical*

Para llevar a cabo el objetivo final de la invención, en primer lugar fue necesario conocer el impacto que tenían diferentes niveles de degradación del ARN en los perfiles de expresión génica, dado que la calidad del ARN obtenido de los fluidos vesicales (orina y/o lavado vesical) es generalmente baja. También debía determinarse si los perfiles de expresión génica obtenidos de los fluidos vesicales se correspondían con los obtenidos en los correspondientes tumores.

#### 1. Selección de muestras y preparación del ARN

Se seleccionó una muestra de tejido tumoral (T) y de lavado vesical (LV) de un mismo paciente diagnosticado como pT2 alto grado (G3) [según los métodos descritos en Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, Hartmann A, Schmitz-Dräger BJ, Helpap B, Ayala AG, Tamboni P, Knowles MA, Sidransky D, Cordon-Cardo C, Jones PA, Cairns P, Simon R, Amin MB, Tyczynsky JE. *Tumours of the Urinary System*. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (eds.), *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. World Health Organi-

zation Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2004: 89-157; Sobin LH, Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours. International Union Against Cancer, 6th ed. New York: John Wiley & Sons; 2002]. Se extrajo el ARN de ambas muestras (T0 y LV0) con TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Seguidamente, se degradaron alícuotas de ambos ARN (T0 y LV0) incubándolos a 80°C durante 15 (T1 y LV1), 30 (T2 y LV2) y 60 (T3 y LV3) minutos, obteniendo tres niveles de degradación, tal y como se describe en Xiang CC, Chen M, Ma L et al. A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. Nucleic Acids Res 2003; 31:53, con la excepción de que se utilizó agua en vez de un tampón básico.

También se recolectaron muestras de mucosa vesical sana de 4 pacientes sin evidencia de patología vesical (muestras control), se obtuvo ARN de la misma manera que se procedió con las muestras anteriores y se mezclaron los 4 ARN en proporciones equimolares (C0).

Un  $\mu$ l de cada uno de los ARN, intactos y degradados, se analizaron en el Bioanalyzer Agilent 2100 Bioanalyzer para determinar la calidad de cada ARN (según el método descrito en Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. Nucleic Acids Res 2005; 33:e56) (figuras 1.A-H). En la figura 1 (J) se muestra el gel con las bandas de los ARN ribosómicos (28S y 18S) de cada una de las muestras analizadas donde se observa la degradación progresiva de estas bandas.

Además, se recolectaron 36 lavados vesicales tumorales (8 pTa bajo grado (BG), 5 pTa alto grado (AG), 3 pT1 BG, 5 pT1 AG, 4 pTis, 9 pT2 AG and 2 pT4 AG) y 14 lavados vesicales controles de pacientes sin patología vesical y se extrajo el ARN de la misma manera que en los casos anteriores.

## 2. Amplificación *in vitro* del ARN y marcaje

Se amplificaron 5  $\mu$ g de ARN intacto (T0 y LV0) y degradado (T1, T2, T3, LV1, LV2 y LV3) mediante la utilización de cebadores de secuencia al azar de 9 nucleótidos (*random nonamer primers*) modificados por la adición en 3' de la secuencia promotora del T3 (T3N9) (según Xiang CC, Chen M, Ma L et al. A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. Nucleic Acids Res 2003; 31:e53). Las sondas se sintetizaron mediante un método de marcaje directo (según Richter A, Schwager C, Hentze S, Ansoerge W, Hentze MW, Muckenthaler M. Comparison of fluorescent tag ADN labeling methods used for expression analysis by ADN microarrays. Biotechniques 2002; 33:620-8, 630).

## 3. Procesamiento de la matriz y análisis de datos

Se utilizaron los *Oncochip-v2 glass human ADNc microarrays* ([http://grupos.cnio.es/genomica/arrays/reports/ochip\\_v2.xls](http://grupos.cnio.es/genomica/arrays/reports/ochip_v2.xls)) para co-hibridar cada una de las cuatro alícuotas de ARN progresivamente degradadas, tanto de tumor como de lavado vesical (T0, T1, T2, T3, LV0, LV1, LV2 y LV3), con el *pool* de los ARN provenientes de las muestras de mucosa vesical sana (C0). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron con el G2565BA Microarray Scanner System (Agilent, Technologies, Waldbronn, Germany) y las imágenes TIFF fueron cuantificadas utilizando el programa Spot (<http://experimental.act.cmis.csiro.au/Spot>) bajo el entorno estadístico R (<http://www.r-project.org>). La medida final de intensidad de cada punto del microarray fue calculada tal y como se había sugerido previamente (<http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/zarray/html/image.htmlv>) (datos accesibles públicamente en la base de datos GEO; GSE3192). Finalmente se obtuvieron 1111 clones válidos que cumplían todos los criterios de calidad y se escogieron los 100 más diferencialmente expresados de cada array para comparar entre arrays y calcular los porcentajes de genes en común entre ellos. Se detectó un elevado porcentaje de genes en común diferencialmente expresados entre los arrays de tejido tumoral (85 al 91%) y entre los arrays de lavado vesical (78 al 93%) (Figura 2a), lo que indicaba que degradación del ARN prácticamente no afectaba los perfiles de expresión génica.

También se realizó un cluster no supervisado de todos los clones contenidos en el microarray utilizando UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) y la correlación de Pearson. Este cluster indicaba que el porcentaje de genes en común identificados entre 2 arrays hibridados con ARN de diferente nivel de degradación (por ejemplo, LV0 y LV1), era en ocasiones más alto que el porcentaje entre duplicados *dye swap* (DS) del mismo array (por ejemplo, LV0 vs LV0-DS) (Figura 2b), lo que reforzaba la conclusión de que los perfiles de expresión génica no quedaban prácticamente alterados al trabajar con ARN parcialmente degradado.

Para determinar si los perfiles de expresión génica obtenidos de las muestras de lavado vesical se correspondían con los obtenidos en el correspondiente tumor, se comparó el porcentaje de genes en común diferencialmente expresados entre los arrays de tejido tumoral y los de lavado vesical. Se obtuvo una elevada similitud entre el tumor y el lavado vesical (52 al 60%) y esta similitud resultó ser independiente del estado de degradación del ARN.

En conclusión, estos datos sugirieron que el ARN parcialmente degradado de lavado vesical podía ser utilizado para estudios de expresión génica utilizando microarrays y que este ARN es un reflejo de la expresión génica del tumor.

## ES 2 357 784 T3

### 4. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para validar que los resultados obtenidos en los microarrays de un paciente particular eran extrapolables a una cohorte más larga, se analizaron mediante qRT-PCR 4 genes diferencialmente expresados en los arrays y que estaban relacionados con el proceso de carcinogénesis vesical según la literatura (*KRT20*, *IGF2*, *GSN* y *CCL2*). Para esta validación se utilizaron 36 lavados vesicales tumorales adicionales y 14 lavados vesicales controles.

El ADNc se sintetizó a partir de 1 ug de ARN utilizando el High-Capacity ADNc Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor, excepto que se disminuyó el volumen final de la reacción a 50  $\mu$ l. El gen *GUSB* se utilizó como control endógeno. Las PCRs se realizaron utilizando Assays-on-Demand™ Gene Expression Products en un ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor, excepto que el volumen de la reacción se disminuyó a 20  $\mu$ l.

El método del  $\Delta\Delta$ Ct (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantification of Gene Expression P/N 4303859) se utilizó para calcular la cantidad relativa de expresión de cada gen en relación a un promedio de la expresión de las 14 muestras controles. Para establecer el valor de referencia en los controles se obtuvo la media aritmética de los valores de expresión de los 14 lavados vesicales controles provenientes de pacientes sin patología vesical.

Los resultados de este análisis, expresados como log<sub>2</sub>ratio, definido como la proporción o división (ratio) entre las 2 condiciones comparadas (en este caso el control endógeno contra cada gen indicado) expresado como logaritmo en base 2, confirmaron los resultados de los microarrays en un 81% de las muestras para *KRT20*, en un 89% para *GNS*, en un 64% para *IGF2* y en un 89% para *CCL2* (Figura 3). La elevada concordancia entre los datos de microarrays obtenidos del análisis de un solo paciente y los de qRT-PCR obtenidos del análisis de una cohorte de 36 pacientes adicionales confirmaban que los perfiles de expresión génica obtenidos en los microarrays no eran debidos al análisis de un solo paciente.

### 5. Conclusión del Ejemplo 1

Es posible la utilización de ARN de lavado vesical para inferir los perfiles de expresión génica de los correspondientes tumores vesicales, tanto mediante microarrays de ADNc como de qRT-PCR.

### Ejemplo 2

#### *Determinación inicial de genes candidatos para el modelo predictivo*

Una vez conocido que era posible determinar los perfiles de expresión génica en las muestras de fluido vesical, el siguiente objetivo era obtener datos propios de expresión génica lo más extensos posibles. La estrategia que nos propusimos seguir fue empezar analizando la mayor cantidad posible de genes en un número reducido de muestras, para en fases sucesivas ir analizando progresivamente cada vez una cantidad menor y más seleccionada de genes en una serie más extensa de muestras.

El protocolo a su vez pasaba por el establecimiento de unos controles de calidad muy estrictos en todos los pasos críticos del proceso. Esto incluía la obtención de las muestras biológicas con las características deseadas en el quirófano, por parte de los cirujanos del equipo de la Fundació Puigvert, el almacenaje y conservación de las muestras en las condiciones adecuadas, el análisis anatómo-patológico de las muestras y el procesado molecular por el equipo de laboratorio.

#### 1. Obtención y selección de las muestras biológicas

Las muestras de tejido fueron obtenidas en quirófano utilizando un resector de pinza fría (muestras tumorales) o directamente con tijeras (muestras control). Parte del tejido obtenido fue inmediatamente congelado a -80°C hasta ser procesados posteriormente para la extracción de ARN y la parte restante fue enviado al departamento de Anatomía Patológica para su análisis anatómo-patológico. Para la extracción de ARN los tejidos fueron homogeneizados mecánicamente y los ARN fueron extraídos siguiendo el protocolo del TRIzol (Invitrogen, Calsbad, CA, USA). Finalmente, los ARN se cuantificaron midiendo espectrofotométricamente la absorbancia a 260 nm.

#### 2. Grupos de muestras a estudiar

Dado que los tumores superficiales y los invasivos parecen tener perfiles genéticos distintos, se decidió comparar los grupos tumorales más extremos (superficiales de bajo grado versus infiltrantes). Además también decidimos averiguar el perfil molecular de un tipo de tumor de comportamiento clínico poco claro, ya que son superficiales pero con un alto grado de aberraciones celulares (clasificados como T1 de alto grado, pT1 AG) y en muchos casos (alrededor del 50%) acaban siendo infiltrantes. Así se definieron cuatro grupos de estudio:

## ES 2 357 784 T3

- Grupo 1: muestras de tumores superficiales de bajo grado (BG) y que invadiesen solamente la mucosa vesical (patológicamente clasificadas como pTa BG).
- Grupo 2: muestras de tumores superficiales de alto grado (AG) y que invadiesen el tejido conectivo subepitelial (patológicamente clasificadas como pT1 AG).
- Grupo 3: muestras de tumores infiltrantes (patológicamente como mínimo pT2) y alto grado.
- Grupo 4: muestras de mucosa vesical sana (control).

Con la intención de reducir la varianza biológica, que era bastante elevada, se realizaron *pooles* de muestras de un mismo tipo tumoral, es decir, con una misma clasificación anatómo-patológica. Así se realizaron 3 *pooles* de 4-5 muestras tumorales para cada uno de los grupos; pTa BG, pT1 AG, pT2 AG y controles.

### 3. *Microarrays de Affymetrix*

Aunque anteriormente se había trabajado con una plataforma de microarrays basados en ADNc, era conocido por la bibliografía que existían otras plataformas comerciales basadas en oligonucleótidos que permitirían obtener resultados de expresión de un número de genes más elevado. Finalmente, se decidió utilizar la plataforma de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/index.affx>), dado que eran muchos los datos de los que se disponía en las bases de datos públicas para esta plataforma, prácticamente todas las referencias comentaban su alta calidad de resultados y acababa de salir al mercado un nuevo microarray (U133 plus 2.0) que permitía determinar la expresión génica de la gran mayoría de los genes humanos.

Los microarrays de Affymetrix fueron hibridados y escaneados por una compañía especializada (Progenika) y los datos crudos de expresión (o ficheros cel) fueron directamente analizados por nosotros bajo el entorno estadístico R utilizando el algoritmo RMA (Robust Multi array Analysis).

### 4. *Análisis de los microarrays de Affymetrix*

Una vez obtenidos los datos normalizados de expresión para cada clon se decidió estudiar como se agrupaban las distintas muestras que habíamos seleccionado realizando un cluster no supervisado (Figura 4). En éste se podía observar que todos los controles agrupaban juntos y claramente diferenciados de los tumores, lo que indicaba que existen muchos genes diferencialmente expresados entre tumores y controles (genes de diagnóstico). Por otro lado, también se observa que los 3 *pooles* de tumores infiltrantes (pT2\_1, pT2\_2 y pT2\_3) y tumores superficiales de alto grado (pT1 AG\_1, pT1 AG\_2 y pT1 AG\_3) agrupan juntos y diferenciados de los 3 *pooles* de tumores superficiales de bajo grado (pT1 BG\_1, pT1 BG\_2, pT1 BG\_3), lo que debería permitir localizar genes marcadores de una u otra vía (genes de pronóstico).

Como sistema de clasificación para comparar los distintos grupos y obtener los mejores genes diferencialmente expresados se decidió utilizar la proporción entre el valor de intensidad máximo del grupo con la menor media y el valor de intensidad mínimo del grupo con la mayor media, en escala logarítmica. Esta medida es equivalente al menor nivel de cambio (*minimum fold change*) que podríamos obtener comparando cualquier réplica de un grupo contra cualquier réplica del otro grupo. El resultado final que obtuvimos fueron literalmente miles de genes con diferencias de expresión entre tumores y controles suficientemente significativas.

### 5. *Validación de los resultados de microarrays mediante PCR cuantitativa a tiempo real*

Una vez ordenados los genes, de más a menos diferencialmente expresados, se decidió verificar los resultados obtenidos con una técnica completamente independiente y, según la literatura, mucho más precisa, la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Se seleccionaron 10 de los genes más diferencialmente expresados para realizar esta verificación técnica y se cuantificó su expresión génica mediante qRT-PCR tanto usando exactamente los mismos *pooles* hibridados en los microarrays (para poder comparar los resultados de ambas técnicas), como utilizando las muestras individuales de cada *pool* (para poder estudiar la replicabilidad de la propia técnica de qRT-PCR) (Figura 5). En la comparación entre microarrays y qRT-PCR obtuvimos un coeficiente de regresión de 0.978, lo que nos indicaba una muy buena replicabilidad entre las 2 técnicas. Cuando comparamos las medias aritméticas de las muestras individuales obtenidas mediante qRT-PCR y su expresión en los *pooles* mediante la misma técnica el coeficiente de regresión fue de 0.995, lo que confirmaba los datos bibliográficos de que la cuantificación mediante qRT-PCR tiene una calidad técnica excelente.

## 6. Conclusión del Ejemplo 2

Teniendo en cuenta los resultados observados mediante la cuantificación de la expresión génica utilizando dos técnicas completamente independientes en un pequeño grupo de genes, podemos extrapolar que las expresiones observadas mediante microarrays parecen ser suficientemente fiables como para ser utilizadas para definir un grupo de genes candidatos robusto para un análisis posterior más extenso y específico.

Paralelamente, se concluyó que aunque los microarrays eran adecuados para cuantificar las expresiones génicas, la qRT-PCR era aún más precisa, además de permitir unos niveles de degradación del ARN mayores en la muestra sin que esto perjudicara el resultado final.

## Ejemplo 3

### 15 Primera selección de genes candidatos

El objetivo final de este estudio era seleccionar un conjunto reducido de genes relacionados con CCT de vejiga y que al cuantificar su expresión se obtuviera información diagnóstica y pronóstica del tumor. Para ello, se ha comprobado que se pueden utilizar dos técnicas; los microarrays de ADN y la PCR cuantitativa a tiempo real. Mediante la tecnología de microarrays se testan miles de genes en cada experimento y se necesita mayor cantidad de ARN y de mejor calidad para realizar los experimentos que con la metodología de la qRT-PCR. Además, ésta última es una tecnología más precisa y se puede cuantificar el número exacto de genes de interés. Por ello se decidió utilizar en las siguientes fases del estudio la tecnología TaqMan Low Density Arrays (TLDA), basada en qRT-PCR.

### 25 1. Selección de 384 genes para las tarjetas TaqMan Low Density Arrays (TLDA)

Las TLDA son tarjetas microfluídicas que contienen liofilizados los *primers* y la sonda TaqMan para un máximo de 384 genes (existen diferentes configuraciones de TLDA que permiten analizar en una misma tarjeta desde 384 genes y una sola muestra hasta 48 genes y 8 muestras). Por lo tanto, de los experimentos realizados previamente mediante microarrays de Affymetrix hibridados con ARN de tejido se tenía que seleccionar un sub-conjunto de 384 genes. Se seleccionaron los genes más diferencialmente expresados entre tumores y controles (genes de diagnóstico) y también aquellos genes diferencialmente expresados entre los tres grupos tumorales: pTa BG, pT1 AG y pT2 AG (genes de pronóstico).

Por otro lado, dado que uno de los objetivos del proyecto era trabajar con fluidos vesicales, en esta fase del proyecto se pretendía poder estudiar estos 384 genes no con ARN de tejido, como se había estado haciendo hasta ahora, sino directamente con fluidos vesicales (orina o lavados vesicales).

### 40 2. Recogida y procesamiento de los lavados vesicales y orinas

Las muestras de lavado vesical fueron recogidas por barbotaje intraoperatoriamente, antes de la resección del tumor vesical o antes de la cistectomía. Las muestras de orina fueron recogidas por micción espontánea antes de que el paciente entrase en la cirugía. Tanto las muestras de lavado vesical como las de orina eran transportadas al laboratorio en hielo inmediatamente después de ser recogidas. Las muestras se mezclaban con 1/25 volúmenes de EDTA 0,5M, pH8.0 y se centrifugaban a 1000 Xg durante 10 minutos. Los pellets celulares se resuspendían en 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) y se congelaban a -80°C hasta la extracción del ARN.

Se recogieron y almacenaron 425 muestras de lavado vesical tumoral, 30 muestras de lavado vesical control, 43 muestras de orinas tumorales y 158 muestras de orinas controles.

### 55 3. Extracción del ARN y síntesis del ADNc

Los ARN se extrajeron siguiendo el protocolo del TRIzol (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) y se cuantificaron midiendo espectrofotométricamente la absorbancia a 260 nm.

El ADNc se sintetizó a partir de 1 ug de ARN utilizando el High-Capacity ADNc Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor, excepto que se disminuyó el volumen final de la reacción a 50 µl.

### 65 4. Selección de “productos de expresión génica TaqMan” y RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Una vez conocidos los genes de interés, se seleccionaron los *primers* y sonda fluorescente (TaqMan Assays-on-Demand™ Gene Expression Products) para la cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR en la web de Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

## ES 2 357 784 T3

Se configuró una tarjeta multifluídica (TaqMan Low Density Array, TLDA) que contenía 384 ensayos que correspondían tanto a genes de diagnóstico, como a genes de pronóstico, como a los genes controles endógeno (figura 8). Esta configuración de TLDA permite analizar una sola muestra por tarjeta. En la tabla de la figura 8 se indica el nombre y símbolo del gen, así como el clon de Affymetrix en el que se encontró la expresión diferencial del gen. También se define el nombre del TaqMan Gene Expression Assay (<http://www.appliedbiosystems.com/>) seleccionado para la tarjeta microfluídica TaqMan Low Density Array. Este nombre de ensayo a su vez está indicando la región génica que se amplificará en la qRT-PCR. Finalmente, se indica uno de los transcritos mayoritarios que se amplificará con este ensayo (Ref Seq o Gene Bank mRNA).

Las PCR se realizaron en un ABI PRISM 9700 HD SDS (Applied Biosystems, Foster City, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se analizaron mediante TLDA de 384 genes un total de 60 muestras:

- 39 muestras de lavado vesical tumoral
- 15 muestras de lavado vesical control
- 3 muestras orina tumoral
- 3 muestras de sangre periférica; esto se realizó dado que en el análisis anterior, basado en microarrays de Affymetrix, habíamos observado contaminación de tejido muscular en las supuestamente muestras puras de mucosa vesical y teníamos indicios para sospechar que en las muestras de fluidos vesicales pudiese haber contaminación debida al sistema inmune. Por ello se decidió analizar 3 muestras de linfocitos para poder eliminar por comparación aquellos genes que se expresasen mucho en sangre (dado que la sangre sería un contaminante constante en las muestras de fluido vesical procedente de pacientes con tumor vesical).

### 5. Análisis de las TLDA de 384 genes

Una vez realizadas todas las PCRs se establecieron los niveles de corte (*thresholds*) y niveles basales (*baseline*) más apropiados para cada gen y se calcularon los Ct (*cicle threshold*) o datos de expresión crudos mediante el programa SDS 2.1 (Applied Biosystems).

Posteriormente, se calculó la medida de expresión relativa de cada gen o delta Ct (Ct del gen diana - Ct del control endógeno, *GUSB* en nuestro caso) y se estudió como se agrupaban las muestras individuales mediante un cluster no supervisado (usando distancias euclidianas y UPGMA) (Figura 6). El primer nivel de clasificación que se observa en este cluster es la diferenciación entre las 3 muestras provenientes de sangre periférica y las muestras de los fluidos vesicales (lavados vesicales y orinas). Por otro lado, los fluidos vesicales se sub-agrupan en un conjunto de muestras que agrupan en parte superior del cluster (desde la muestra B155-RV\_T2alto hasta la B288-RV1-TaG2alto) y que está formado sólo por muestras de fluidos vesicales tumorales, y otro conjunto de muestras en la parte inferior del cluster (a partir de la muestra B71-RV-TaG2bajoCIS hasta la B109-RV\_T2alto) que está formado por una mezcla de fluidos vesicales tumorales y controles. A su vez, dentro del cluster superior podemos diferenciar entre tumores de alto grado y bajo grado, mientras que en el inferior aparece una agrupación con casi sólo muestras controles y otra con mezcla de controles y tumores. Se ha de tener en cuenta que se ha pasado de analizar tejido en *pooles* a fluidos vesicales en muestras individuales, por lo que era relativamente previsible esta pérdida de potencia de discriminación mediante cluster.

El objetivo de este análisis era reducir el número de genes a estudiar en la siguiente fase, con un número mayor de muestras, de 384 a 96. Para el proceso de selección de los mejores genes se tuvieron en cuenta distintos parámetros, entre ellos el estadístico descrito anteriormente (*minimum fold change*), pero también la proporción en escala logarítmica de las medianas de los 2 grupos comparados (*median fold change*) y un análisis manual individualizado por genes de los distintos valores de intensidad. Esto nos permitió reducir el grupo inicial de 384 genes a los 96 genes que requeríamos para la siguiente fase de experimentos (Figura 9).

#### Ejemplo 4

#### 60 Segunda selección de genes para incrementar la potencia diagnóstica/pronóstica

En esta fase del trabajo el objetivo era conseguir aumentar la potencia de discriminación entre muestras tumorales y controles. Para ello, se pretendía analizar un número mayor de muestras de fluido vesical y reducir, si era posible, al menos a la mitad el número de genes en los que se debería basar el prototipo inicial del sistema de diagnóstico y pronóstico.

## ES 2 357 784 T3

### *Muestras a analizar y TLDA de 96 genes*

Las tarjetas multifluídicas (TaqMan Low Density Arrays) que contenían 96 ensayos (figura 9) se configuraron y procesaron de la misma manera que se hizo con las de 384 genes, con la diferencia que esta configuración de TLDA permite analizar 4 muestras por tarjeta.

Se analizaron mediante TLDA de 96 genes un total de 80 muestras:

- 42 muestras de lavado vesical tumoral
- 8 muestras de lavado vesical control
- 15 muestras orina tumoral
- 15 muestras orina control

### *2. Análisis de las TLDA de 96 genes*

Dado que la tecnología utilizada en la fase anterior de experimentos (ejemplo 3) era exactamente la misma que en este ejemplo y los genes analizados en esta fase estaban ya incluidos en las TLDA de 384 genes analizadas previamente, se decidió extraer y sumar las 60 muestras del ejemplo 3, con los datos de las nuevas 80 muestras (Total= 140 muestras).

Se realizó un primer análisis mediante cluster no supervisado de las 140 muestras con las expresiones de los 96 genes y pudimos observar 2 grandes grupos claramente diferenciados (Figura 7). En el primer grupo (Figura 7.B) todas las muestras son tumorales sin excepción. En cambio, en el segundo grupo (Figura 7.A) la mayor parte de muestras son controles, pero hay algunas muestras tumorales, con un perfil genético no distinguible de las muestras normales. La conclusión que se podía extraer de este resultado era que la mayor parte de tumores presentaban unos perfiles genéticos característicos y diferenciados de las muestras control, aunque había algunos casos en los que el perfil general no se distinguía de una muestra normal y, por tanto, no podrían ser detectados. Estábamos observando otra vez el mismo efecto que para el ejemplo 3, aunque ahora nuestra capacidad de discriminación en las muestras era superior.

Basándonos en los datos que se habían observado de los clusters y en análisis exploratorios propios intentando utilizar otros algoritmos de clasificación (como análisis lineal discriminante, k-nearest neighbor (KNN), etc.) se pudo observar que el problema de la discriminación de algunos tumores respecto a las muestras control persistía. La nueva hipótesis de trabajo fue que cualquier sistema de cálculo global de una medida discriminatoria utilizando un grupo de genes concreto tendría el mismo problema. Este consistía en que, debido a la elevada heterogeneidad de los tumores, resultaba relativamente fácil reconocer los perfiles de la mayoría, que tendrían alteraciones mayoritariamente parecidas, aunque siempre habría una minoría de casos para los que el comportamiento global de los genes seleccionados para su análisis no se distinguiría de las muestras controles, ya que tendrían alteradas vías minoritarias.

Para detectar tanto los tumores mayoritarios como los minoritarios, se estableció un “sistema de alarmas” mediante el establecimiento de un rango de valores entre los que oscilaban las muestras control y añadiendo un intervalo de confianza de manera que se pudiera determinar un punto a partir del cual una expresión que estuviera por encima (o por debajo en caso de los genes infraexpresados) fuera indicativa de tumor, independientemente de los valores de expresión observados en los otros genes. La ventaja de este sistema es que, aunque el tumor presente perfiles generales de expresión parecidos a muestras sanas, si uno de los genes alarma se dispara, permite afirmar que nos encontramos frente a una muestra tumoral.

La primera etapa en el desarrollo de dicho sistema fue la estimación de los rangos de expresión de los controles y sus intervalos de confianza. Ya que ahora era muy importante que en los valores controles no hubiera errores técnicos, que alterarían falsamente los rangos, se decidió eliminar aquellos controles que no presentaran un nivel de calidad mínimo. Para calcular esta medida de calidad se utilizaron 3 genes (*GUSB*, *18S* y *PPIA*) que además sirvieron como controles endógenos (calculando su media geométrica) para la cuantificación relativa de todos los genes. Analizando el comportamiento individual de la distribución de cada gen no se pudo verificar que se cumpliera un ajuste suficiente a una distribución normal, por lo que no se pudo establecer unos intervalos de confianza basados en su varianza. Como alternativa, se decidió establecer unos intervalos de confianza arbitrarios y fijos con distintos niveles de rigurosidad (como punto umbral se decidió utilizar el doble, 4 veces u 8 veces el valor del control con valores de expresión más parecidos a los tumores).

Una vez determinado el punto umbral para cada gen, se resumió toda esta información en una matriz con los 96 genes contra las muestras tumorales. Se marcaron con 0 los valores que no superaron el nivel de corte y con 1 los que si lo superaron (para cada nivel de estringencia). Para seleccionar los mejores genes (con los que se pretendía reducir el perfil al menos a 48) se tuvieron en cuenta dos propiedades: 1) que el gen pudiera detectar un gran número de tumores (buscando los que tuvieran una mayor suma de valores 1) y 2) que esta detección fuera el máximo de independiente de otros genes alarma (para poder detectar el máximo de vías minoritarias).

## ES 2 357 784 T3

Como resultado, se hubiera podido reducir el número de genes interesantes a menos de 48, aunque por razones técnicas y siendo conservadores se decidió mantener este número para su análisis en fases posteriores, ya que algunos intervalos en los controles podrían no ser completamente correctos (debido al bajo número de muestras control analizadas hasta el momento).

Para automatizar el proceso de análisis de nuevas muestras a partir del perfil genético de los 48 genes seleccionados (figura 10) se creó un programa informático que partiendo de los resultados de Cts obtenidos de la qRT-PCR es capaz de realizar una predicción diagnóstica. Este programa es capaz de utilizar distintos ficheros de parámetros (dependiendo de la estringencia en los intervalos), con lo que los valores de sensibilidad (SN) y especificidad (SP) varían. Utilizando el fichero de parámetros menos estringente (punto de corte al doble del control más cercano a los tumores) se obtuvo SN=100% y SP=100%. En el caso del segundo fichero de parámetros (punto de corte 4 veces del control más cercano a los tumores) se obtuvo SN=98,96% y SP=100%. En el último caso (punto de corte 8 veces el peor control) se obtuvo SN=97,93% y SP=100%. Es importante señalar que estos resultados se han obtenido sobre las mismas muestras utilizadas para generar los ficheros de parámetros, por lo que probablemente se está produciendo una sobreestimación (*overfitting*) que sería necesario estimar en experimentos posteriores con muestras nuevas.

### Ejemplo 5

#### 20 *Desarrollo de un modelo final de diagnóstico*

Los objetivos en esta fase del proyecto eran probar y mejorar el modelo de predicción de tumores así como reducir al mínimo el número de genes utilizados para realizar la predicción.

Para esta fase fue necesario ampliar mucho más el conjunto de muestras tanto tumorales como normales. Se analizaron 440 nuevas muestras mediante tarjetas microfluídicas de 48 genes, que se han añadido a los datos del ejemplo 3 (60 muestras) y del ejemplo 4 (80 muestras).

Una vez realizados los controles de calidad mínimos en las muestras, se procedió a analizarlas mediante el modelo cualitativo de alarmas descrito previamente. El resultado que obtuvimos (SN=0.81 y SP=0.81) difería bastante del obtenido con el modelo final del ejemplo 4, por lo que se decidió intentar mejorarlo, ya que probablemente tenía bastante sobreentrenamiento.

A partir de la observación de los histogramas de frecuencias discretizadas de cada uno de los genes, se pudo observar como se distribuían las muestras tanto tumorales como controles. Debido al hecho de haber aumentado mucho el muestreo, el límite de solapamiento entre las distribuciones se había reducido de forma importante. También se pudo observar que, aunque en muy baja frecuencia, algunos casos controles tenían unos niveles de expresión muy parecidos a los tumores.

Aunque, a nivel conceptual, el sistema cualitativo de alarmas desarrollado se seguía considerando una buena aproximación al comportamiento celular de las expresiones génicas, el no poder cuantificar la importancia de cada uno de los genes representaba una seria limitación al poder predictivo del mismo.

En base al mismo concepto de alarmas se decidió intentar desarrollar un modelo cuantitativo, lo cual fue posible utilizando el teorema de las probabilidades condicionadas de Bayes.

Ya que el número de muestras analizadas es suficientemente elevado, se puede estimar a partir de las frecuencias de expresión observadas las probabilidades de que dado un valor de expresión la muestra sea o un tumor o un control.

Una de las ventajas de un modelo basado en el teorema de Bayes es que se puede aplicar a cada gen sensor de forma independiente. La expresión génica observada modificará la probabilidad que se tenía *a priori* de ser un tumor dando una probabilidad *a posteriori*, la cual podrá ser usada de nuevo como probabilidad *a priori* para el siguiente gen. De hecho, implícitamente se está asumiendo independencia entre los distintos genes.

El número final de muestras sobre las que se ha podido aplicar el modelo fue de 308 tumores y 156 controles.

Cuando se aplicó nuestro modelo iterativamente sobre los 48 genes se obtuvo una mejora significativa en el poder de predicción del modelo cualitativo anterior (SN=0.86 y SP=0.92), aunque estudiando los histogramas de frecuencias pudimos observar que muchos genes parecían no aportar información significativa al modelo final. Por tanto, se propuso seleccionar el subconjunto de genes suficiente y necesario para capturar el máximo de información diagnóstica de las muestras.

Utilizando el modelo cuantitativo no se tenía una forma clara de realizar la selección de genes más interesantes. El antiguo modelo cualitativo sí que permitía seleccionar los genes más informativos y, a la vez, con una mayor independencia entre ellos. El resultado de utilizar los mejores genes detectados con el modelo cualitativo (CTSE, MAGEA3, CRH, SLC1A6, PPP1R14D, IGF2, C14orf78 y KLF9) sobre el nuevo modelo cuantitativo mostró una mejora importante en los resultados (SN=0,89 y SP=0,96).



## ES 2 357 784 T3

De todas formas, se decidió intentar otras aproximaciones. A partir del análisis visual de los histogramas de frecuencias de los 48 genes, se seleccionó el subconjunto aparentemente más informativo (ANXA10, CRH, IGF2, KRT20, MAGEA3, POSTN, SLC1A6 y TERT) y con histogramas más variados entre sí (esperando que este hecho indicara una mayor independencia entre ellos). El resultado obtenido también mostraba una mejora significativa respecto al análisis de los 48 genes (SN=0,90 y SP=0,96).

Finalmente, ya que tanto el subconjunto de genes obtenidos mediante el modelo cualitativo como los genes seleccionados visualmente mostraban mejoras respecto al modelo cuantitativo inicial, se decidió combinar los genes de las 2 aproximaciones (ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6 y TERT). El resultado del modelo combinado fue ligeramente mejor que cualquiera de ellos (SN=0,91 y SP=0,96).

Una vez obtenido el modelo, se decidió estudiar si existía algún patrón común tanto en los tumores como en los controles mal clasificados. En el caso de los controles, se pudo detectar una presencia significativa de muestras con tumores en contacto con el sistema urinario (tumores de próstata, de riñón y de pene principalmente). Probablemente, este tipo de muestras tienen patrones de expresión comunes con los tumores de vejiga, con lo que pueden confundir al método de predicción. Por tanto, se decidió eliminar de las muestras control todos aquellos casos con tumores que pudieran encontrarse en contacto con el sistema urinario.

El número de muestras control descendió de 156 a 126, quedando igualmente 308 muestras tumorales. Utilizando el modelo cuantitativo con los 48 genes sobre esta nueva población se observó una mejora importante (SN=0,90 y SP=0,93). En el caso de los 8 genes más independientes se obtuvo: SN=0,91 y SP=0,97. En el subconjunto con los histogramas más interesantes se obtuvo: SN=0,91 y SP=0,97. Finalmente, en el subconjunto combinado de genes se obtuvo: SN=0,93 y SP=0,97. Volviendo a calcular los datos con cada subconjunto seleccionado previamente podemos ver que en general se había conseguido aumentar la potencia del modelo eliminando este tipo de controles.

En lo referente al estudio de los tumores mal clasificados, se detectó un incremento significativo en el número de cistectomías presentes en este grupo. Se cree que la previa resección transuretral (RTU) que frecuentemente se realiza muy cercana en el tiempo a la cirugía radical podría estar alterando el perfil molecular que se observó, ya que las masas tumorales han sido retiradas físicamente de forma parcial o total de las paredes epiteliales de la vejiga. Aunque en este estudio no se han eliminado los casos de cistectomía por no ser los datos concluyentes, es recomendable no incluir este tipo de muestras en el análisis de nuevas poblaciones.

### Ejemplo 6

#### *Desarrollo de un modelo final de pronóstico*

Aunque la preocupación más importante era la predicción tumoral (predicción de diagnóstico) también se estaba interesado en clasificar los distintos tipos de tumores (predicción de pronóstico), lo cual constituye el objetivo principal de este apartado. Esta clasificación podría permitir personalizar más el tratamiento en cada caso.

La clasificación tumoral se basa actualmente en la observación macroscópica y microscópica en el laboratorio de anatomía patológica. Mediante unas observaciones más o menos estandarizadas basadas en la profundidad del tumor y en el aspecto microscópico de las células se decide su clasificación. Estudios moleculares recientes parecen indicar que en realidad hay dos perfiles genéticos diferenciales que mayoritariamente separan los tumores de tipo superficial y los tumores infiltrantes.

Para poder realizar un modelo de clasificación de pronóstico se necesitaría tener los distintos grupos tumorales correctamente separados. Las observaciones anatomo-patológicas no garantizan la correspondencia con el comportamiento a nivel molecular de las muestras, por lo que no parecía buena idea derivar un modelo pronóstico únicamente a partir de esta clasificación. Se optó por utilizar un sistema de clasificación mediante cluster no supervisado (que mayoritariamente separaba las muestras en 2 grandes grupos) además de tener en cuenta la gradación anatomo-patológica (AP).

Como grupo de muestras tumorales superficiales válidas era necesario que agruparan según el cluster en el conjunto que les correspondía y según AP debían ser tumores Ta, T1 grado bajo y sin carcinoma *in situ* (cis) asociado. Los tumores infiltrantes debían pertenecer al grupo correspondiente del cluster y según AP debían ser tumores tipo T1 alto grado, T2, T3 o T4 y cualquier tumor con presencia de CIS.

En el grupo de muestras definido como superficiales se clasificaron 129 de los 308 tumores. En el grupo definido como infiltrantes se clasificaron 100 de los 308. Finalmente, 79 muestras tumorales o presentaban discordancias entre su clasificación por anatomo-patológica y su perfil molecular o no quedaban claramente definidas dentro de los dos grupos mayoritarios del cluster.

La metodología utilizada para crear un modelo que discriminara entre tumores superficiales e infiltrantes es exactamente la misma que la utilizada en el ejemplo 5 para obtener un modelo diagnóstico.

## ES 2 357 784 T3

Cuando se aplicó el teorema de Bayes utilizando los 48 genes se obtuvo una buena clasificación (SN=0,97 y SP=0,96).

5 Analizando los histogramas de frecuencias se pudo observar que los genes interesantes para diagnóstico coincidían en gran medida con los genes de pronóstico. Sin embargo, había algunos genes (MCM10 y ASAM) que no eran adecuados para diagnóstico y sí para pronóstico, por lo que estos dos fueron añadidos a los 12 genes previamente seleccionados. El modelo de 14 genes resultante demostró funcionar casi a la perfección (SN=0,99 y SP=1,00).

10 En la tabla 1 se incluyen los 14 genes, indicando el símbolo del gen y el nombre del ensayo de expresión génica TaqMan seleccionado para la tarjeta microfluidica TaqMan Low Density Array.

TABLA 1

|    | <b>Símbolo del gen</b> | <b>TaqMan Gene<br/>Ensayo de expresión</b> |
|----|------------------------|--|
| 15 |                        |  |
|    | <i>ANXA10</i>          | <u>Hs00200464 m1</u>                       |
| 20 | <i>C14orf78</i>        | <u>Hs00746838 s1</u>                       |
|    | <i>CTSE</i>            | <u>Hs00157213 m1</u>                       |
|    | <i>CRH</i>             | <u>Hs00174941 m1</u>                       |
| 25 | <i>IGF2</i>            | <u>Hs00171254 m1</u>                       |
|    | <i>KLF9</i>            | <u>Hs00230918 m1</u>                       |
|    | <i>KRT20</i>           | <u>Hs00300643 m1</u>                       |
| 30 | <i>MAGEA3</i>          | <u>Hs00366532 m1</u>                       |
|    | <i>POSTN</i>           | <u>Hs00170815 m1</u>                       |
| 35 | <i>PPP1R14D</i>        | <u>Hs00214613 m1</u>                       |
|    | <i>SLC1A6</i>          | <u>Hs00192604 m1</u>                       |
|    | <i>TERT</i>            | <u>Hs00162669 m1</u>                       |
| 40 | <i>ASAM</i>            | <u>Hs00293345 m1</u>                       |
|    | <i>MCM10</i>           | <u>Hs00218560 m1</u>                       |

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* no invasivo para diagnosticar y/o pronosticar cáncer vesical que comprende:

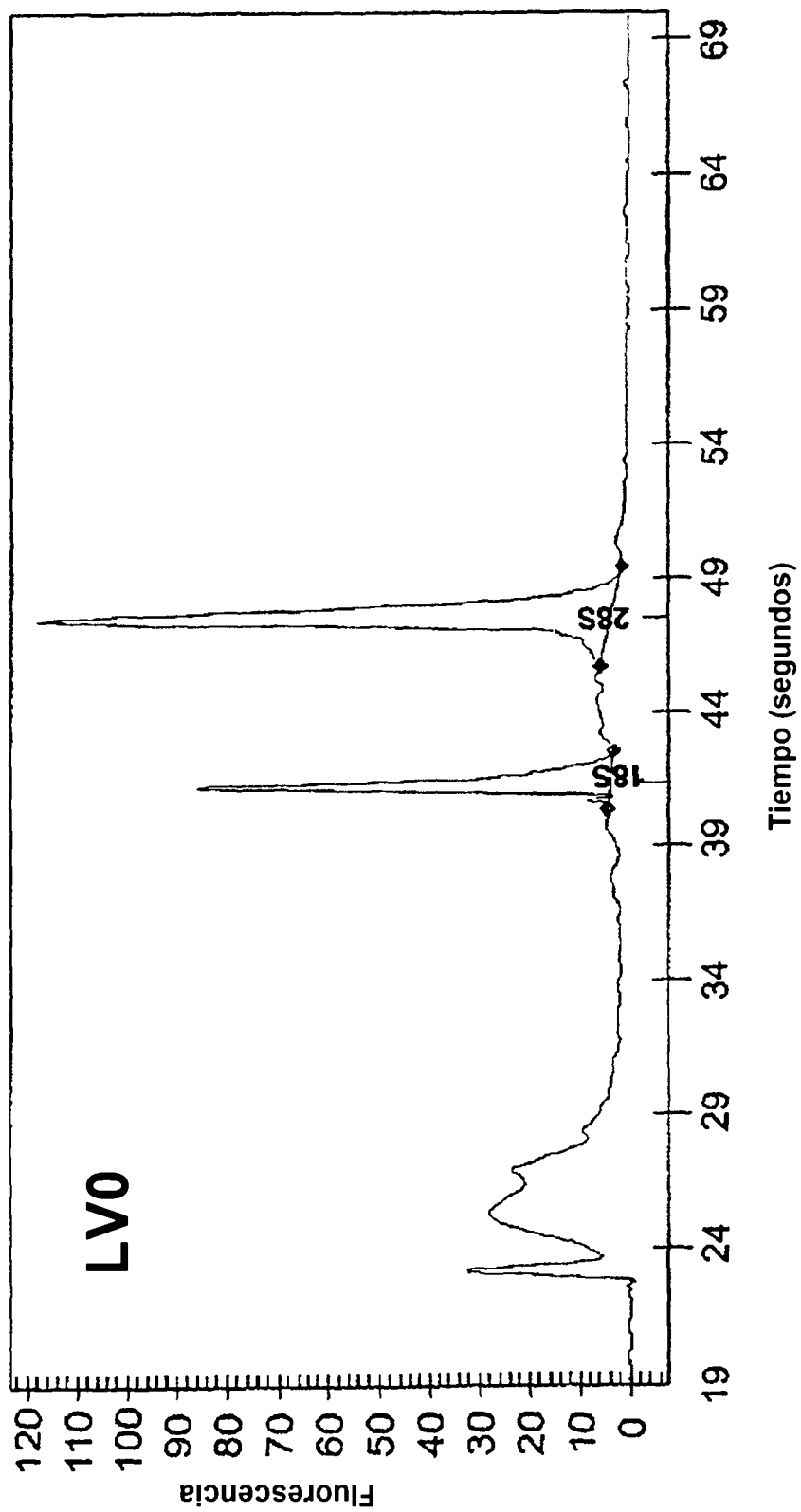
- 5
- a. detectar y cuantificar en una muestra de fluido vesical obtenida de un sujeto el patrón de expresión de la combinación de los genes de anezina A10 (ANXA10); marco de lectura abierto 78 del cromosoma 14 (C14orf78); catepsina E (CTSE); hormona liberadora de corticotropina (CRH); factor 2 similar a la insulina (IGF2); factor 9 similar a Kruppel (KLF9); queratina 20 (KRT20); antígeno del melanoma, familia A, 3 (MAGEA3); periostina, factor específico de osteoblastos (POSTN); proteína fosfatasa 1, subunidad 14D reguladora (inhibidora) (PPP1R14D); familia 1 de transportadores de soluto (transportador de aspartato/glutamato de alta afinidad), miembro 6 (SLC1A6); telomerasa transcriptasa inversa (TERT); molécula de adhesión específica de adipocitos (ASAM) y deficiente 10 de mantenimiento de minicromosomas (*S. cerevisiae*) (MCM10); y
- 10
- 15
- b. comparar los resultados obtenidos en la etapa a) con los valores normales de referencia para dichos genes en fluidos vesicales.

20 2. El procedimiento *in vitro* no invasivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra de fluido vesical es orina.

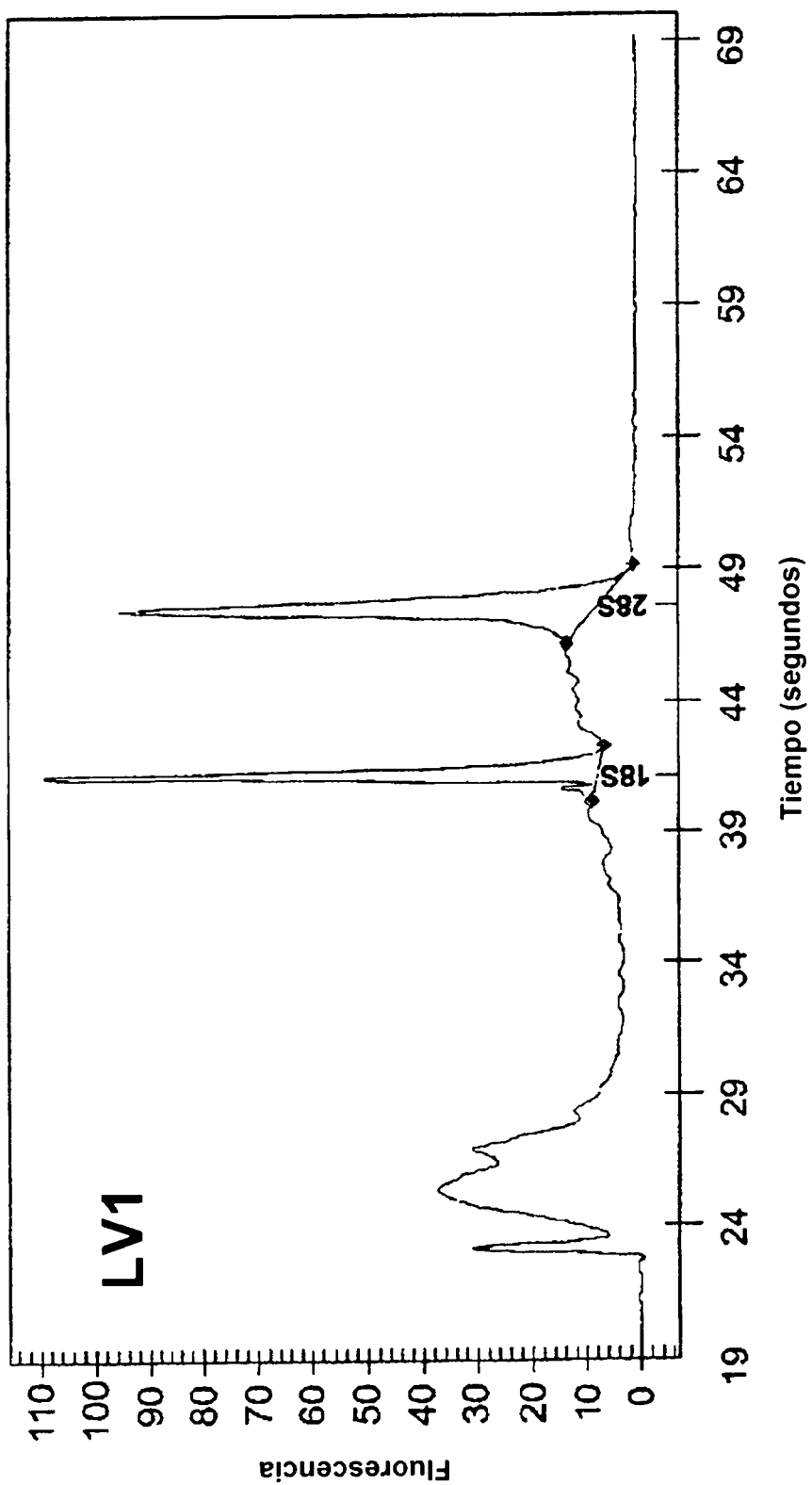
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque la cuantificación de la expresión de los genes en la etapa a) se lleva a cabo por medio de PCR cuantitativa en tiempo real.

25 4. Uso *in vitro* de la combinación de los genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6, TERT, ASAM y MCM10 como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical.

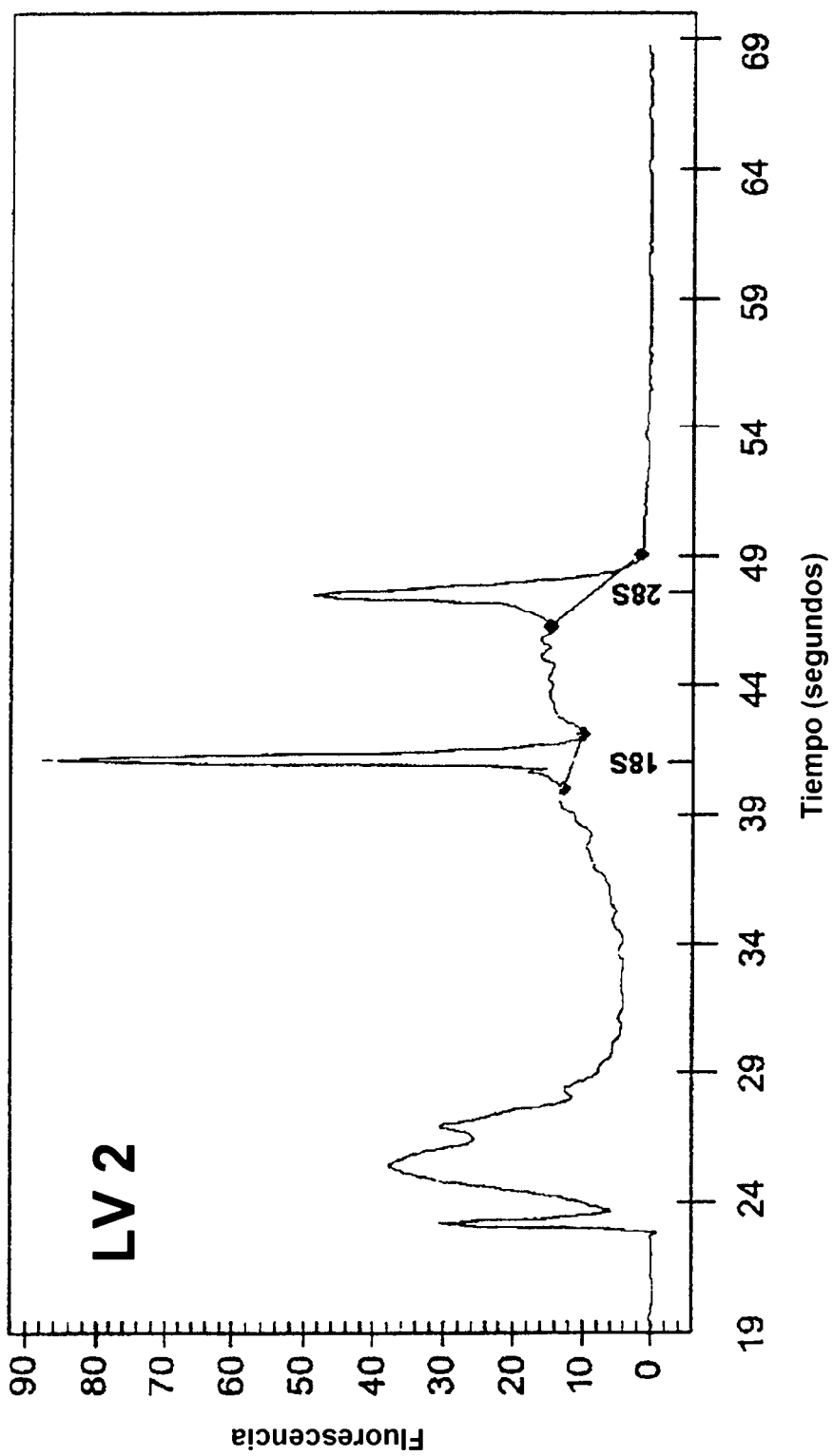
30 5. Un kit de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer vesical para llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1, que consisten en un grupo de sondas adecuadas para la detección y cuantificación del patrón de expresión de la combinación de los genes ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6, TERT, ASAM y MCM10.



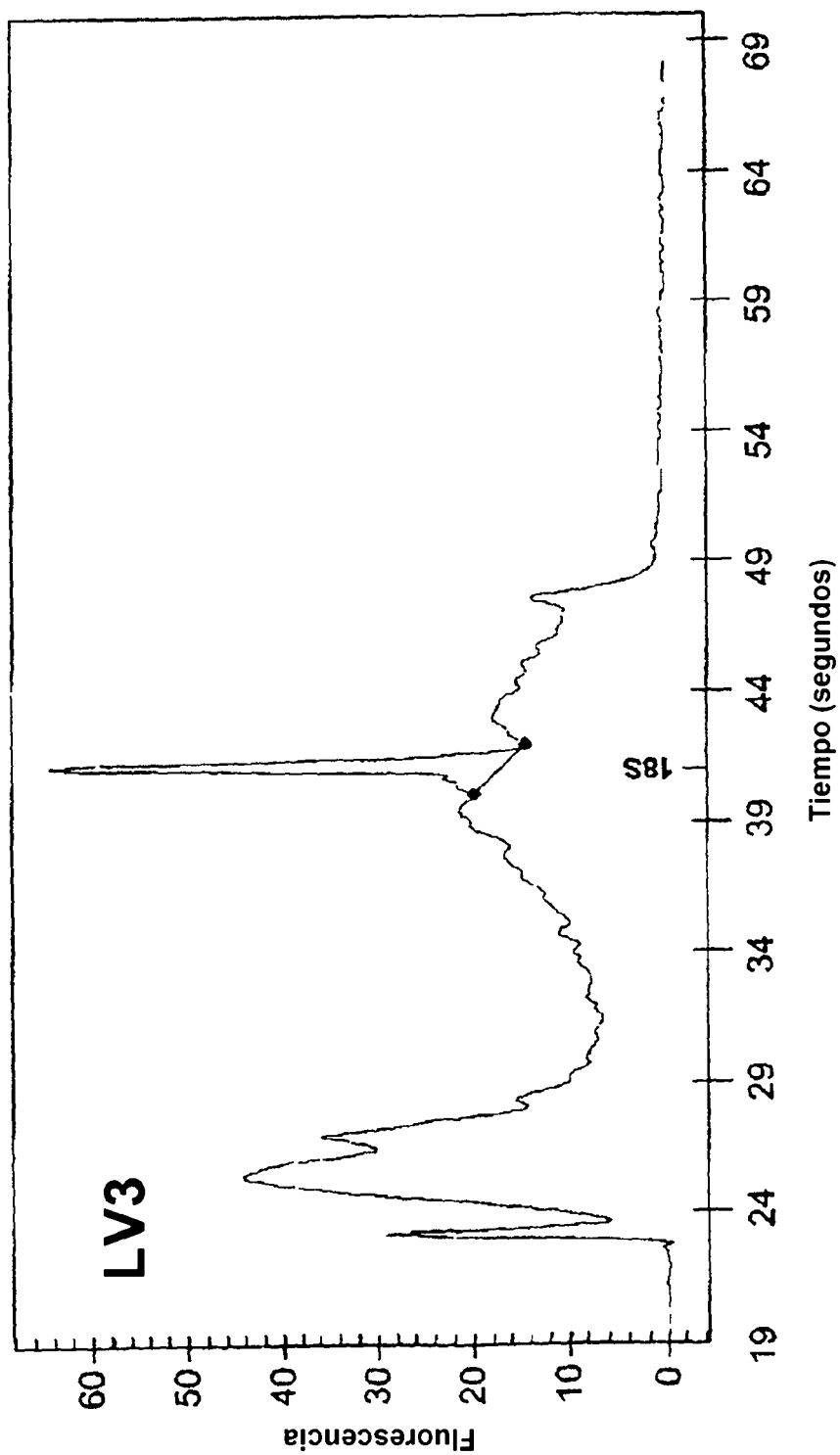
**FIG. 1A**



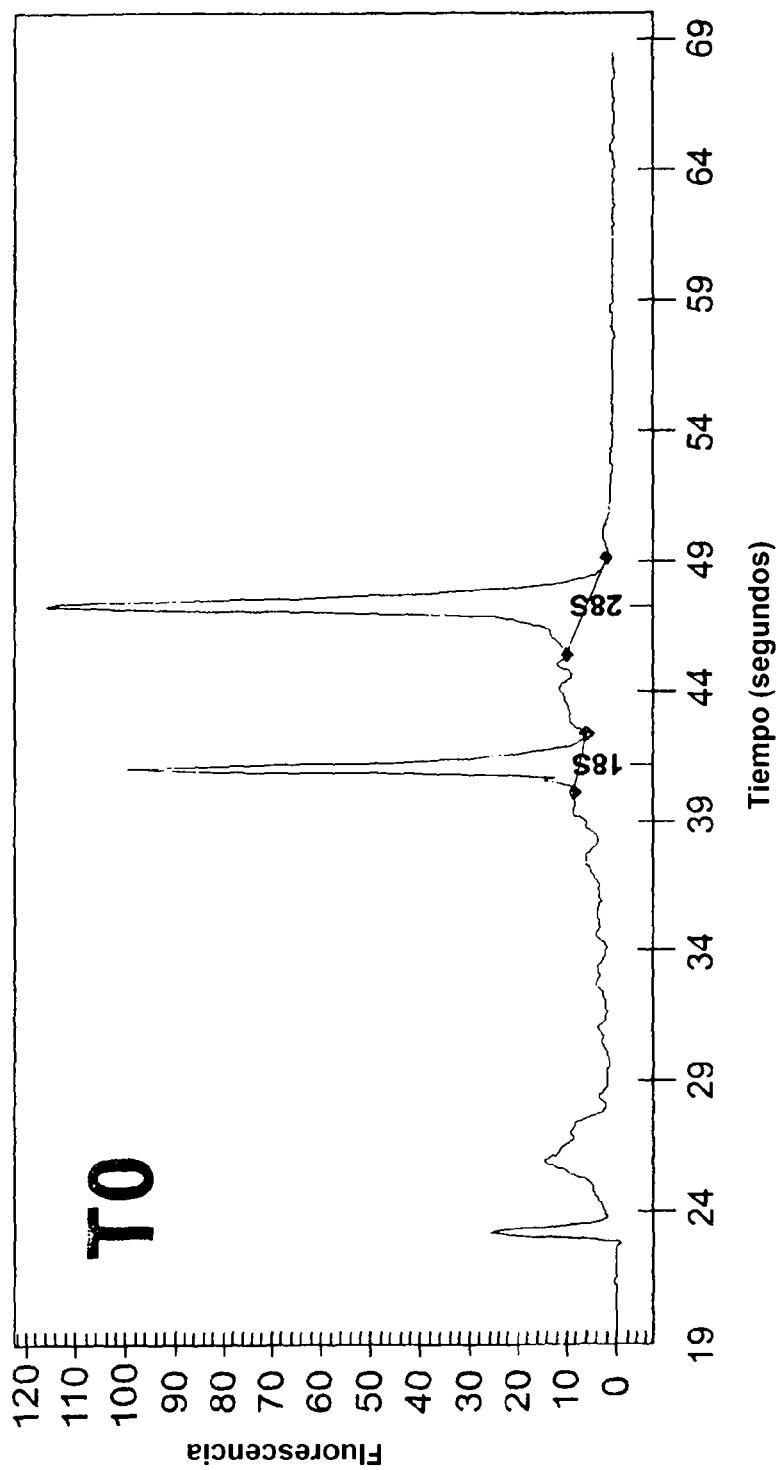
**FIG. 1B**



**FIG. 1C**

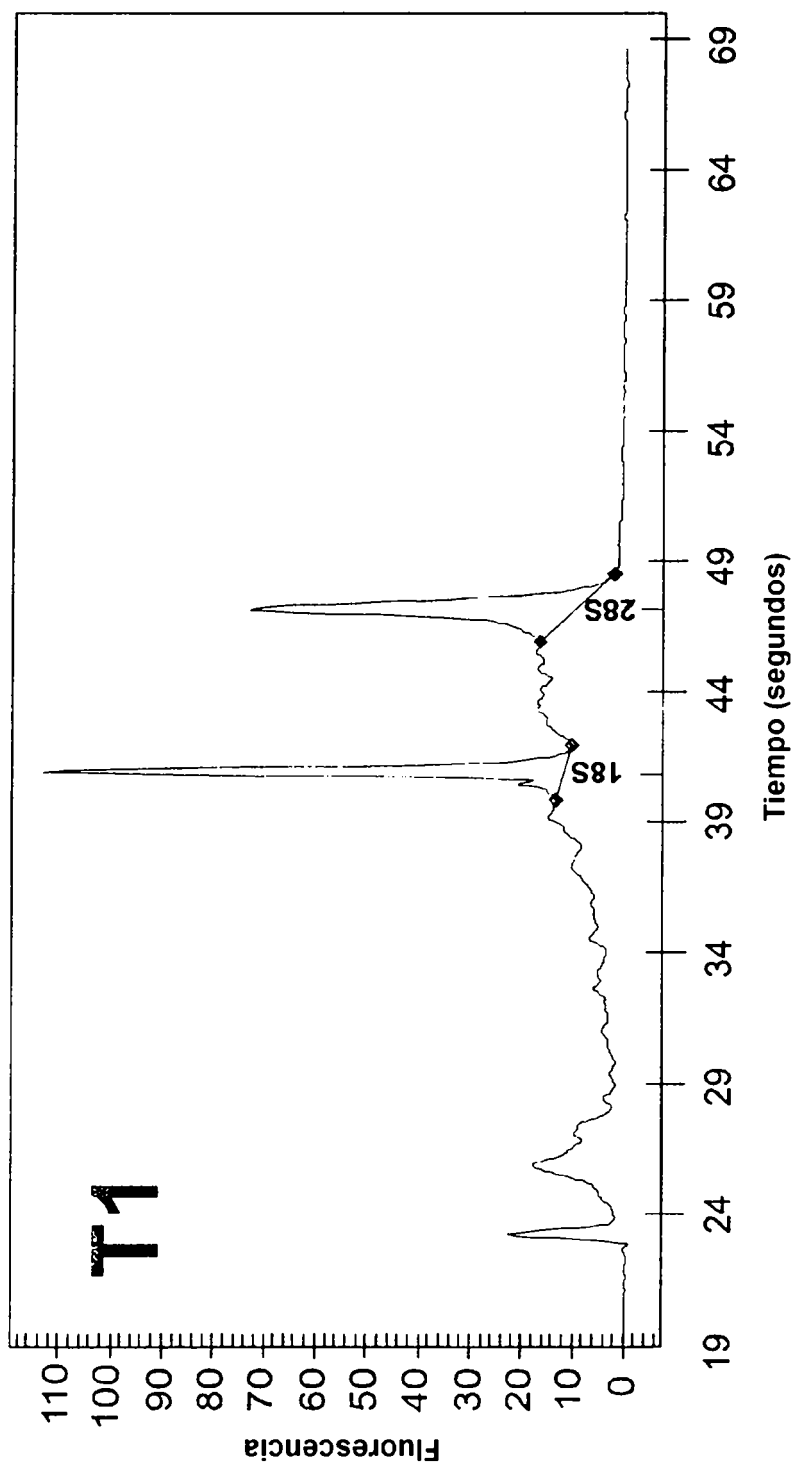


**FIG. 1D**

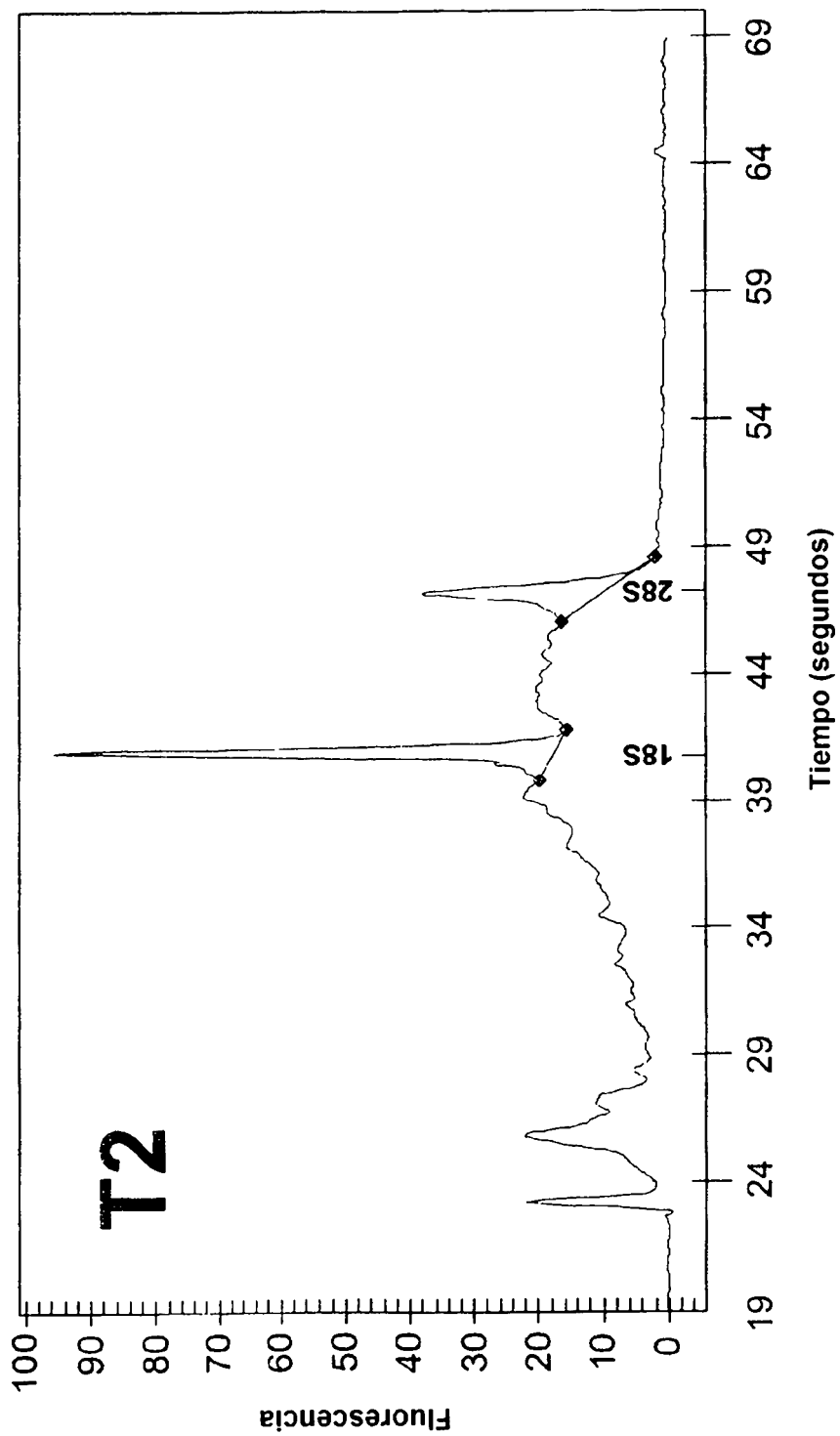


**FIG. 1E**

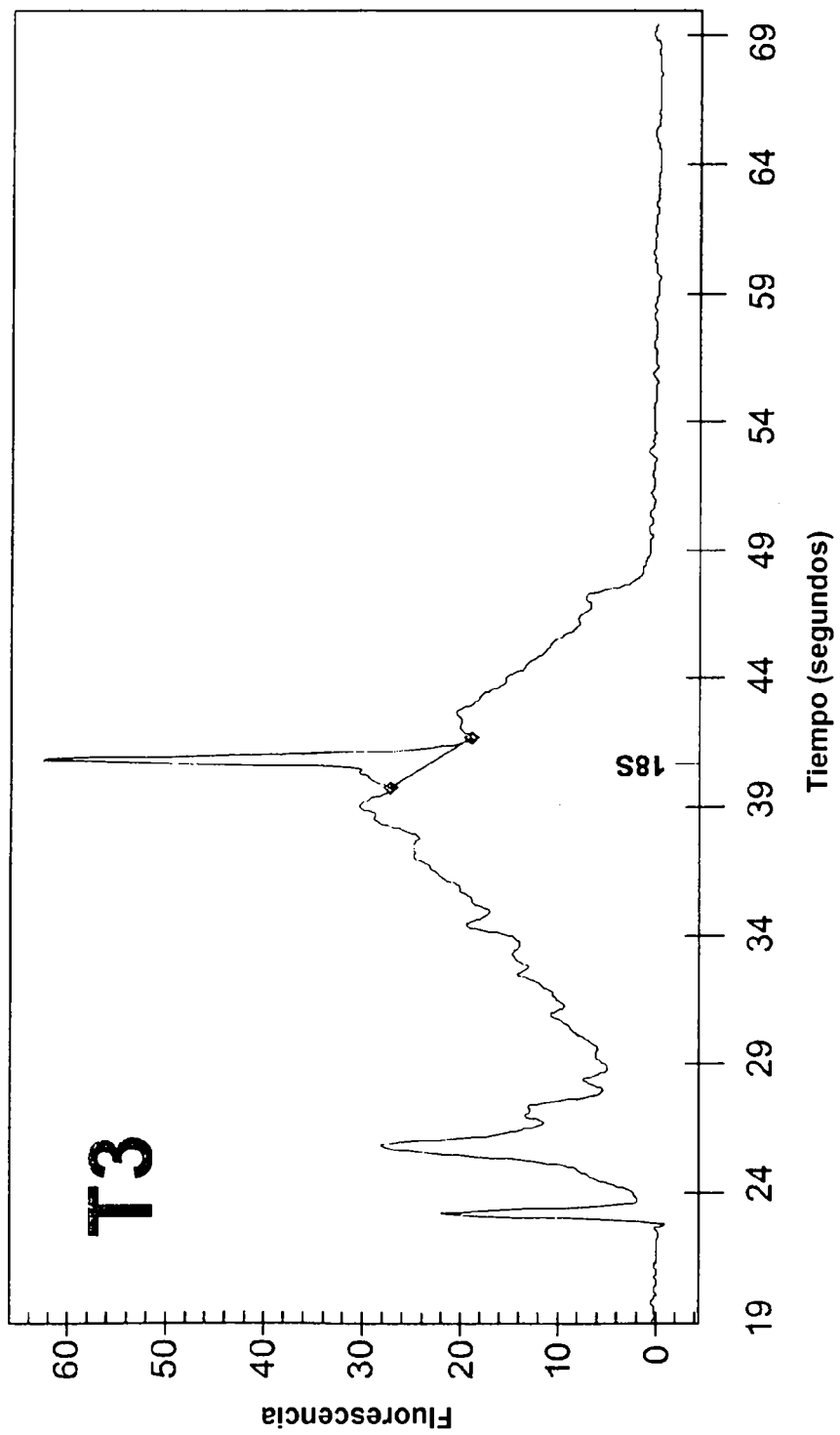




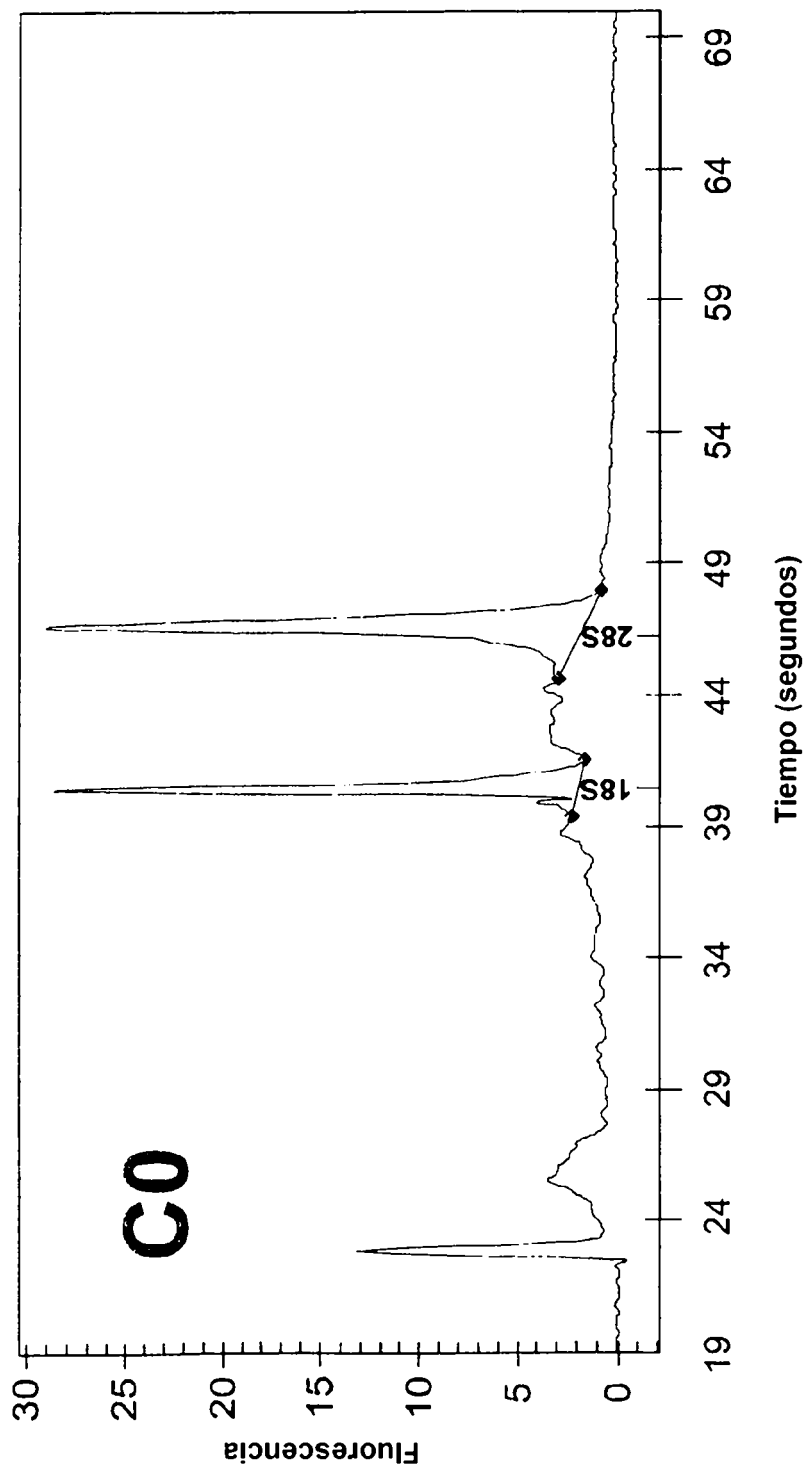
**FIG. 1F**



**FIG. 1G**



**FIG. 1H**



**FIG. 11**

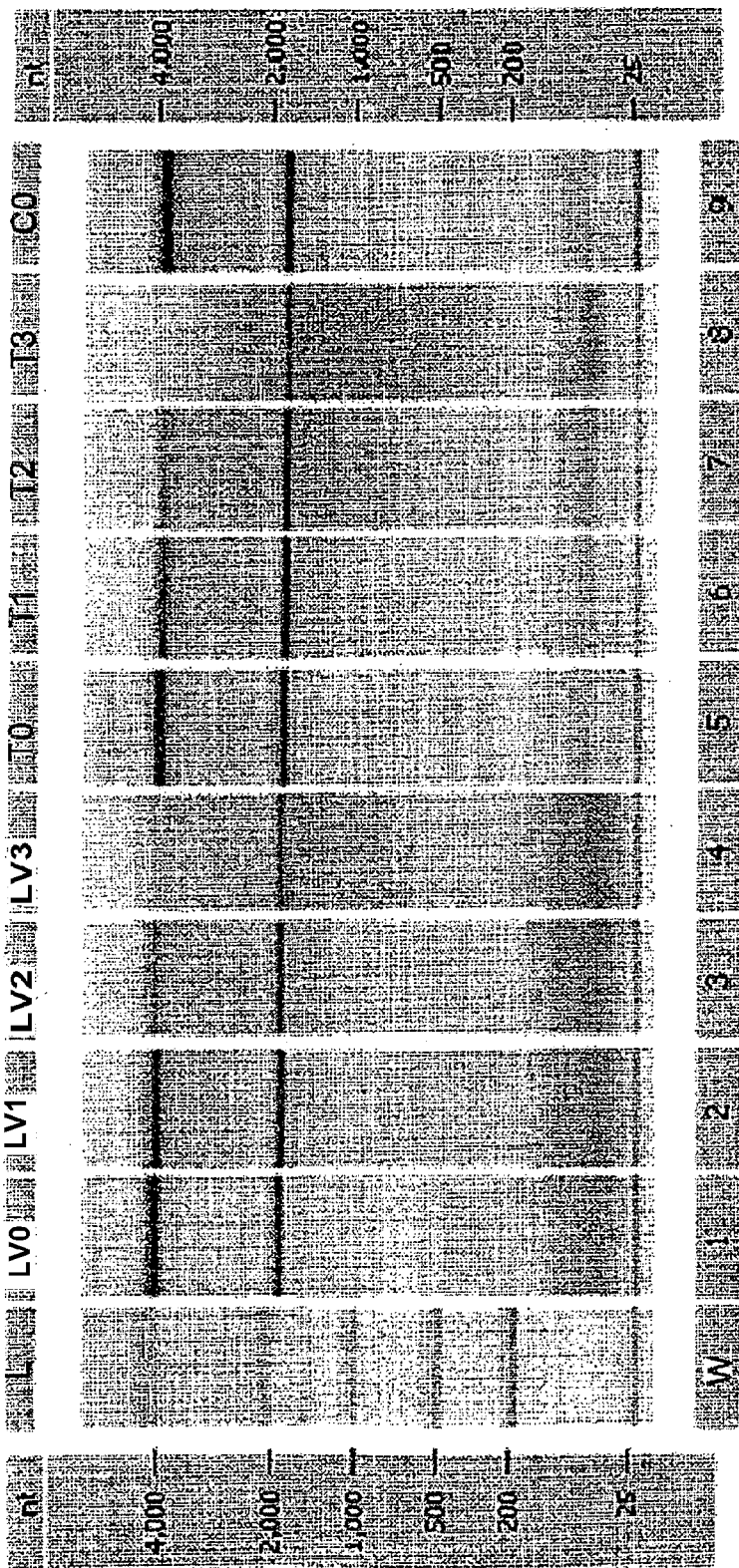


FIG. 1J

a)

|     | T0 | T1 | T2 | T3 | LV0 | LV1 | LV2 |
|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| T1  | 89 |    |    |    |     |     |     |
| T2  | 85 | 91 |    |    |     |     |     |
| T3  | 86 | 87 | 90 |    |     |     |     |
| LV0 | 59 | 59 | 56 | 54 |     |     |     |
| LV1 | 60 | 59 | 56 | 54 | 93  |     |     |
| LV2 | 58 | 56 | 53 | 52 | 89  | 91  |     |
| LV3 | 56 | 56 | 53 | 52 | 79  | 82  | 78  |

b)

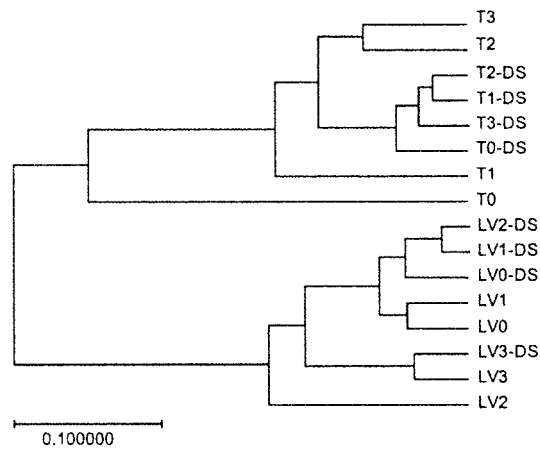


FIG. 2

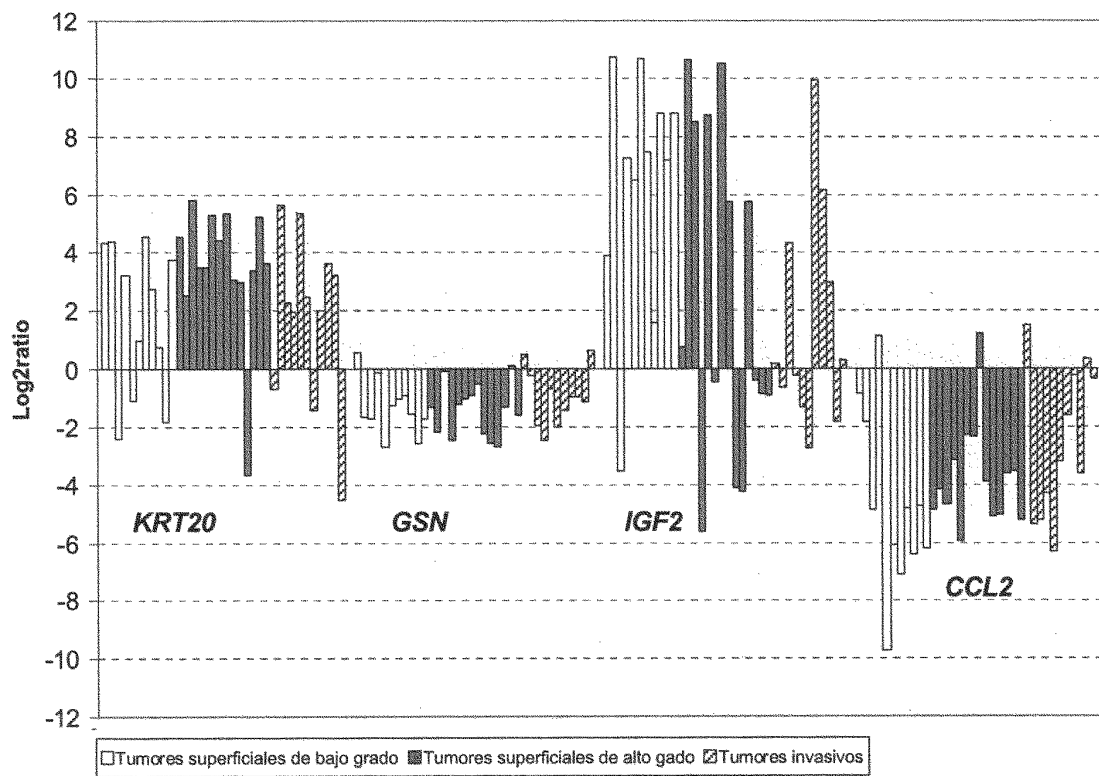
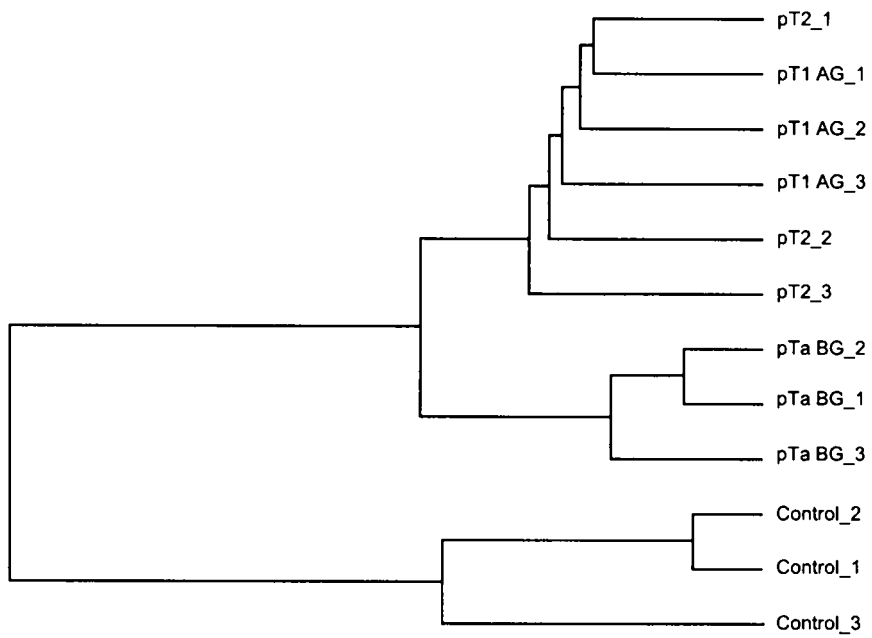


FIG. 3



**FIG. 4**



ES 2 357 784 T3

|                | Combinaciones |         |         | Muestras individuales |        |        |        |        |       |
|----------------|---------------|---------|---------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
|                | No.           | μarrays | qRT-PCR | Media                 | 1      | 2      | 3      | 4      | 5     |
| <b>TCN1</b>    | 1             | 6,55    | 8,82    | 8,01                  | 1,23   | -0,29  | 6,99   | 8,12   | 9,78  |
|                | 2             | 6,71    | 9,42    | 8,15                  | 6,80   | 7,47   | -0,59  | 3,97   | 10,12 |
|                | 3             | 5,10    | 8,34    | 6,48                  | 7,50   | 6,73   | 5,89   | 5,28   | 5,93  |
| <b>SORBS1</b>  | 1             | -5,47   | -4,40   | -5,24                 | -8,44  | -7,04  | -4,82  | -6,42  | -3,75 |
|                | 2             | -3,88   | -3,08   | -3,19                 | -6,10  | -1,30  | -7,30  | -6,45  | ---   |
|                | 3             | -5,60   | -4,09   | -5,21                 | -6,42  | -6,59  | -3,75  | -6,38  | ---   |
| <b>MYH11</b>   | 1             | -6,03   | -7,60   | -6,70                 | -11,53 | -9,47  | -6,03  | -9,57  | -5,06 |
|                | 2             | -3,52   | -4,40   | -4,11                 | -6,89  | -2,19  | -9,32  | -8,71  | ---   |
|                | 3             | -6,93   | -7,69   | -8,36                 | -7,99  | -9,95  | -7,59  | -8,91  | ---   |
| <b>SRPX</b>    | 1             | -4,97   | -6,36   | -5,45                 | -12,15 | -8,56  | -3,93  | -6,09  | -5,01 |
|                | 2             | -5,59   | -5,62   | -5,58                 | -5,60  | -4,26  | -8,56  | -6,95  | ---   |
|                | 3             | -5,90   | -6,43   | -6,45                 | -7,01  | -8,13  | -5,03  | -8,04  | ---   |
| <b>CRH</b>     | 1             | 3,53    | 5,44    | 3,68                  | -5,82  | 0,11   | -2,12  | 5,36   | 4,44  |
|                | 2             | 7,25    | 10,56   | 7,95                  | 3,18   | 8,67   | 9,14   | 2,64   | ---   |
|                | 3             | 6,11    | 8,22    | 5,95                  | 7,83   | 4,29   | -2,12  | -1,71  | ---   |
| <b>KRT14</b>   | 1             | 8,53    | 8,15    | 7,46                  | 1,13   | 9,77   | -1,09  | 1,47   | 0,27  |
|                | 2             | 3,89    | 3,58    | 2,78                  | 4,04   | 3,24   | -1,26  | -1,07  | 2,91  |
|                | 3             | 2,55    | 2,25    | 1,82                  | 3,37   | 2,70   | -2,98  | -2,17  | -1,18 |
| <b>RRM2</b>    | 1             | 5,47    | 4,97    | 3,81                  | 1,83   | 4,27   | 3,16   | 4,91   | 3,09  |
|                | 2             | 6,02    | 5,41    | 4,38                  | 4,04   | 4,95   | 3,16   | 3,65   | 5,13  |
|                | 3             | 4,98    | 4,46    | 3,68                  | 4,01   | 4,44   | 2,46   | 2,97   | 3,67  |
| <b>FOSB</b>    | 1             | -5,79   | -10,39  | -10,25                | -12,36 | -11,10 | -10,68 | -10,63 | -8,83 |
|                | 2             | -4,94   | -6,72   | -6,87                 | -9,86  | -7,08  | -11,82 | -9,83  | -4,93 |
|                | 3             | -5,33   | -8,09   | -8,28                 | -10,05 | -8,68  | -10,41 | -11,59 | -6,42 |
| <b>CEACAM6</b> | 1             | 6,42    | 8,02    | 8,23                  | 4,50   | 2,21   | 10,53  | -0,19  | -0,17 |
|                | 2             | 3,00    | 4,72    | 4,29                  | 6,34   | 3,92   | -2,81  | 0,40   | -0,87 |
|                | 3             | 6,35    | 8,04    | 8,17                  | 4,13   | 7,83   | 10,13  | 5,85   | 3,62  |
| <b>CES1</b>    | 1             | -5,94   | -8,43   | -8,13                 | -8,74  | -9,04  | -8,39  | -7,12  | -8,21 |
|                | 2             | -6,12   | -8,47   | -8,18                 | -9,34  | -7,98  | -9,05  | -7,40  | -7,99 |
|                | 3             | -6,04   | -8,66   | -7,76                 | -9,67  | -7,71  | -7,99  | -8,54  | -6,59 |

FIG. 5

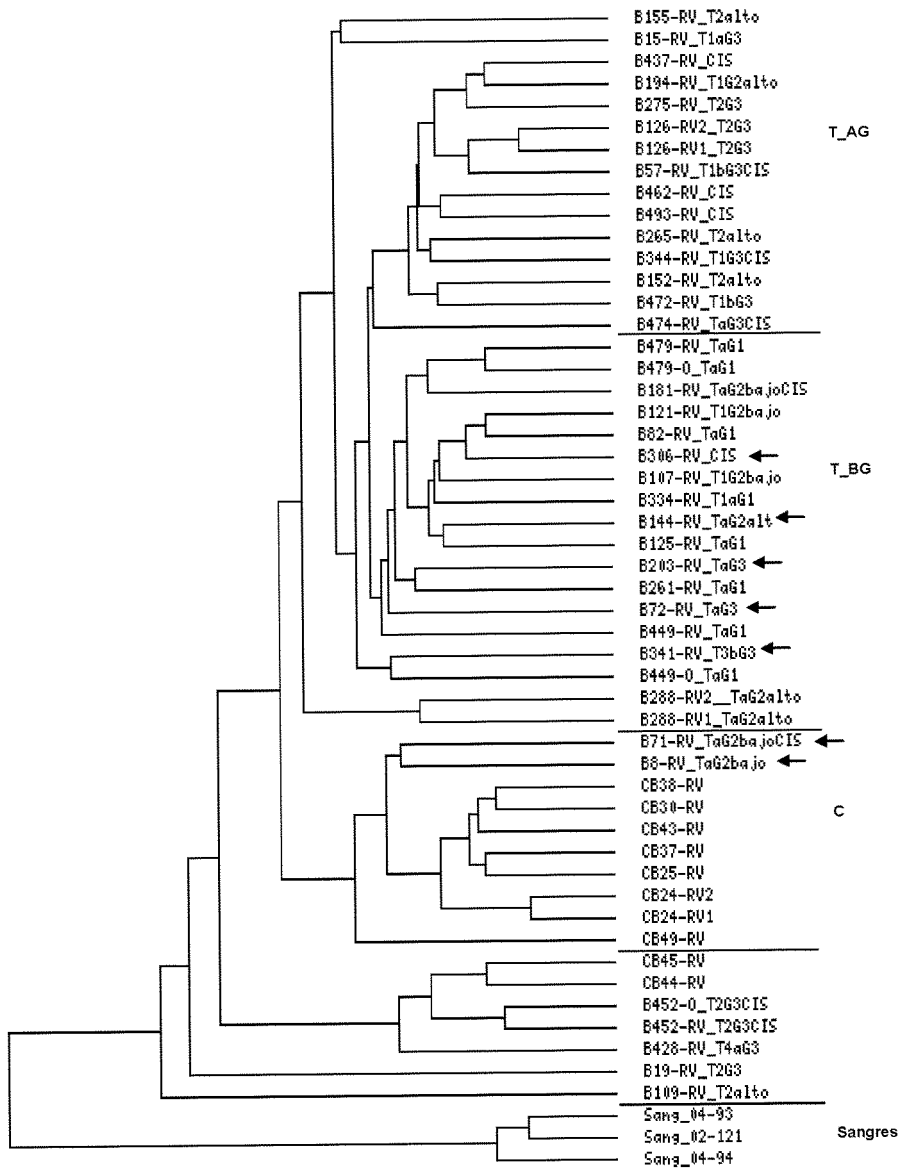


FIG. 6

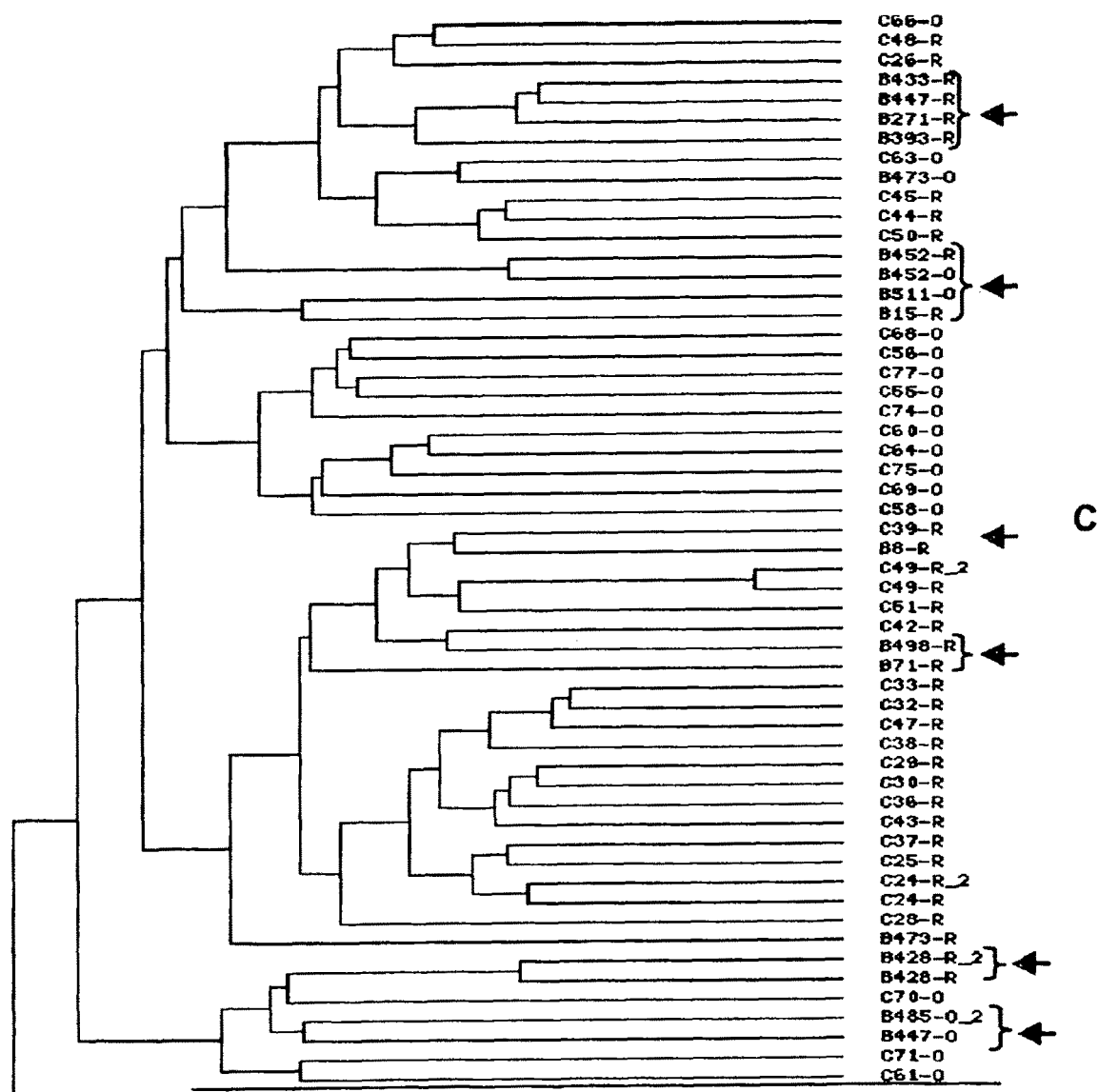


FIG. 7A

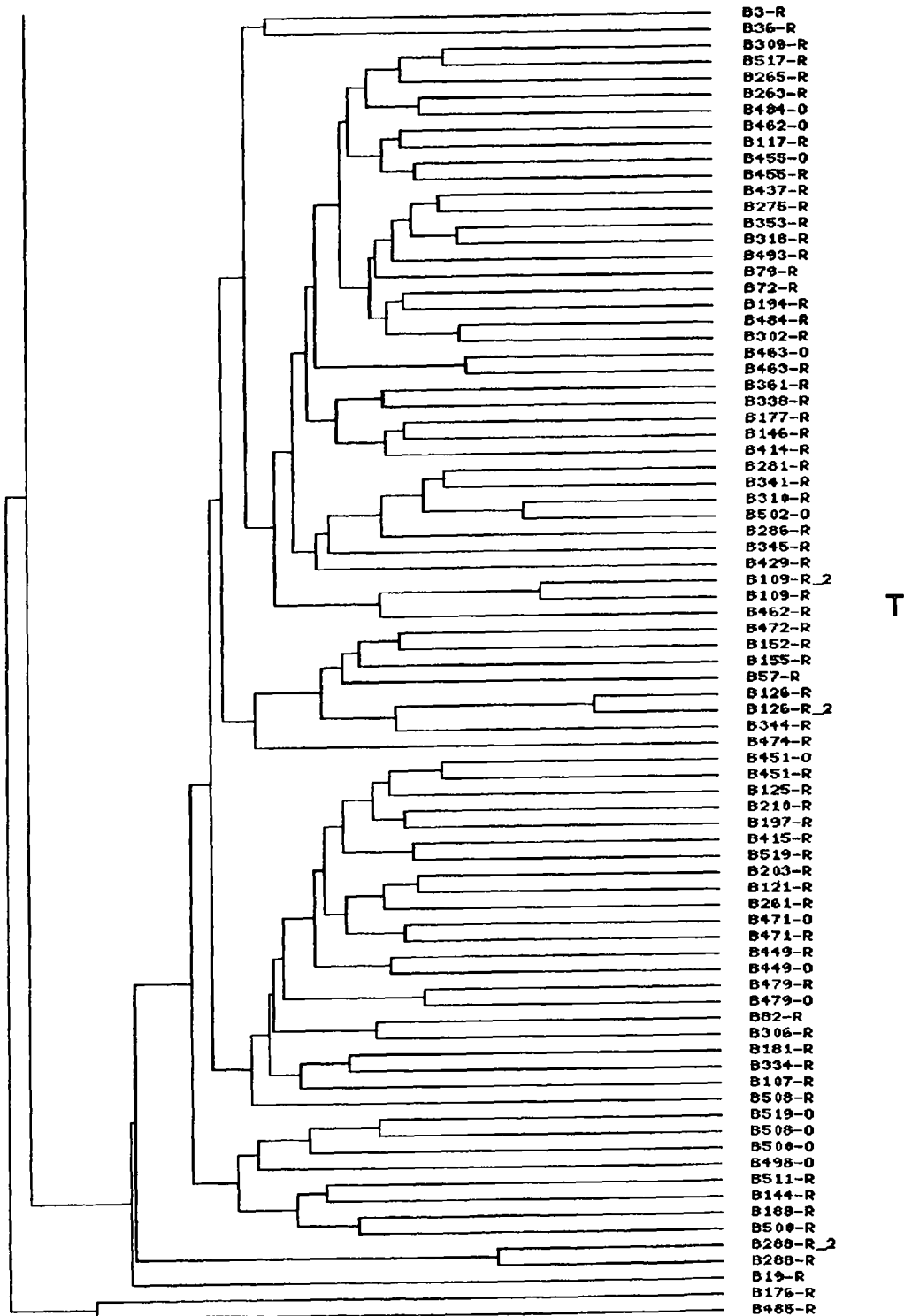


FIG. 7B

| Símbolo del gen | Clon de Affymetrix | TaqMan Gene Ensayo de expresión | RefSeq o Gene Banco de ARNm | Nombre del gen  |
|-----------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------------|---|
| ABCA8           | 204719_at          | <a href="#">Hs00200350_m1</a>   | <a href="#">NM_007168</a>   | ABC1 Miembro 8 de la subfamilia A de casete de unión a ATP  |
| ABL1            | 209765_at          | <a href="#">Hs00245445_m1</a>   | <a href="#">2 RefSeqs</a>   | Homólogo 1 del oncogen de la leucemia viral murina v-abl Abelson                                    |
| ADAM19          | 222162_s_at        | <a href="#">Hs00224960_m1</a>   | <a href="#">2 RefSeqs</a>   | Dominio de desintegrina y metaloproteinasa 19 meltrin-beta.   |
| ADAMTS1         | 201792_at          | <a href="#">Hs00199608_m1</a>   | <a href="#">NM_006988</a>   | Tipo similar a la desintegrina y reprotinasa de metaloproteasa con motivo 1 de tipo trombospondina. |
| AEBP1           | 206513_at          | <a href="#">Hs00371239_m1</a>   | <a href="#">NM_001129</a>   | Proteína 1 de unión a AE  |
| AIM2            | 206561_s_at        | <a href="#">Hs00175457_m1</a>   | <a href="#">NM_004833</a>   | Ausente en melanoma 2   |
| AKR1B10         | 228554_at          | <a href="#">Hs00252524_m1</a>   | <a href="#">NM_020299</a>   | Miembro B10 de la familia 1 de la aldo-eto reductasa, aldosa reductasa.                             |
| AL137566        | 202920_at          | <a href="#">Hs00612017_s1</a>   | <a href="#">AL137566</a>    |   |
| ANK2            | 222608_s_at        | <a href="#">Hs00153998_m1</a>   |                             | Anquirina 2 neuronal.   |
| ANLN            | 233011_at          | <a href="#">Hs00218803_m1</a>   | <a href="#">NM_018685</a>   | Homólogo de la proteína de unión a anilina actina de Drosophila                                     |
| ANXA1           | 210143_at          | <a href="#">Hs00167549_m1</a>   | <a href="#">NM_000700</a>   | Anexina A1.   |
| ANXA10          | 204894_s_at        | <a href="#">Hs00200464_m1</a>   | <a href="#">NM_007193</a>   | Anexina A10.  |
| AOC3            | 206632_s_at        | <a href="#">Hs00186647_m1</a>   | <a href="#">NM_003734</a>   | Amina oxidasa de cobre que contiene 2 proteínas de adhesión vascular 1.                             |
| APOBEC3B        | 205239_at          | <a href="#">Hs00358981_m1</a>   | <a href="#">NM_004900</a>   | ARNm de apolipoproteína B que edita 3B similar al polipéptido catalítico enzimático.                |
| AREG            | 225728_at          | <a href="#">Hs00155832_m1</a>   | <a href="#">NM_001657</a>   | Factor de crecimiento derivado del schwanoma de anfingulina   |
| ARGBP2          | 226834_at          | <a href="#">Hs00221428_m1</a>   | <a href="#">NM_021069</a>   | Proteína ArgBP2 de interacción con Abl  |
| ASAM            | 219918_s_at        | <a href="#">Hs00293345_m1</a>   | <a href="#">NM_024769</a>   | Molécula de adhesión específica de adipocitos.  |
| ASPM            |                    | <a href="#">Hs00411505_m1</a>   | <a href="#">NM_018136</a>   | Asp anormal microcefalia similar a huso asociada con Drosophila                                     |

FIG. 8A

|           |             |                      |                  |  |
|-----------|-------------|----------------------|------------------|--|
| ATF3      | 202672_s_at | <u>Hs00231069_m1</u> | <u>NM_001686</u> | Factor 2 activador de la transcripción.  |
| ATP5B     |             | <u>Hs00266077_m1</u> |                  |  |
| ATP8B2    | 226771_at   | <u>Hs00393111_m1</u> | <u>NM_020452</u> | Miembro 2 de ATPasa de clase I tipo 8B   |
| C2orf32   | 226751_at   | <u>Hs00384403_m1</u> | <u>NM_015463</u> | DKZFP566K1924. Marco de lectura abierto 32 del cromosoma 2.                            |
| OLFML1    | 217525_at   | <u>Hs00416948_m1</u> | <u>NM_198474</u> | MVAL564 UNQ564. OLFML1 similar a olfactomedina 1                                       |
| BAG2      | 209406_at   | <u>Hs00188716_m1</u> | <u>NM_004282</u> | Proteína Bcl-2 reguladora de la apoptosis.   |
| MGC16635  | 236285_at   | <u>Hs00536653_s1</u> | <u>NM_138433</u> | Hypothetical protein BC009980. LOC113730. Kelch repeat.                                |
| LOC387882 | 225105_at   | <u>Hs00329098_m1</u> | <u>NM_207376</u> |  |
| BMP5      | 205431_s_at | <u>Hs00234930_m1</u> | <u>NM_021073</u> | Proteína 5 morfogenética ósea.   |
| KLF9      | 203542_s_at | <u>Hs00230918_m1</u> | <u>NM_001206</u> | Proteína 1 de unión al elemento básico de la transcripción.                            |
| BUB1B     | 203755_at   | <u>Hs00176169_m1</u> | <u>NM_001211</u> | Gemación de BUB1 no inhibida por bencimidazoles homólogo 1 beta de levaduras           |
| C10orf3   | 218542_at   | <u>Hs00216688_m1</u> | <u>NM_0181</u>   | Marco de lectura abierto 3 del cromosoma 10.   |
| C10orf87  | 1552566_at  | <u>Hs00332436_m1</u> | <u>NM_144587</u> | Marco de lectura abierto 87 del cromosoma 10.  |
| C14orf78  | 212992_at   | <u>Hs00746838_s1</u> |                  | Marco de lectura abierto 78 del cromosoma 14.  |
| C2orf23   | 204364_s_at | <u>Hs00224761_m1</u> | <u>NM_022912</u> | Marco de lectura abierto 23 del cromosoma 2. TB2/DP1 y proteína relacionada con HVA22. |
| C6orf109  | 218883_s_at | <u>Hs00209864_m1</u> | <u>NM_015388</u> | Proteína 1 de interacción con el antígeno nuclear latente KSHV. KLIP1.                 |
| C7        | 202992_at   | <u>Hs00175109_m1</u> | <u>NM_000587</u> | Componente 7 del complemento.  |
| CA2       | 209301_at   | <u>Hs00163869_m1</u> | <u>NM_000067</u> | Anhidrasa carbónica II.  |
| CALD1     | 205525_at   | <u>Hs00189021_m1</u> |                  | Caldesmon 1.   |
| CAPNS2    | 223832_s_at | <u>Hs00260517_s1</u> | <u>NM_032330</u> | Subunidad 2 pequeña de calpaina.   |

**FIGURA 8B**

|         |             |                      |                  |   |
|---------|-------------|----------------------|------------------|---|
| CAV1    | 212097_at   | <u>Hs00184697_m1</u> | <u>NM_001753</u> | Proteína caveolina 1 caveolae de 22 kDa.  |
| CBFA2T1 | 228827_at   | <u>Hs00231702_m1</u> | 4 RefSeqs        | Dominio runt del factor de unión al núcleo, subunidad 2; translocado a 1; relacionado con la ciclina D. |
| CCL11   | 210133_at   | <u>Hs00237013_m1</u> | <u>NM_002986</u> | Ligando 11 del motivo C-C de quimioquina.   |
| CCL18   | 209924_at   | <u>Hs00268113_m1</u> | <u>NM_002988</u> | Ligando 18 del motivo C-C de quimioquina pulmonar y regulado por activación.                            |
| CCL2    | 216598_s_at | <u>Hs00234140_m1</u> | <u>NM_002982</u> | Ligando 2 del motivo C-C de quimioquina.  |
| CCNA2   | 203418_at   | <u>Hs00153138_m1</u> | <u>NM_001237</u> | Ciclina A2.   |
| CCNB1   | 214710_s_at | <u>Hs00259126_m1</u> | <u>NM_031966</u> | Ciclina B1.   |
| CCNB2   | 202705_at   | <u>Hs00270424_m1</u> | <u>NM_004701</u> | Ciclina B2.   |
| CCND1   |             | <u>Hs00277039_m1</u> | <u>NM_053056</u> | PRAD1 ciclina D1. Adenomatosis paratiroidea 1.  |
| CCND2   | 200953_s_at | <u>Hs00277041_m1</u> | <u>NM_001759</u> | Ciclina D2. Regulación del ciclo celular Citocinesis.   |
| CCNE1   |             | <u>Hs00233356_m1</u> | 2 RefSeqs        | Ciclina E1.   |
| CDC2    | 210559_s_at | <u>Hs00364293_m1</u> | <u>NM_001786</u> | Ciclo 2 G1 a S y G2 a M de la división celular.   |
| CDC20   | 202870_s_at | <u>Hs00415851_q1</u> | <u>NM_001255</u> | CDC20 Homólogo 20 del ciclo de división celular S. cerevisiae.  |
| CDC6    | 203967_at   | <u>Hs00154374_m1</u> | <u>NM_001254</u> | CDC6 Homólogo 6 del ciclo de división celular S. cerevisiae.  |
| CDCA1   | 223381_at   | <u>Hs00230097_m1</u> | 2 RefSeqs        | Ciclo de división celular 1 asociado.   |
| CDCA3   | 223307_at   | <u>Hs00229905_m1</u> | <u>NM_031299</u> | Ciclo de división celular 3 asociado.   |
| CDH1    |             | <u>Hs00170423_m1</u> | <u>NM_004360</u> | Caderina 1 Caderina E epitelial de tipo 1.  |
| CDH11   | 207173_x_at | <u>Hs00156438_m1</u> | 2 RefSeqs        | Caderina 11 Caderina OB de osteoblastos de tipo 2.  |
| CDH19   | 206898_at   | <u>Hs00253534_m1</u> | <u>NM_021153</u> | Caderina 19 de tipo 2.  |
| CDKN2A  |             | <u>Hs00233365_m1</u> | 3 RefSeqs        | Inhibidor quinasa 2A del melanoma p16 dependiente de ciclina inhibe CDK4.                               |
| CDKN2B  | 236313_at   | <u>Hs00365249_m1</u> | <u>NM_078487</u> | Inhibidor quinasa 2B del melanoma p15 dependiente de ciclina inhibe CDK4.                               |

**FIGURA 8 C**

|         |             |                   |           |                  |   |
|---------|-------------|-------------------|-----------|------------------|---|
| CDKN3   | 209714_s_at | <u>Hs00193192</u> | <u>m1</u> | <u>NM_005192</u> | Inhibidor quinasa 3 dependiente de ciclina fosfatasa de especificidad doble asociada con CDK2.                          |
| CEACAM6 | 211657_at   | <u>Hs00366002</u> | <u>m1</u> | <u>NM_002483</u> | Molécula 6 de adhesión celular asociada con el antígeno carcinoembrionario (antígeno inespecífico de reacción cruzada). |
| CEACAM7 | 206199_at   | <u>Hs00185152</u> | <u>m1</u> | <u>NM_006890</u> | Molécula 7 de adhesión celular 7 asociado con el antígeno carcinoembrionario.   |
| CENPA   | 204962_s_at | <u>Hs00156455</u> | <u>m1</u> | <u>NM_001809</u> | Proteína A del centrómero 17 kDa.   |
| CENPF   | 207828_s_at | <u>Hs00193201</u> | <u>m1</u> | <u>NM_016343</u> | Proteína F del centrómero de 350/400 kDa mitosis  |
| CFL2    | 224663_s_at | <u>Hs00368395</u> | <u>g1</u> |                  | Cofilina 2 del músculo.   |
| ChGn    | 219049_at   | <u>Hs00218054</u> | <u>m1</u> | <u>NM_018371</u> | Condroitin beta 4-N-acetilgalactosaminiltransferasa.  |
| CHI3L1  | 209395_at   | <u>Hs00609691</u> | <u>m1</u> | <u>NM_001276</u> | Glicoproteína-39 del cartilago 1 similar a la quitinasa 3.  |
| CKS2    | 204170_s_at | <u>Hs00854958</u> | <u>g1</u> | <u>NM_001827</u> | Subunidad 2 reguladora de la CDC28 proteína quinasa.  |
| CLCA2   | 206165_s_at | <u>Hs00197957</u> | <u>m1</u> | <u>NM_006536</u> | Miembro 2 de la familia de los canales de cloruro activados por calcio.   |
| CLCN3   | 201733_at   | <u>Hs00156527</u> | <u>m1</u> | <u>NM_001829</u> | Canal 3 de cloruro.   |
| CLIC3   | 219529_at   | <u>Hs00362166</u> | <u>g1</u> | <u>NM_004669</u> | Canal 3 de cloruro intracelular.  |
| CLIC4   | 201560_at   | <u>Hs00749895</u> | <u>s1</u> | <u>NM_013943</u> | Canal 4 de cloruro intracelular.  |
| COL14A1 | 212865_s_at | <u>Hs00385388</u> | <u>m1</u> |                  | Alfa 2 undulina de colágeno tipo XIV.   |
| COL15A1 | 203477_at   | <u>Hs00266332</u> | <u>m1</u> | <u>NM_001855</u> | Alfa 1 de colágeno tipo XV.   |
| COL1A2  | 202403_s_at | <u>Hs00164099</u> | <u>m1</u> | <u>NM_000089</u> | Alfa 2 de colágeno tipo I.  |
| COL3A1  | 215076_s_at | <u>Hs00164103</u> | <u>m1</u> | <u>NM_000090</u> | Colágeno tipo III alfa 1, síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV autosómico dominante.                                       |
| COL5A2  | 221730_at   | <u>Hs00169768</u> | <u>m1</u> | <u>NM_000393</u> | Colágeno tipo V alfa 2. Crecimiento celular y/o mantenimiento.  |
| COL6A1  | 213428_s_at | <u>Hs00242448</u> | <u>m1</u> | <u>NM_001848</u> | Colágeno tipo VI alfa 1. Adhesión celular.  |
| COL6A2  | 209156_s_at | <u>Hs00242484</u> | <u>m1</u> | <u>NM_001849</u> | Colágeno tipo VI alfa 2. Adhesión célula-célula.  |

**FIGURA 8D**



|              |             |                               |                           |  |
|--------------|-------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| COLEC12      | 221019_s_at | <a href="#">Hs00560477_m1</a> | <a href="#">2 RefSeqs</a> | Miembro 12 de la subfamilia de colectina.  |
| CPA3         | 205624_at   | <a href="#">Hs00157019_m1</a> | <a href="#">NM_001870</a> | Carboxipeptidasa A3, mastocitos.   |
| CPE          | 201116_s_at | <a href="#">Hs00175676_m1</a> | <a href="#">NM_001873</a> | Carboxipeptidasa E.  |
| CRH          | 205630_at   | <a href="#">Hs00174941_m1</a> | <a href="#">NM_000756</a> | Hormona liberadora de corticotropina.  |
| CRTAC1       | 221204_s_at | <a href="#">Hs00216208_m1</a> | <a href="#">NM_018058</a> | Proteína 1 ácida de cartilago.   |
| CTGF         | 209101_at   | <a href="#">Hs00170014_m1</a> | <a href="#">NM_001901</a> | Factor de crecimiento del tejido conjuntivo.   |
| CTSE         | 205927_s_at | <a href="#">Hs00157213_m1</a> |                           | Catepsina E  |
| CTTN         |             | <a href="#">Hs00193322_m1</a> | <a href="#">2 RefSeqs</a> | Cortactina.  |
| VSIG2        | 228232_s_at | <a href="#">Hs00204823_m1</a> | <a href="#">NM_014312</a> | Receptor X de timocitos corticales. Similar a CTZ de laevis.                         |
| CUGBP2       | 202157_s_at | <a href="#">Hs00272516_m1</a> | <a href="#">NM_006561</a> | Proteína 2 de unión al ARN, repetición triplete CUG.                                 |
| CXCL12       | 209687_at   | <a href="#">Hs00171022_m1</a> |                           | Ligando 12 del motivo C-X-C de quimioquina, factor 1 derivado de células estromales. |
| CXCR4        | 217028_at   | <a href="#">Hs00237052_m1</a> | <a href="#">NM_003467</a> | Receptor 4 del motivo C-X-C de quimioquinas.   |
| CYBRD1       | 222453_at   | <a href="#">Hs00227411_m1</a> | <a href="#">NM_024843</a> | Citocromo b reductasa 1. Transporte de electrones.                                   |
| CYP24A1      |             | <a href="#">Hs00167999_m1</a> | <a href="#">NM_000782</a> | Citocromo p450, familia 24, subfamilia A, polipéptido 1.                             |
| CYR61        | 201289_at   | <a href="#">Hs00155479_m1</a> | <a href="#">NM_001554</a> | Inductor 61 angiogénico rico en cisteína. Regulación del crecimiento celular.        |
| D4S234E      | 209569_x_at | <a href="#">Hs00205189_m1</a> | <a href="#">NM_014392</a> | Segmento de ADN en el cromosoma 4, secuencia 234 de expresión única.                 |
| DBC1         |             | <a href="#">Hs00180893_m1</a> | <a href="#">NM_014618</a> | Delecionado en el cáncer vesical 1.  |
| DCN          | 209335_at   | <a href="#">Hs00266491_m1</a> |                           | Decorina. Organogénesis.   |
| DF           | 205382_s_at | <a href="#">Hs00157263_m1</a> | <a href="#">NM_001928</a> | Componente D de la adipsina del complemento.   |
| DKFZp434B044 | 221541_at   | <a href="#">Hs00230322_m1</a> | <a href="#">NM_031476</a> | Proteína DKFZp434B044 hipotética.  |

**FIGURA 8E**

|                      |                      |                  |   |
|----------------------|----------------------|------------------|---|
| <i>DKFZp564O0823</i> | <u>Hs00209875_m1</u> | <u>NM_015393</u> | Proteína DKFZP564O0823  |
| <i>DKFZp586H2123</i> | <u>Hs00405837_m1</u> | <u>NM_015430</u> | Proteína DKFZP586H2123  |
| <i>DKK1</i>          | <u>Hs00163740_m1</u> | <u>NM_012242</u> | Homólogo 1 de Dickkopf de <i>Xenopus laevis</i> .   |
| <i>DLG7</i>          | <u>Hs00207323_m1</u> | <u>NM_014750</u> | Homólogo 7 de discos grandes, <i>Drosophila</i> .   |
| <i>DOC1</i>          | <u>Hs00706279_s1</u> |                  | Regulado por disminución en el cáncer de ovarios 1.   |
| <i>DPT</i>           | <u>Hs00170030_m1</u> | <u>NM_001937</u> | Dermatopontina. Adhesión celular.   |
| <i>DPYSL3</i>        | <u>Hs00181665_m1</u> | <u>NM_001387</u> | Similar a dihidropirimidina 3.  |
| <i>DSCR1L1</i>       | <u>Hs00195165_m1</u> | <u>NM_005822</u> | Gen 1 de la región crítica en el síndrome de Down, similar a 1  |
| <i>DTR</i>           | <u>Hs00181813_m1</u> | <u>NM_001945</u> | Receptor de la toxina diftérica, factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina. |
| <i>DUSP1</i>         | <u>Hs00610256_g1</u> | <u>NM_004417</u> | Fosfatasa 2 de especificidad doble.   |
| <i>E2F3</i>          | <u>Hs00605457_m1</u> | <u>NM_001949</u> | Factor 3 activador de la transcripción E2F.   |
| <i>EBF</i>           | <u>Hs00395513_m1</u> | <u>NM_024007</u> | Factor temprano de células B.   |
| <i>ECRG4</i>         | <u>Hs00260897_m1</u> | <u>NM_032411</u> | Proteína del gen 4 relacionado con el cáncer esofágico.   |
| <i>ECT2</i>          | <u>Hs00216455_m1</u> | <u>NM_018098</u> | Secuencia 2 del factor transformante de células epiteliales, oncogen.   |
| <i>EDNRA</i>         | <u>Hs00609865_m1</u> | <u>NM_001957</u> | Receptor de tipo A de endotelina.   |
| <i>EGR1</i>          | <u>Hs00152928_m1</u> | <u>NM_001964</u> | Respuesta temprana de crecimiento 1.  |
| <i>ENTPD3</i>        | <u>Hs00154325_m1</u> | <u>NM_001248</u> | Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 3.   |
| <i>EPHA3</i>         | <u>Hs00178327_m1</u> | <u>NM_005233</u> | EphA3.  |
| <i>EPHA7</i>         | <u>Hs00177891_m1</u> | <u>NM_004440</u> | EphA7.  |
| <i>ERBB2</i>         | <u>Hs00170433_m1</u> | <u>2_RefSeqs</u> | Homólogo 2 del oncogen de la leucemia viral eritroblástica V-erb-b2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog avian. |

**FIG. 8F**

|          |             |                      |                  |  |
|----------|-------------|----------------------|------------------|--|
| F3       | 204363_at   | <u>Hs00175225_m1</u> | <u>NM_001993</u> | Factor tisular de tromboplastina del factor III de coagulación.  |
| FABP4    | 203980_at   | <u>Hs00609791_m1</u> | <u>NM_001442</u> | Proteína 4 de unión a ácidos grasos, adipocitos.   |
| FABP6    | 210445_at   | <u>Hs00155029_m1</u> | <u>NM_001445</u> | Proteína 6 de unión a ácidos grasos,gastrotropina ileal.   |
| FAP      | 209955_s_at | <u>Hs00189476_m1</u> | <u>NM_004460</u> | Proteína alfa de activación de fibroblastos.   |
| FBLN1    | 202994_s_at | <u>Hs00242545_m1</u> | <u>4_RefSeqs</u> | Fibulina 1.  |
| FBLN5    | 203088_at   | <u>Hs00197064_m1</u> | <u>NM_006329</u> | Fibulina 5.  |
| FBN1     | 202766_s_at | <u>Hs00171191_m1</u> | <u>NM_000138</u> | Fibrilina 1, síndrome de Marfan.   |
| FBN2     | 203184_at   | <u>Hs00417208_m1</u> | <u>NM_001999</u> | Fibrilina 2, aracnodactilia contractual congénita.   |
| FBXO32   | 225328_at   | <u>Hs00369714_m1</u> |                  | Proteína 32 única de la caja F.  |
| FEN1     | 204768_s_at | <u>Hs00748727_s1</u> | <u>NM_004111</u> | Endonucleasa 1 específica de la estructura en alerón.  |
| FGF3     |             | <u>Hs00173742_m1</u> | <u>NM_005247</u> | Sitio v-int-2 de integración en el virus de tumor mamario murino del factor 3 de crecimiento de fibroblastos, oncogen homólogo |
| FGFR1    |             | <u>Hs00241111_m1</u> | <u>9_RefSeqs</u> | Tirosina quinasa 2 relacionada con el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos, Síndrome de Pfeiffer.              |
| FGFR3    | 204380_s_at | <u>Hs00179829_m1</u> | <u>2_RefSeqs</u> | Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos, enanismo tanatofórico acondroplasia.                                     |
| FGL2     | 227265_at   | <u>Hs00173847_m1</u> | <u>NM_006682</u> |  |
| FLJ10159 | 218974_at   | <u>Hs00215979_m1</u> | <u>NM_018013</u> | Proteína hipotética FLJ10159   |
| FLJ10719 | 213007_at   | <u>Hs00289551_m1</u> | <u>NM_018193</u> | Proteína hipotética FLJ10719   |
| FLJ11029 | 228273_at   | <u>Hs00383634_m1</u> | <u>NM_018304</u> | Proteína hipotética FLJ11029   |
| FLJ13710 | 222835_at   | <u>Hs00388227_m1</u> | <u>NM_024817</u> | Proteína hipotética FLJ13710.  |
| TSC      | 218872_at   | <u>Hs00215487_m1</u> | <u>NM_017899</u> | Proteína hipotética FLJ20607   |
| FLJ20701 | 219093_at   | <u>Hs00374054_g1</u> |                  | Proteína hipotética FLJ20701   |

**FIG. 8G**

|                 |             |                               |                           |  |
|-----------------|-------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| <i>FLJ21986</i> | 228728_at   | <a href="#">Hs00227735_m1</a> | <a href="#">NM_024913</a> | Proteína hipotética FLJ21986   |
| <i>FLJ23191</i> | 219747_at   | <a href="#">Hs00375503_m1</a> | <a href="#">NM_024574</a> | Proteína hipotética FLJ23191   |
| <i>SPOCD1</i>   | 235417_at   | <a href="#">Hs00375905_m1</a> | <a href="#">NM_144569</a> | Proteína hipotética FLJ2234. Región central S-II del factor de elongación de la transcripción. |
| <i>FLJ31052</i> | 238452_at   | <a href="#">Hs00708284_s1</a> | <a href="#">NM_152378</a> | Proteína hipotética FLJ31052   |
| <i>FLJ32569</i> | 239929_at   | <a href="#">Hs00611179_m1</a> | <a href="#">NM_152491</a> | Proteólisis y peptidólisis.  |
| <i>FLJ38736</i> | 227174_at   | <a href="#">Hs00419054_m1</a> | <a href="#">NM_182758</a> | Proteína hipotética FLJ138736.   |
| <i>FN1</i>      | 211719_x_at | <a href="#">Hs00365058_m1</a> | 7.RefSeqs                 | Fibronectina 1.  |
| <i>FNBP1</i>    | 212288_at   | <a href="#">Hs00390705_m1</a> | <a href="#">NM_015033</a> | Proteína 1 de unión a formina.   |
| <i>FOS</i>      | 209189_at   | <a href="#">Hs00170630_m1</a> | <a href="#">NM_005252</a> | Homólogo del oncogen del sarcoma viral murino V-fos FBJ.                                       |
| <i>FOSB</i>     | 202768_at   | <a href="#">Hs00171851_m1</a> | <a href="#">NM_006732</a> | Homólogo B del oncogen del osteosarcoma viral murino FBJ.                                      |
| <i>FOXF1</i>    | 205935_at   | <a href="#">Hs00230962_m1</a> | <a href="#">NM_001451</a> | Caja F1 Forkhead.  |
| <i>FOXM1</i>    | 202580_x_at | <a href="#">Hs00153543_m1</a> | 2.RefSeqs                 | Caja M1 Forkhead.  |
| <i>FYN</i>      | 210105_s_at | <a href="#">Hs00176628_m1</a> | 3.RefSeqs                 | Oncogen FYN relacionado con SRC FGR YES.   |
| <i>FZD7</i>     | 203706_s_at | <a href="#">Hs00275833_s1</a> | <a href="#">NM_003507</a> | Homólogo 7 Frizzled, Drosophila.   |
| <i>GATA6</i>    | 210002_at   | <a href="#">Hs00232018_m1</a> | <a href="#">NM_005257</a> | Proteína 6 de unión a GATA.  |
| <i>GEM</i>      | 204472_at   | <a href="#">Hs00170633_m1</a> | <a href="#">NM_005261</a> | Proteína de unión a GTP sobreexpresada en el músculo esquelético.                              |
| <i>GGH</i>      | 203560_at   | <a href="#">Hs00608257_m1</a> | <a href="#">NM_003878</a> | Gammaglutamil hidrolasa conjugada con folipoligammaglutamil hidrolasa.                         |
| <i>GHR</i>      | 205498_at   | <a href="#">Hs00174872_m1</a> | <a href="#">NM_000163</a> | Receptor de la hormona de crecimiento.   |
| <i>GJB2</i>     | 223278_at   | <a href="#">Hs00269615_s1</a> | <a href="#">NM_004004</a> | Proteína beta 2 de unión tipo PAG de 26 kDa, conexina 26. Señalización célula-célula.          |
| <i>GJB6</i>     | 231771_at   | <a href="#">Hs00272726_s1</a> | <a href="#">NM_006783</a> | Proteína beta 6 de unión tipo GAP, conexina 30.  |

**FIG. 8H**

|           |             |                      |                  |   |
|-----------|-------------|----------------------|------------------|---|
| GKN1      | 220191_at   | <u>Hs00219734_m1</u> | <u>NM_019617</u> | Gastroquina 1.  |
| GMNN      | 218350_s_at | <u>Hs00210707_m1</u> | <u>NM_015895</u> | Inhibidor de la replicación de ADN geminina.                                |
| GPC6      | 227059_at   | <u>Hs00170677_m1</u> | <u>NM_005708</u> | Glypican 6. Crecimiento y/o mantenimiento celular.                          |
| GPM6B     | 209167_at   | <u>Hs00383529_m1</u> | 4 RefSeqs        | Glicoproteína M6B.  |
| GPR124    | 221814_at   | <u>Hs00262150_m1</u> | <u>NM_032777</u> | Receptor 124 acoplado a proteína G.   |
| GREM1     | 218469_at   | <u>Hs00171951_m1</u> | <u>NM_013372</u> | Homólogo Kremlin 1, superfamilia nudo de cisteínas, <i>Xenopus laevis</i> . |
| GSN       |             | <u>Hs00609276_m1</u> | 2 RefSeqs        | Amiloidosis gelsolina, tipo finlandés.                                      |
| GULP1     | 204235_s_at | <u>Hs00169604_m1</u> | <u>NM_016315</u> | Dominio PTB adaptador de GULP que contiene 1.                               |
| GUSB      |             | <u>Hs99999908_m1</u> | <u>NM_000181</u> |   |
| H19       | 224646_x_at | <u>Hs00399294_g1</u> |                  | ARNm no traducido de expresión materna con huella H19.                      |
| HEPH      | 203903_s_at | <u>Hs00207710_m1</u> |                  | Hefastina.  |
| CFH       | 213800_at   | <u>Hs00164830_m1</u> | <u>NM_000186</u> | Factor H del complemento 1.   |
| HIST1H1C  | 209398_at   | <u>Hs00271185_s1</u> | <u>NM_005319</u> | Histona 1 H1c.  |
| HIST1H2BD | 209911_x_at | <u>Hs00371070_m1</u> | <u>NM_138720</u> | Histona 1 H2bd.   |
| HIST1H2BG | 210387_at   | <u>Hs00374317_s1</u> | <u>NM_003518</u> | Histona 1 H2bg.   |
| HIST2H2AA | 214290_s_at | <u>Hs00358508_s1</u> | <u>NM_003516</u> | Histona 2 H2aa.   |
| HIST2H2BE | 202708_s_at | <u>Hs00269023_s1</u> | <u>NM_003528</u> | Histona 2 H2be.   |
| HMGB2     | 208808_s_at | <u>Hs00357789_g1</u> | <u>NM_002129</u> | Caja 2 del grupo de alta movilidad.   |
| HMOX1     | 203665_at   | <u>Hs00157965_m1</u> | <u>NM_002133</u> | Deciclado 1, hemooxigenasa.   |
| HN1       | 217755_at   | <u>Hs00602957_m1</u> | 3 RefSeqs        | 1 de expresión hematológica y neurológica.                                  |

**FIG. 8I**

|                |             |                               |                           |  |
|----------------|-------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| <i>HOP</i>     | 211597_s_at | <a href="#">Hs00261238_m1</a> | <a href="#">3 RefSeqs</a> | Proteína de únicamente homeodominio.   |
| <i>HOXB6</i>   | 205366_s_at | <a href="#">Hs00255831_s1</a> | <a href="#">3 RefSeqs</a> | Homeo box B6.  |
| <i>HOXD4</i>   | 205522_at   | <a href="#">Hs00429605_m1</a> | <a href="#">NM_014621</a> | Homeo box D4.  |
| <i>HPRT</i>    |             | <a href="#">Hs99999909_m1</a> | <a href="#">NM_000194</a> |  |
| <i>HRAS</i>    |             | <a href="#">Hs00610483_m1</a> | <a href="#">NM_005343</a> |  |
| <i>HSPC150</i> | 223229_at   | <a href="#">Hs00204359_m1</a> | <a href="#">NM_014176</a> | Proteína HSPC150 similar a la enzima de conjugación de ubiquitina.                               |
| <i>HSPCB</i>   |             | <a href="#">Hs00607336_gH</a> | <a href="#">NM_007355</a> |  |
| <i>HTR1F</i>   |             | <a href="#">Hs00265296_s1</a> | <a href="#">NM_000866</a> | Receptor 1F DE 5-hidroxitriptamina serotonina.   |
| <i>IER3</i>    | 201631_s_at | <a href="#">Hs00174674_m1</a> | <a href="#">NM_003897</a> | Respuesta temprana inmediata 3.  |
| <i>IGF1</i>    | 209541_at   | <a href="#">Hs00153126_m1</a> | <a href="#">NM_000618</a> | Factor de crecimiento 1 similar a la insulina, somatomedina C.                                   |
| <i>IGF2</i>    | 210881_s_at | <a href="#">Hs00171254_m1</a> | <a href="#">NM_000612</a> | Factor de crecimiento 2 similar a la insulina, somatomedina A.                                   |
| <i>IGFBP3</i>  | 210095_s_at | <a href="#">Hs00181211_m1</a> | <a href="#">NM_000598</a> | Proteína 3 de unión del factor de crecimiento 3 similar a la insulina.                           |
| <i>IGFBP5</i>  | 211959_at   | <a href="#">Hs00181213_m1</a> | <a href="#">NM_000599</a> | Proteína 5 de unión del factor de crecimiento 3 similar a la insulina.                           |
| <i>IGHM</i>    | 216491_x_at | <a href="#">Hs00378512_m1</a> |                           | Región mu constante de cadena pesada de inmunoglobulinas.  |
| <i>IL6</i>     | 205207_at   | <a href="#">Hs00174131_m1</a> | <a href="#">NM_000600</a> | Interleucina 6 interferón beta 2.  |
| <i>INA</i>     | 204465_s_at | <a href="#">Hs00190771_m1</a> | <a href="#">NM_032727</a> | Proteína alfa del filamento intermedio neuronal internexina.                                     |
| <i>INHBA</i>   | 210511_s_at | <a href="#">Hs00170103_m1</a> | <a href="#">NM_002192</a> | Inhibina beta A activina A activita AB polipéptido alfa.   |
| <i>IQGAP3</i>  | 229490_s_at | <a href="#">Hs00603642_m1</a> | <a href="#">NM_178229</a> | Motivo IQ que contiene proteína 3 de activación de GTPasa. Proteína de activación de GTPasa Ras. |
| <i>ITGA8</i>   | AA903473    | <a href="#">Hs00233321_m1</a> | <a href="#">NM_003638</a> |  |
| <i>ITM2A</i>   | 202746_at   | <a href="#">Hs00191609_m1</a> | <a href="#">NM_004867</a> | Proteína 2A de membrana integral.  |

**FIG. 8J**

|          |             |                      |                  |  |
|----------|-------------|----------------------|------------------|--|
| JAM2     | 229127_at   | <u>Hs00221894_m1</u> | <u>NM_021219</u> | Molécula 2 de adhesión de unión  |
| JAM3     | 212813_at   | <u>Hs00230289_m1</u> | <u>NM_032801</u> | Molécula 3 de adhesión de unión  |
| JUNB     |             | <u>Hs00357891_s1</u> | <u>NM_002229</u> | Protooncogen Jun B.  |
| KCNK1    | 214595_at   | <u>Hs00158410_m1</u> | <u>NM_002237</u> | Miembro 1 de la subfamilia G de los canales de potasio dependientes de voltaje.  |
| KDELR3   | 204017_at   | <u>Hs00423556_m1</u> | <u>2_RefSegs</u> | Receptor 3 de retención, proteína del retículo endoplásmico KDEL Lys-Asp-Glu-Leu |
| KIAA0101 | 202503_s_at | <u>Hs00207134_m1</u> | <u>NM_014736</u> | Producto génico de KIAA0101  |
| KIAA0186 | 206102_at   | <u>Hs00221421_m1</u> | <u>NM_021067</u> | Producto génico de KIAA0186  |
| KIAA0992 | 200897_s_at | <u>Hs00363101_m1</u> | <u>NM_016081</u> | Paladina.  |
| KIF11    | 204444_at   | <u>Hs00189698_m1</u> | <u>NM_004523</u> | Miembro 11 de la familia de Quinesinas.  |
| KIF14    | 206364_at   | <u>Hs00208408_m1</u> | <u>NM_014875</u> | Miembro 14 de la familia de Quinesinas.  |
| KIF20A   | 218755_at   | <u>Hs00194882_m1</u> | <u>NM_005733</u> | Miembro 20A de la familia de Quinesinas.   |
| KIF2C    | 209408_at   | <u>Hs00199232_m1</u> | <u>NM_006845</u> | Miembro 2C de la familia de Quinesinas.  |
| KIF4A    | 218355_at   | <u>Hs00602211_g1</u> | <u>NM_012310</u> | Miembro 4A de la familia de Quinesinas.  |
| KISS1    |             | <u>Hs00158486_m1</u> | <u>NM_002256</u> | Supresor KISS-1 de metástasis.   |
| KLHL7    | 220239_at   | <u>Hs00375239_m1</u> | <u>NM_018846</u> | Homólogo 7 similar a Klech, Drosophila.  |
| KPNA2    | 201088_at   | <u>Hs00818252_g1</u> | <u>NM_002266</u> | Cohorte RAG de carioferina alfa 2, importina alfa 1.                             |
| KRT14    | 209351_at   | <u>Hs00265033_m1</u> | <u>NM_000526</u> | Queratina 12, epidermolisis ampollosa simple de Dowling-Meara Koebner.           |
| KRT20    | 213953_at   | <u>Hs00300643_m1</u> | <u>NM_019010</u> | Queratina 20   |
| KRT7     | 209016_s_at | <u>Hs00818825_m1</u> | <u>NM_005556</u> | Queratina 7  |
| LAF4     | 227198_at   | <u>Hs00171448_m1</u> | <u>NM_002285</u> | Proteína nuclear linfocide relacionada con AF4.                                  |

**FIG. 8K**

|                 |             |                      |                  |   |
|-----------------|-------------|----------------------|------------------|---|
| <i>LEPR</i>     | 209894_at   | <u>Hs00174497_m1</u> | <u>NM_002303</u> | Receptor leptina.   |
| <i>LGALS1</i>   | 201105_at   | <u>Hs00169327_m1</u> | <u>NM_002305</u> | Galectina 1 soluble de unión a lectina galactósido.                                 |
| <i>LIFR</i>     | 225575_at   | <u>Hs00158730_m1</u> | <u>NM_002310</u> | Receptor del factor inhibidor de leuemia.   |
| <i>LOC83468</i> | 227070_at   | <u>Hs00229917_m1</u> | <u>NM_031302</u> | Glicosiltransferasa.  |
| <i>LOX</i>      | 215446_s_at | <u>Hs00184700_m1</u> | <u>NM_002317</u> | Lisil oxidasa.  |
| <i>LPPR4</i>    | 213496_at   | <u>Hs00322721_m1</u> | <u>NM_014839</u> | Gen 1 relacionado con plasticidad.  |
| <i>LUM</i>      | 229554_at   | <u>Hs00158940_m1</u> | <u>NM_002345</u> | Lumicán.  |
| <i>LY6D</i>     | 206276_at   | <u>Hs00170353_m1</u> | <u>NM_003695</u> | Locus D, complejo 6 del antígeno linfocitario.                                      |
| <i>MAD2L1</i>   | 203362_s_at | <u>Hs00829154_g1</u> | <u>NM_002358</u> | Levadura 1 similar a deficiente en parad de la mitosis MAD2.                        |
| <i>MAGEA3</i>   | 209942_x_at | <u>Hs00366532_m1</u> | <u>NM_005362</u> | Familia A3 del antígeno del melanoma.   |
| <i>MAGEA9</i>   | 210437_at   | <u>Hs00245619_s1</u> | <u>NM_005365</u> | Familia A9 del antígeno del melanoma.   |
| <i>MAMDC2</i>   | 228885_at   | <u>Hs00299196_m1</u> | <u>NM_153267</u> | Dominio MAM que contiene 2.   |
| <i>MAN1C1</i>   | 214180_at   | <u>Hs00220595_m1</u> | <u>NM_020379</u> | Miembro 1 de la alfa manosidasa de clase 1 C.                                       |
| <i>MAP1B</i>    | 226084_at   | <u>Hs00195487_m1</u> | <u>2_RefSeqs</u> | Proteína 1 B asociada con microtúbulos.   |
| <i>MCM10</i>    | 220651_s_at | <u>Hs00218560_m1</u> | <u>2_RefSeqs</u> | 10S deficiente en mantenimiento del minicromosoma.                                  |
| <i>MCM2</i>     | 202107_s_at | <u>Hs00170472_m1</u> | <u>NM_004526</u> | Mitotina S deficiente en mantenimiento del minicromosoma 2 MCM2.                    |
| <i>MDM2</i>     |             | <u>Hs00242813_m1</u> | <u>3_RefSeqs</u> | Célula 3T3 transformada con Mdm2, minuto doble 2, proteína de ratón de unión a p53. |
| <i>MELK</i>     | 204825_at   | <u>Hs00207681_m1</u> | <u>NM_014791</u> | Cinasa de cremallera de leucina embrionaria materna.                                |
| <i>MFAP2</i>    | 203417_at   | <u>Hs00250064_m1</u> | <u>2_RefSeqs</u> | Proteína 1 asociada con las microfibrillas.   |
| <i>MFAP4</i>    | 212713_at   | <u>Hs00412974_m1</u> | <u>NM_002404</u> | Proteína 4 asociada con las microfibrillas.   |

FIG. 8L



|                 |              |                               |                           |   |
|-----------------|--------------|-------------------------------|---------------------------|---|
| <i>TUBB6</i>    | 209191_at    | <a href="#">Hs00603164_m1</a> | <a href="#">NM_032525</a> | Tubulina beta MGC4083.  |
| <i>MGC45780</i> | 229839_at    | <a href="#">Hs00382351_m1</a> | <a href="#">NM_173833</a> | Proteína hipotética.  |
| <i>MGC57827</i> | 225834_at    | <a href="#">Hs00822131_m1</a> | <a href="#">NM_207418</a> | Similar al gen RIKEN cDNA 2700049P18.   |
| <i>MGP</i>      | 202291_s_at  | <a href="#">Hs00179899_m1</a> | <a href="#">NM_000900</a> | Proteína Gla de la matriz   |
| <i>MK167</i>    | 212021_s_at  | <a href="#">Hs00606991_m1</a> | <a href="#">NM_002417</a> | Antígeno identificado mediante el anticuerpo monoclonal Ki-67.                                      |
| <i>MMD</i>      | 203414_at    | <a href="#">Hs00202450_m1</a> | <a href="#">NM_012329</a> | Asociado con la diferenciación de monocitos a macrófagos.   |
| <i>MMP1</i>     | 204475_at    | <a href="#">Hs00233958_m1</a> | <a href="#">NM_002421</a> | Matriz metaloproteínasa 1 colagenasa intersticial.  |
| <i>MMP12</i>    | 204580_at    | <a href="#">Hs00159178_m1</a> | <a href="#">NM_002426</a> | Matriz metaloproteínasa 12 elastasa de macrófagos.  |
| <i>MRS2L</i>    | 218538_s_at  | <a href="#">Hs00252895_m1</a> | <a href="#">NM_020662</a> | Factor de homeostasis de magnesio similar a MRS2, <i>S. cerevisiae</i> .                            |
| <i>MRV1</i>     | 226047_at    | <a href="#">Hs00180652_m1</a> |                           | Homólogo 1 sitio de integración del retrovirus murino.  |
| <i>MSRB3</i>    | 225782_at    | <a href="#">Hs00827017_m1</a> | <a href="#">NM_198080</a> | Metionina sulfoxido reductasa B3  |
| <i>MST1R</i>    | 205455_at    | <a href="#">Hs00234013_m1</a> | <a href="#">NM_002447</a> | Tirosina quinasa relacionada con c-met del receptor 1 de estimulación de macrófagos.                |
| <i>MTHFD2</i>   | 201761_at    | <a href="#">Hs00759197_s1</a> | <a href="#">NM_006636</a> | Meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa dependiente de NAD+ metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa |
| <i>MUC7</i>     |              | <a href="#">Hs00379529_m1</a> | <a href="#">NM_152291</a> | Mucina 7 salival.   |
| <i>MYADM</i>    | 225673_at    | <a href="#">Hs00414763_m1</a> | <a href="#">NM_138373</a> | Marcador de diferenciación asociada con mieloides.  |
| <i>MYBPC1</i>   | 214087_s_at  | <a href="#">Hs00159451_m1</a> |                           | Proteína C de unión a la miosina de tipo lento.   |
| <i>MYC</i>      |              | <a href="#">Hs00153408_m1</a> | <a href="#">NM_002467</a> | Homólogo aviar del oncogen de la mielocitomatosis viral V-mic.                                      |
| <i>NEK2</i>     | 204641_at    | <a href="#">Hs00601227_mH</a> | <a href="#">NM_002497</a> | Quinasa 2 relacionada con el gen a de nunca en la mitosis NIMA                                      |
| <i>NEXN</i>     | 1552309_a_at | <a href="#">Hs00332124_m1</a> | <a href="#">NM_144573</a> | Proteína de unión a la actina, Nexilina F   |
| <i>NFIA</i>     | 226806_s_at  | <a href="#">Hs00325656_m1</a> | <a href="#">NM_005595</a> |   |

FIG. 8M

|          |             |                               |                           |  |
|----------|-------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| NFIB     | 213029_at   | <a href="#">Hs00232149_m1</a> | <a href="#">NM_005596</a> | Factor nuclear I/B.  |
| NFIL3    | 203574_at   | <a href="#">Hs00356605_g1</a> | <a href="#">NM_005384</a> | Factor nuclear regulado por la interleucina 3.                                 |
| FLJ22595 | 220468_at   | <a href="#">Hs00540047_s1</a> | <a href="#">NM_025047</a> | Proteína hipotética FLJ122595  |
| NMES1    | 223484_at   | <a href="#">Hs00260902_m1</a> |                           | Mucosa normal del esófago 1 de esófago. Núcleo.                                |
| NM1T     | 202237_at   | <a href="#">Hs00196287_m1</a> | <a href="#">NM_006169</a> | Nicotinamida-N-metiltransferasa.   |
| NOPE     | 227870_at   | <a href="#">Hs00326335_m1</a> | <a href="#">NM_020962</a> | Ortólogo probable del vecino de ratón de Punc E11.                             |
| NQO1     | 201468_s_at | <a href="#">Hs00168547_m1</a> | <a href="#">NM_000903</a> | NADPH deshidrogenasa quinona 1.  |
| NR2F1    | 209505_at   | <a href="#">Hs00818842_m1</a> | <a href="#">NM_005654</a> | Miembro 1 del grupo F, subfamilia 2, del receptor nuclear.                     |
| NR4A1    | 202340_x_at | <a href="#">Hs00172437_m1</a> | <a href="#">NM_173157</a> | Miembro 1 del grupo A, subfamilia 4, del receptor nuclear.                     |
| NR4A2    | 204621_s_at | <a href="#">Hs00428691_m1</a> | 4 RefSeqs                 | Miembro 2 del grupo A, subfamilia 4, del receptor nuclear.                     |
| NR4A3    | 209959_at   | <a href="#">Hs00175077_m1</a> |                           | Miembro 3 del grupo A, subfamilia 4, del receptor nuclear.                     |
| NTNG2    |             | <a href="#">Hs00287286_m1</a> | <a href="#">NM_032536</a> | Neitrina G2.   |
| NUSAP1   | 218039_at   | <a href="#">Hs00153533_m1</a> | <a href="#">NM_016359</a> | Proteína 1 asociada con el nucleolo y el huso.                                 |
| OAS1     | 202869_at   | <a href="#">Hs00242943_m1</a> | 2 RefSeqs                 | 2' 5'-oligoadenilato sintetasa 1 40/46kDa.                                     |
| OLFML3   | 218162_at   | <a href="#">Hs00220180_m1</a> | <a href="#">NM_020190</a> | 3 similar a olfatomedina.  |
| OSR2     | 213568_at   | <a href="#">Hs00369588_m1</a> | <a href="#">NM_053001</a> | Proteína 2A relacionada con Odd-skipped.                                       |
| PDGFC    |             | <a href="#">Hs00211916_m1</a> | <a href="#">NM_016205</a> |  |
| PDGFRA   | 203131_at   | <a href="#">Hs00183486_m1</a> | <a href="#">NM_006206</a> | Alfa polipéptido del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. |
| PDLIM3   | 209621_s_at | <a href="#">Hs00205533_m1</a> | <a href="#">NM_014476</a> | Dominio 3 de PDZ y LIM.  |
| PDZRN3   | 212915_at   | <a href="#">Hs00392900_m1</a> |                           | Dominio PDZ que contiene el dedo RING 3.                                       |

**FIG. 8N**

|                   |             |                               |                           |  |
|-------------------|-------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| <i>PEG10</i>      | 212094_at   | <a href="#">Hs00248288_s1</a> | <a href="#">NM_015068</a> | 10 de expresión paterna.   |
| <i>PFKFB3</i>     | 202464_s_at | <a href="#">Hs00190079_m1</a> | <a href="#">NM_004566</a> | 6-fosofructo-2-quinasa/fructosa-2-6-bisfosfatasa 3.  |
| <i>Pfs2</i>       | 221521_s_at | <a href="#">Hs00211479_m1</a> | <a href="#">NM_016095</a> | Proteína PSF2 del complejo GINS de replicación de ADN. Replicación de ADN.                     |
| <i>PGM5</i>       | 226303_at   | <a href="#">Hs00222671_m1</a> | <a href="#">NM_021965</a> | Fosfoglucomutasa 5. Unión de adherencia célula-célula.   |
| <i>PLA2G2A</i>    | 203649_s_at | <a href="#">Hs00179698_m1</a> | <a href="#">NM_000300</a> | Fosfolipasa A2, plaquetas grupo IIA, líquido sinovial. Catabolismo de los lípidos              |
| <i>PLAGL1</i>     | 209318_x_at | <a href="#">Hs00243030_m1</a> | <a href="#">NM_002656</a> | 1 similar al gen de adenoma peliomórfico.  |
| <i>PLCB4</i>      | 203895_at   | <a href="#">Hs00168656_m1</a> |                           | Fosfolipasa C beta 4.  |
| <i>PLEKHC1</i>    | 209209_s_at | <a href="#">Hs00235033_m1</a> | <a href="#">NM_006832</a> | Familia C que contiene dominio de homología con pleckstrina con miembro 1 del dominio FERM.    |
| <i>PLN</i>        | 204939_s_at | <a href="#">Hs00160179_m1</a> | <a href="#">NM_002667</a> | Fosfolambano.  |
| <i>PLSCR4</i>     | 218901_at   | <a href="#">Hs00220482_m1</a> | <a href="#">NM_020353</a> | Escramblasa de fosfolípidos 4.   |
| <i>PMP22</i>      | 210139_s_at | <a href="#">Hs00165556_m1</a> |                           | Proteína 22 de mielina periférica.   |
| <i>POLQ</i>       | 219510_at   | <a href="#">Hs00198196_m1</a> | <a href="#">2 RefSeqs</a> | Teta dirigida a la ADN polimerasa.   |
| <i>POSTN</i>      | 155578_a_at | <a href="#">Hs00170815_m1</a> | <a href="#">NM_006475</a> | Factor específico de periosina de osteoblastos.  |
| <i>POU1F1</i>     |             | <a href="#">Hs00230821_m1</a> | <a href="#">NM_000306</a> | Dominio POU, factor 1 de transcripción de clase 1, factor 1 de la hormona de crecimiento Pit1. |
| <i>PPIA o CYC</i> |             | <a href="#">Hs99999904_m1</a> | <a href="#">3 RefSeqs</a> |  |
| <i>PPP1R12B</i>   | 201957_at   | <a href="#">Hs00364078_m1</a> |                           | Subunidad 12B inhibidora reguladora de la proteína fosfatasa 1.                                |
| <i>PPP1R14D</i>   | 220082_at   | <a href="#">Hs00214613_m1</a> | <a href="#">NM_017726</a> | Subunidad 14D inhibidora reguladora de la proteína fosfatasa 1.                                |
| <i>PRC1</i>       | 218009_s_at | <a href="#">Hs00187740_m1</a> |                           | Proteína reguladora de la citocinesis 1.   |
| <i>PRKAR2B</i>    | 203680_at   | <a href="#">Hs00176966_m1</a> | <a href="#">NM_002736</a> | Proteína cinasa reguladora de tipo II beta dependiente de AMPc.                                |
| <i>PRL</i>        |             | <a href="#">Hs00168730_m1</a> | <a href="#">NM_000948</a> | Prolactina.  |

**FIG. 80**

|         |              |                      |                  |  |
|---------|--------------|----------------------|------------------|--|
| PSAT1   | 223062_s_at  | <u>Hs00795278_mH</u> | <u>2 RefSeqs</u> | Fosfoserina aminotransferasa 1.  |
| PTCH    |              | <u>Hs00181117_m1</u> | <u>NM_000264</u> | Homólogo parcheado de Drosophila.  |
| PTEN    |              | <u>Hs00829813_s1</u> | <u>NM_000314</u> | Homólogo de fosfatasa y tensina mutado en múltiples cánceres avanzados 1.                                  |
| PTGS2   | 1554997_a_at | <u>Hs00153133_m1</u> | <u>NM_000963</u> | Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa.                         |
| PTN     | 211737_x_at  | <u>Hs00383235_m1</u> | <u>NM_002825</u> | Factor de crecimiento de unión a pleiotrofina heparina y factor estimulador del crecimiento de neuritas 1. |
| PTPRC   |              | <u>Hs00236304_m1</u> | <u>3 RefSeqs</u> |  |
|         |              | <u>Hs00396859_m1</u> | <u>NM_012232</u> | Polimerasa I y factor de liberación del transcrito abans AL545542.   |
| PTRF    | 1557938_s_at | <u>Hs00212407_m1</u> | <u>NM_013277</u> | Miembro RAB23 de la familia del oncogen RAS.   |
| RAB23   | 229504_at    | <u>Hs00212407_m1</u> | <u>NM_021785</u> | Proteína 1 activadora de Rac GTPasa.   |
| RACGAP1 | 222077_s_at  | <u>Hs00374747_m1</u> | <u>NM_016448</u> | Inducido por ácido retinoico.  |
| RAI2    | 219440_at    | <u>Hs00253960_s1</u> | <u>NM_016448</u> | Proteína asociada con la matriz nuclear regulada por RA.   |
| RAMP    | 218585_s_at  | <u>Hs00212788_m1</u> | <u>NM_016563</u> | Familia similar a RAS 12.  |
| RASL12  | 219167_at    | <u>Hs00275429_m1</u> | <u>NM_000321</u> | Retinoblastoma 1 incluyendo osteosarcoma.  |
| RB1     |              | <u>Hs00153108_m1</u> | <u>NM_153020</u> | Proteína con motivo de unión a ARN 24.   |
| RBM24   | 235004_at    | <u>Hs00290607_m1</u> | <u>NM_021111</u> | Proteína rica en cisteína inductora de inversión con motivos kazal.  |
| RECK    | 205407_at    | <u>Hs00221638_m1</u> | <u>2 RefSeqs</u> | Activador C del factor de replicación 1 3 de 38 kDa. Replicación de ADN.                                   |
| RFC3    | 204127_at    | <u>Hs00161357_m1</u> | <u>NM_002922</u> | Regulator of G-protein signalling 1. Immune response.  |
| RGS1    | 216834_at    | <u>Hs00175260_m1</u> | <u>NM_003725</u> | Familia 4 de la ribonucleasa ARNasa.   |
| RNASE4  | 213397_x_at  | <u>Hs00377763_m1</u> |                  | 3-hidroxiesteroide epimerasa.  |
| RODH    | 205700_at    | <u>Hs00366258_m1</u> |                  |  |

FIG. 8P

|                 |              |                               |                           |  |
|-----------------|--------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| <i>RPEP</i>     | 235210_s_at  | <a href="#">Hs00541931_m1</a> | <a href="#">NM_153225</a> | RPE-espondina.   |
| <i>RRM2</i>     | 209773_s_at  | <a href="#">Hs00357247_g1</a> | <a href="#">NM_001034</a> | Polipéptido M2 de ribonucleótido reductasa.  |
| <i>S100A10</i>  | 238909_at    | <a href="#">Hs00741221_m1</a> | <a href="#">NM_002966</a> | Proteína S100 de unión a calcio, ligando II de la anexina A10 polipéptido p11 de la cadena ligera de calpactina I. |
| <i>SBLF</i>     | 213413_at    | <a href="#">Hs00538897_m1</a> |                           | Factor similar a Stoned B.   |
| <i>SCN7A</i>    | 228504_at    | <a href="#">Hs00161546_m1</a> | <a href="#">NM_002976</a> | Alfa tipo VII de canales de sodio dependientes de voltaje.   |
| <i>SELL</i>     | 204563_at    | <a href="#">Hs00174151_m1</a> | <a href="#">NM_000655</a> | Molécula 1 de adhesión linfocitaria a selectina L.   |
| <i>SELM</i>     | 226051_at    | <a href="#">Hs00369741_m1</a> | <a href="#">NM_080430</a> | Selenoproteína M.  |
| <i>SERPINB3</i> | 209719_x_at  | <a href="#">Hs00199468_m1</a> | <a href="#">NM_006919</a> | Miembro 3 de ovoalbúmina grupo B, inhibidor de serina o cisteína proteinasa.                                       |
| <i>SETBP1</i>   | 205933_at    | <a href="#">Hs00210209_m1</a> | <a href="#">NM_015559</a> | Proteína 1 de unión a SET.   |
| <i>SFRP1</i>    | 202037_s_at  | <a href="#">Hs00610060_m1</a> | <a href="#">NM_003012</a> | Proteína 1 secretada relacionada con frizzled.   |
| <i>SLC1A6</i>   | 1554593_s_at | <a href="#">Hs00192604_m1</a> | <a href="#">NM_005071</a> | Miembro 6 de la familia 1 de transportadores de solutos, transportador de aspartato/glutamato de alta afinidad.    |
| <i>SLIT2</i>    | 209897_s_at  | <a href="#">Hs00191193_m1</a> | <a href="#">NM_004787</a> | Homólogo 2 slit ( <i>Drosophila</i> ).   |
| <i>SMAD6</i>    |              | <a href="#">Hs00178579_m1</a> | <a href="#">NM_005585</a> | Madres SMAD contra el homólogo DPP 6 de <i>Drosophila</i> .  |
| <i>SMOC2</i>    | 223235_s_at  | <a href="#">Hs00405777_m1</a> | <a href="#">NM_022138</a> | Unión 2 de calcio modular relacionada con SPARC.   |
| <i>SNX10</i>    | 218404_at    | <a href="#">Hs00203362_m1</a> | <a href="#">NM_013322</a> | Clasificación nexina 10.   |
| <i>SOCS3</i>    | 227697_at    | <a href="#">Hs00269575_s1</a> | <a href="#">NM_003955</a> | Supresor de la señalización 3 de citocinas.  |
| <i>SOX4</i>     | 213668_s_at  | <a href="#">Hs00268388_s1</a> | <a href="#">NM_003107</a> | Región determinante del sexo SRY, caja Y 4.  |
| <i>SOX9</i>     | 202935_s_at  | <a href="#">Hs00165814_m1</a> | <a href="#">NM_000346</a> | Región determinante del sexo SRY, caja Y 9, displasia campomélica, autosómica de inversión por sexo.               |
| <i>SPARCL1</i>  | 200795_at    | <a href="#">Hs00190740_m1</a> | <a href="#">NM_004684</a> | Hevina mast9 similar a SPARC.  |
| <i>SPON1</i>    | 209436_at    | <a href="#">Hs00323883_m1</a> |                           | Proteína 1 de matriz extracelular, espondina.  |

FIG. 8Q

|                |              |                               |                           |  |
|----------------|--------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| <i>SPP1</i>    | 209875_s_at  | <a href="#">Hs00167093_m1</a> | <a href="#">NM_000582</a> | Sialoproteína ósea osteopontina 1 de fosfoproteína secretada, activación temprana 1 de linfocitos T. |
| <i>SPRR3</i>   | 218990_s_at  | <a href="#">Hs00271304_m1</a> | <a href="#">NM_005416</a> | Proteína 3 pequeña rica en prolina. Actividad de molécula estructura.                                |
| <i>SRPX</i>    | 204955_at    | <a href="#">Hs00196867_m1</a> | <a href="#">NM_006307</a> | Proteína que contiene repeticiones de Sushi, ligada a X.   |
| <i>STC1</i>    | 230746_s_at  | <a href="#">Hs00174970_m1</a> | <a href="#">NM_003155</a> | Estaniocalcina 1.  |
| <i>STK6</i>    | 208079_s_at  | <a href="#">Hs00269212_m1</a> | <a href="#">NM_003600</a> | Serina/treonina quinasa 6.   |
| <i>STN2</i>    | 235852_at    | <a href="#">Hs00263833_m1</a> | <a href="#">NM_033104</a> | Estonina 2.  |
| <i>SULF1</i>   | 212354_at    | <a href="#">Hs00290918_m1</a> | <a href="#">NM_015170</a> | Sulfatasa 1.   |
| <i>SULT1E1</i> | 219934_s_at  | <a href="#">Hs00193690_m1</a> | <a href="#">NM_005420</a> | Miembro 1 de preferencia de estrógenos, familia 1E de sulfotransferasas.                             |
| <i>TCF21</i>   | 204931_at    | <a href="#">Hs00162646_m1</a> |                           | Factor 21 de transcripción.  |
| <i>TCF8</i>    | 212764_at    | <a href="#">Hs00611018_m1</a> | <a href="#">NM_030751</a> | El factor 8 de transcripción reprime la expresión de la interleucina 2.                              |
| <i>TCN1</i>    | 205513_at    | <a href="#">Hs00169055_m1</a> | <a href="#">NM_001062</a> | transcobalamina 1 (proteína de unión a vitamina B12, familia de unión R).                            |
| <i>TEAD2</i>   | 226408_at    | <a href="#">Hs00366217_m1</a> | <a href="#">NM_003598</a> | Miembro 2 de la familia del dominio TEA.   |
| <i>TEGT</i>    |              | <a href="#">Hs00162661_m1</a> | <a href="#">NM_003217</a> |  |
| <i>TERT</i>    |              | <a href="#">Hs00162669_m1</a> | <a href="#">2_RefSeqs</a> | Telomerasa Transcriptasa inversa.  |
| <i>TGFB11</i>  | 209651_at    | <a href="#">Hs00210887_m1</a> | <a href="#">NM_015927</a> | Tránsito 1 inducido por el factor transformante de crecimiento beta 1.                               |
| <i>TIMP2</i>   | 224560_at    | <a href="#">Hs00234278_m1</a> | <a href="#">NM_003255</a> | Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2.  |
| <i>TK1</i>     | 1554408_a_at | <a href="#">Hs00177406_m1</a> | <a href="#">NM_003258</a> | Timidina cinasa 1 soluble.   |
| <i>TMPO</i>    | 203432_at    | <a href="#">Hs00162842_m1</a> | <a href="#">NM_003276</a> | Timipoetina. Unión a ADN.  |
| <i>TNA</i>     | 205200_at    | <a href="#">Hs00162844_m1</a> | <a href="#">NM_003278</a> | Tetranequina.  |
| <i>TNC</i>     | 201645_at    | <a href="#">Hs00233648_m1</a> | <a href="#">NM_002160</a> | Tenascina C.   |

FIG. 8R

|         |             |                      |                  |   |
|---------|-------------|----------------------|------------------|---|
| TNRC9   | 216623_x_at | <u>Hs00300355_m1</u> |                  | Repetición de trinucleótidos que contienen 9.                                   |
| TOP2A   | 201291_s_at | <u>Hs00172214_m1</u> | <u>NM_001067</u> | Topoisomerasa ADN alfa II 170 kDa.  |
| TOPK    | 219148_at   | <u>Hs00218544_m1</u> | <u>NM_018492</u> | Proteína cinasa originada en células T-LAK.                                     |
| TP53    |             | <u>Hs00153349_m1</u> | <u>NM_000546</u> | Proteína Tumoral p53, síndrome de Li-Fraumeni.                                  |
| TPX2    | 210052_s_at | <u>Hs00201616_m1</u> | <u>NM_012112</u> | Homólogo de la proteína asociada a microtúbulos TPX2 de <i>Xenopus laevis</i> . |
| TRIP13  | 204033_at   | <u>Hs00188500_m1</u> | <u>NM_004237</u> | Interaccionador 12 del receptor de hormonas tiroideas.                          |
| TSPAN-2 | 227236_at   | <u>Hs00194836_m1</u> | <u>NM_005725</u> | Tetraspan 2. Motilidad celular.   |
| TTK     | 204822_at   | <u>Hs00177412_m1</u> | <u>NM_003318</u> | Proteína cinasa TTK.  |
| TU3A    | 209074_s_at | <u>Hs00200376_m1</u> | <u>NM_007177</u> | Proteína TU3A.  |
| TYMS    | 202589_at   | <u>Hs00426591_m1</u> | <u>NM_001071</u> | Timidilato sintetasa.   |
| UBD     | 205890_s_at | <u>Hs00197374_m1</u> | <u>NM_006398</u> | Ubiquitina D.   |
| UBE2C   | 202954_at   | <u>Hs00738962_m1</u> | <u>NM_181799</u> | Enzima de conjugación con ubiquitina E2C.                                       |
| UHRF1   | 225655_at   | <u>Hs00273589_m1</u> | <u>NM_013282</u> | Similar a ubiquitina que contiene dominios digitales 1 PHD y RING.              |
| URB     | 225242_s_at | <u>Hs00736722_m1</u> |                  | Gen 1 sensible a esteroides.  |

FIG. 8S

|        |             |                      |                  |  |
|--------|-------------|----------------------|------------------|--|
| WFDC1  | 219478_at   | <u>Hs00221849_m1</u> | <u>NM_021197</u> | Dominio 1 WAP de núcleo de cuatro disulfuros.                        |
| WISP1  | 229802_at   | <u>Hs00366573_m1</u> | <u>2 RefSegs</u> | Proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1.             |
| ZAK    | 225665_at   | <u>Hs00370447_m1</u> | <u>2 RefSegs</u> | Motivo alfa estéril y cremallera de leucina que contiene cinasa AZK. |
| ZBTB16 | 228854_at   | <u>Hs00232313_m1</u> | <u>NM_006006</u> | Dedo de cinc t dominio BTB que contiene 16.                          |
| ZFP36  | 201531_at   | <u>Hs00185658_m1</u> | <u>NM_003407</u> | Proteína 36 del dedo de cinc, homólogo de tipo C3H de ratón.         |
| ZNF217 |             | <u>Hs00232417_m1</u> | <u>NM_006526</u> | Proteína 217 del dedo de cinc.                                       |
| ZWINT  | 204026_s_at | <u>Hs00199952_m1</u> |                  | Factor de interacción ZW10.  |
| ZYX    |             | <u>Hs00170299_m1</u> | <u>NM_003461</u> | Zixina. Adhesión celular.  |
| 18S    |             | <u>Hs99999901_s1</u> |                  | ARNr eucariótico de 18s.   |

FIG. 8T



## ES 2 357 784 T3

| <b>Símbolo del gen</b> | <b>TaqMan Gene<br/>Ensayo de expresión</b> |
|------------------------|--|
| <i>ANK2</i>            | <u>Hs00153998_m1</u>                       |
| <i>ANLN</i>            | <u>Hs00218803_m1</u>                       |
| <i>ANXA10</i>          | <u>Hs00200464_m1</u>                       |
| <i>APOBEC3B</i>        | <u>Hs00358981_m1</u>                       |
| <i>ASAM</i>            | <u>Hs00293345_m1</u>                       |
| <i>ASPM</i>            | <u>Hs00411505_m1</u>                       |
| <i>BUB1B</i>           | <u>Hs00176169_m1</u>                       |
| <i>C10orf3</i>         | <u>Hs00216688_m1</u>                       |
| <i>C14orf78</i>        | <u>Hs00746838_s1</u>                       |
| <i>CCNA2</i>           | <u>Hs00153138_m1</u>                       |
| <i>CCNB1</i>           | <u>Hs00259126_m1</u>                       |
| <i>CDC2</i>            | <u>Hs00364293_m1</u>                       |
| <i>CDC20</i>           | <u>Hs00415851_q1</u>                       |
| <i>CDCA1</i>           | <u>Hs00230097_m1</u>                       |
| <i>CDCA3</i>           | <u>Hs00229905_m1</u>                       |
| <i>CDKN3</i>           | <u>Hs00193192_m1</u>                       |
| <i>CENPA</i>           | <u>Hs00156455_m1</u>                       |
| <i>CENPF</i>           | <u>Hs00193201_m1</u>                       |
| <i>CFH</i>             | <u>Hs00164830_m1</u>                       |
| <i>ChGn</i>            | <u>Hs00218054_m1</u>                       |
| <i>COL1A2</i>          | <u>Hs00164099_m1</u>                       |
| <i>CRH</i>             | <u>Hs00174941_m1</u>                       |
| <i>CTSE</i>            | <u>Hs00157213_m1</u>                       |
| <i>CYP24A1</i>         | <u>Hs00167999_m1</u>                       |

**FIG. 9A**

## ES 2 357 784 T3

|                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| <i>DLG7</i>     | <u>Hs00207323_m1</u> |
| <i>EBF</i>      | <u>Hs00395513_m1</u> |
| <i>F3</i>       | <u>Hs00175225_m1</u> |
| <i>FABP6</i>    | <u>Hs00155029_m1</u> |
| <i>FGFR3</i>    | <u>Hs00179829_m1</u> |
| <i>FLJ11029</i> | <u>Hs00383634_m1</u> |
| <i>FLJ21986</i> | <u>Hs00227735_m1</u> |
| <i>FLJ31052</i> | <u>Hs00708284_s1</u> |
| <i>FN1</i>      | <u>Hs00365058_m1</u> |
| <i>FOXM1</i>    | <u>Hs00153543_m1</u> |
| <i>GJB2</i>     | <u>Hs00269615_s1</u> |
| <i>GJB6</i>     | <u>Hs00272726_s1</u> |
| <i>GUSB</i>     | <u>Hs99999908_m1</u> |
| <i>HPRT</i>     | <u>Hs99999909_m1</u> |
| <i>IGF2</i>     | <u>Hs00171254_m1</u> |
| <i>INA</i>      | <u>Hs00190771_m1</u> |
| <i>IQGAP3</i>   | <u>Hs00603642_m1</u> |
| <i>KIAA0101</i> | <u>Hs00207134_m1</u> |
| <i>KIAA0186</i> | <u>Hs00221421_m1</u> |
| <i>KIAA0992</i> | <u>Hs00363101_m1</u> |
| <i>KIF11</i>    | <u>Hs00189698_m1</u> |
| <i>KIF20A</i>   | <u>Hs00194882_m1</u> |
| <i>KIF2C</i>    | <u>Hs00199232_m1</u> |
| <i>KIF4A</i>    | <u>Hs00602211_g1</u> |

**FIG. 9B**

# ES 2 357 784 T3

| Simbolo del gen | TaqMan Gene Expression Assay |
|-----------------|------------------------------|
| <i>KISS1</i>    | <u>Hs00158486_m1</u>         |
| <i>KLF9</i>     | <u>Hs00230918_m1</u>         |
| <i>KRT14</i>    | <u>Hs00265033_m1</u>         |
| <i>KRT20</i>    | <u>Hs00300643_m1</u>         |
| <i>KRT7</i>     | <u>Hs00818825_m1</u>         |
| <i>MAGEA3</i>   | <u>Hs00366532_m1</u>         |
| <i>MAGEA9</i>   | <u>Hs00245619_s1</u>         |
| <i>MAN1C1</i>   | <u>Hs00220595_m1</u>         |
| <i>MCM10</i>    | <u>Hs00218560_m1</u>         |
| <i>MELK</i>     | <u>Hs00207681_m1</u>         |
| <i>MKI67</i>    | <u>Hs00606991_m1</u>         |
| <i>MMP1</i>     | <u>Hs00233958_m1</u>         |
| <i>MMP12</i>    | <u>Hs00159178_m1</u>         |
| <i>NEK2</i>     | <u>Hs00601227_mH</u>         |
| <i>NFIA</i>     | <u>Hs00325656_m1</u>         |
| <i>NQO1</i>     | <u>Hs00168547_m1</u>         |
| <i>NR2F1</i>    | <u>Hs00818842_m1</u>         |
| <i>PDGFC</i>    | <u>Hs00211916_m1</u>         |
| <i>PDZRN3</i>   | <u>Hs00392900_m1</u>         |
| <i>PLAGL1</i>   | <u>Hs00243030_m1</u>         |
| <i>PLSCR4</i>   | <u>Hs00220482_m1</u>         |
| <i>POLQ</i>     | <u>Hs00198196_m1</u>         |
| <i>POSTN</i>    | <u>Hs00170815_m1</u>         |

**FIG. 9C**

# ES 2 357 784 T3

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| <i>PPIA</i> o <i>CYC</i> | <u>Hs99999904_m1</u> |
| <i>PPP1R12B</i>          | <u>Hs00364078_m1</u> |
| <i>PPP1R14D</i>          | <u>Hs00214613_m1</u> |
| <i>PRC1</i>              | <u>Hs00187740_m1</u> |
| <i>PRKAR2B</i>           | <u>Hs00176966_m1</u> |
| <i>PTPRC</i>             | <u>Hs00236304_m1</u> |
| <i>RAMP</i>              | <u>Hs00212788_m1</u> |
| <i>RNASE4</i>            | <u>Hs00377763_m1</u> |
| <i>SBLF</i>              | <u>Hs00538997_m1</u> |
| <i>SERPINB3</i>          | <u>Hs00199468_m1</u> |
| <i>SLC1A6</i>            | <u>Hs00192604_m1</u> |
| <i>SPON1</i>             | <u>Hs00323883_m1</u> |
| <i>SPP1</i>              | <u>Hs00167093_m1</u> |
| <i>STN2</i>              | <u>Hs00263833_m1</u> |
| <i>TERT</i>              | <u>Hs00162669_m1</u> |
| <i>TNRC9</i>             | <u>Hs00300355_m1</u> |
| <i>TOP2A</i>             | <u>Hs00172214_m1</u> |
| <i>TOPK</i>              | <u>Hs00218544_m1</u> |
| <i>TPX2</i>              | <u>Hs00201616_m1</u> |
| <i>TRIP13</i>            | <u>Hs00188500_m1</u> |
| <i>TTK</i>               | <u>Hs00177412_m1</u> |
| <i>UHRF1</i>             | <u>Hs00273589_m1</u> |
| <i>ZBTB16</i>            | <u>Hs00232313_m1</u> |
| <i>ZWINT</i>             | <u>Hs00199952_m1</u> |
| <i>18S</i>               | <u>Hs99999901_s1</u> |

**FIG. 9D**

# ES 2 357 784 T3

| Símbolo del gen | TaqMan Gene Expression Assay |
|-----------------|------------------------------|
| <i>ANLN</i>     | <u>Hs00218803_m1</u>         |
| <i>ANXA10</i>   | <u>Hs00200464_m1</u>         |
| <i>ASAM</i>     | <u>Hs00293345_m1</u>         |
| <i>ASPM</i>     | <u>Hs00411505_m1</u>         |
| <i>C14orf78</i> | <u>Hs00746838_s1</u>         |
| <i>CCNA2</i>    | <u>Hs00153138_m1</u>         |
| <i>CDC2</i>     | <u>Hs00364293_m1</u>         |
| <i>CDC20</i>    | <u>Hs00415851_q1</u>         |
| <i>CDCA1</i>    | <u>Hs00230097_m1</u>         |
| <i>CENPF</i>    | <u>Hs00193201_m1</u>         |
| <i>CFH</i>      | <u>Hs00164830_m1</u>         |
| <i>CRH</i>      | <u>Hs00174941_m1</u>         |
| <i>CTSE</i>     | <u>Hs00157213_m1</u>         |
| <i>CYP24A1</i>  | <u>Hs00167999_m1</u>         |
| <i>EBF</i>      | <u>Hs00395513_m1</u>         |
| <i>FGFR3</i>    | <u>Hs00179829_m1</u>         |
| <i>FOXM1</i>    | <u>Hs00153543_m1</u>         |
| <i>GJB2</i>     | <u>Hs00269615_s1</u>         |
| <i>GUSB</i>     | <u>Hs99999908_m1</u>         |
| <i>IGF2</i>     | <u>Hs00171254_m1</u>         |
| <i>IQGAP3</i>   | <u>Hs00603642_m1</u>         |
| <i>KIF20A</i>   | <u>Hs00194882_m1</u>         |
| <i>KIF2C</i>    | <u>Hs00199232_m1</u>         |
| <i>KIF4A</i>    | <u>Hs00602211_q1</u>         |
| <i>KLF9</i>     | <u>Hs00230918_m1</u>         |

**FIG. 10A**

# ES 2 357 784 T3

|                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| <i>KRT14</i>    | <u>Hs00265033_m1</u> |
| <i>KRT20</i>    | <u>Hs00300643_m1</u> |
| <i>MAGEA3</i>   | <u>Hs00366532_m1</u> |
| <i>MAGEA9</i>   | <u>Hs00245619_s1</u> |
| <i>MCM10</i>    | <u>Hs00218560_m1</u> |
| <i>MELK</i>     | <u>Hs00207681_m1</u> |
| <i>MMP1</i>     | <u>Hs00233958_m1</u> |
| <i>MMP12</i>    | <u>Hs00159178_m1</u> |
| <i>NEK2</i>     | <u>Hs00601227_mH</u> |
| <i>NR2F1</i>    | <u>Hs00818842_m1</u> |
| <i>PDZRN3</i>   | <u>Hs00392900_m1</u> |
| <i>POLQ</i>     | <u>Hs00198196_m1</u> |
| <i>POSTN</i>    | <u>Hs00170815_m1</u> |
| <i>PPIA</i>     | <u>Hs99999904_m1</u> |
| <i>PPP1R14D</i> | <u>Hs00214613_m1</u> |
| <i>PTPRC</i>    | <u>Hs00236304_m1</u> |
| <i>SLC1A6</i>   | <u>Hs00192604_m1</u> |
| <i>TERT</i>     | <u>Hs00162669_m1</u> |
| <i>TOP2A</i>    | <u>Hs00172214_m1</u> |
| <i>TPX2</i>     | <u>Hs00201616_m1</u> |
| <i>TRIP13</i>   | <u>Hs00188500_m1</u> |
| <i>18S</i>      | <u>Hs99999901_s1</u> |

**FIG. 10B**