

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 387**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/EP2013/055267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135830**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13709132 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2825665**

54 Título: **Firmas epigenéticas como marcador de cardiomiopatías e insuficiencias miocárdicas**

30 Prioridad:
14.03.2012 US 201261610841 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2018

73 Titular/es:
**RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:
**MEDER, BENJAMIN;
HAAS, JAN y
KATUS, HUGO, A.**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 650 387 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

Firmas epigenéticas como marcador de cardiomiopatías e insuficiencias miocárdicas

5 La presente invención se refiere al uso de un perfil de metilación del ADN de una muestra de un paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica para el diagnóstico y/o control de la terapia de la cardiomiopatía dilatada (DCM) o insuficiencia cardíaca en un paciente, en el que el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se compara con el perfil de metilación del ADN de una muestra de control, y en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa de DCM o insuficiencia cardíaca o del riesgo de desarrollar DCM o insuficiencia cardíaca o como una predicción de los efectos terapéuticos o resultado de la terapia, en el que la diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con el perfil de metilación del ADN de la muestra de control es un grado diferente de metilación CpG y en el que el nivel de metilación de al menos el gen LY75 (SEQ ID NO: 3) es mayor en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control, en el que la muestra del paciente es una muestra de tejido del ventrículo izquierdo, tejido del ventrículo derecho o sangre periférica, y en el que la muestra de control es de un sujeto normal que no tiene enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal. La presente invención se refiere adicionalmente a un kit para el diagnóstico o control de la terapia de la cardiomiopatía dilatada (DCM) o insuficiencia cardíaca en un paciente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que consiste al menos en dos conjuntos de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos de un conjunto son idénticos, complementarios o se hibridan en condiciones rigurosas a un segmento de al menos 15 nucleótidos de longitud de una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, y en el que los oligonucleótidos de cada conjunto adicional son idénticos, complementarios o se hibridan en condiciones rigurosas a un segmento de al menos 15 nucleótidos de longitud de una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de entre las SEQ ID NO: 1, 2 y 4 a 18; y opcionalmente, un reactivo que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados. La presente invención se refiere adicionalmente al uso del LY75 como un marcador para el diagnóstico y/o control de la terapia de la cardiomiopatía dilatada (DCM) o insuficiencia cardíaca en un paciente, que comprende la determinación del nivel de metilación de la SEQ ID NO: 3 en una muestra de paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica; y compararlo con el nivel de metilación de un sujeto normal que no tiene enfermedad cardíaca, en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN es indicativa de DCM o del riesgo de desarrollar DCM o de insuficiencia cardíaca o para una predicción de los efectos terapéuticos o resultado de la terapia, en el que la muestra del paciente es una muestra de tejido del ventrículo izquierdo, tejido del ventrículo derecho o sangre periférica, y en el que la muestra de control es de un sujeto normal que no tiene enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal.

Antecedentes de la invención

35 La cardiomiopatía es el deterioro de la función del miocardio por cualquier razón. La población con cardiomiopatía tiene el riesgo de insuficiencia cardíaca, arritmia y/o muerte cardíaca repentina. La cardiomiopatía puede permanecer sin detectar a menudo, haciéndola especialmente peligrosa a los que tienen la enfermedad. Las cardiomiopatías pueden clasificarse como extrínsecas o intrínsecas. Una cardiomiopatía extrínseca es una cardiomiopatía en la que la patología primaria está fuera del propio miocardio. La mayoría de la cardiomiopatías son extrínsecas, debido a que con mucho la causa más común de cardiomiopatía es la isquemia. La Organización Mundial de la Salud llama la atención sobre estas cardiomiopatías específicas. Una cardiomiopatía intrínseca se define como una debilidad del músculo del corazón que no es debido a una causa externa identificable. Esta definición se utilizó para clasificar previamente las cardiomiopatías idiopáticas aunque y se han identificado causas externas específicas para muchas. Las cardiomiopatías intrínsecas consisten en una variedad de estados de enfermedad, cada uno con sus propias causas. Muchas cardiomiopatías intrínsecas ahora tienen causas externas identificables que incluyen la isquemia, toxicidad por drogas y alcohol, infecciones víricas y distintas causas genéticas e idiopáticas.

50 La cardiomiopatía dilatada es una de las enfermedades del músculo cardíaco más frecuentes con una prevalencia estimada de 1:2500. La naturaleza progresiva de este trastorno es responsable de aproximadamente el 30-40 % de todos los casos de insuficiencia cardíaca y es la causa principal de trasplante de corazón en adultos jóvenes. En las últimas décadas, se ha reconocido que la DCM tiene una contribución genética sustancial. Se estima que aproximadamente el 30-40 % de todos los casos de DCM tiene una agregación familiar y hasta ahora se han descubierto más de 40 genes diferentes que producen DCM monogenética. Sin embargo, como el curso de la enfermedad es altamente variable y solo una parte de pacientes sufren una mutación causal, se cree que los modificadores genéticos tienen un papel importante (Friedrichs y col., 2009; Villard y col., 2011). En consecuencia, varios estudios han identificado ahora polimorfismos genéticos comunes, que se han asociado con DCM o insuficiencia cardíaca (Friedrichs y col., 2009; Villard y col., 2011). Pero incluso entonces, la existencia de dichos modificadores no explica completamente la alta variabilidad de la expresión fenotípica y los casos sin explicación de DCM.

60 Los mecanismos epigenéticos tienen papeles importantes durante el desarrollo normal, envejecimiento y una variedad de estados de enfermedad. Numerosos estudios han implicado la metilación aberrante en la etiología de

enfermedades humanas, que incluyen el cáncer, MS y diabetes. La hipermetilación de los islotes CpG localizados en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores está establecida firmemente como el mecanismo más frecuente de la activación genética en los cánceres.

5 En resumen, la metilación del carbono 5' de la citosina es una forma de modificación epigenética que no afecta a la secuencia de ADN primaria, pero que afecta las interacciones secundarias que tienen un papel crítica en la regulación de la expresión genética. La metilación de ADN aberrante puede suprimir la transcripción y la expresión genética posterior.

10 La modificación de la enfermedad mediante alteraciones epigenéticas se ha demostrado convincentemente para diferentes enfermedades (Jones y Baylin, 2002; Feinberg y Tycko, 2004). En el sistema cardiovascular, se cree que las modificaciones de histona y la remodelación de la cromatina dirigen las rutas directa adaptativa así como la maladaptativa molecular en la hipertrofia cardíaca y fallo (Montgomery y col., 2007) y se descubrió que la metilación del ADN era responsable de la hipermutabilidad de distintos genes cardíacos (Meurs y Kuan, 2011). Además, estudios recientes han resaltado la interacción potencial entre los factores ambientales y el fenotipo de enfermedad por mecanismos epigenéticos (Jirtle y Skinner, 2007; Herceg y Vaissiere, 2011). Sin embargo, el conocimiento sobre el impacto de las alteraciones epigenéticas sobre el fenotipo de la enfermedad en pacientes humanos sigue siendo muy limitado.

20 Por lo tanto, los mecanismos epigenéticos se reconocen cada vez más como contribuyentes de la enfermedad humana. Sorprendentemente, la mayoría de los estudios llevados a cabo se han enfocado sobre todo en el cáncer y solo pocos han investigado el papel de los mecanismos epigenéticos, especialmente la metilación del ADN en la enfermedad cardiovascular (Movassagh y col., 2011). Sin embargo, se cree que los mecanismos epigenéticos controlan procesos clave tales como la hipertrofia cardíaca, fibrosis y fallo (Bacs y col., 2006; Bacs y col., 2008).

Además, la decisión de iniciar o escalar terapias (fármacos, dispositivos, intervenciones quirúrgicas) se basa actualmente en conjeturas y se soporta solo en pocas medidas diagnósticas (Bielecka-Dabrowa y col., 2008).

25 Existe una necesidad de medios de diagnóstico y procedimientos que no solo permitan la detección de una enfermedad cardíaca sino también permitan extraer conclusiones acerca del desarrollo adicional de una enfermedad cardíaca existente o si una enfermedad cardíaca se desarrollará en un paciente.

Sumario de la invención

30 De acuerdo con la presente invención este objetivo se resuelve por el uso y un kit como se define en las reivindicaciones adjuntas 1 a 10. En el presente documento se desvela el uso de un perfil de metilación del ADN de la muestra de un paciente que comprende ADN genómico de las células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente, en el que el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se compara con el perfil de metilación del ADN de una muestra de control, y en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa de una enfermedad cardíaca o del riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca o para la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia. Se desvela adicionalmente un procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente, que comprende:

- 40 - determinar el perfil de metilación del ADN en una muestra de un paciente que comprende el ADN genómico de las células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica; y
- comparar el perfil de metilación del ADN en la muestra del paciente con el perfil de metilación del ADN de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal, en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN es indicativa de una enfermedad cardíaca o del riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca o para la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

45 Se desvela adicionalmente un kit para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente, que comprende al menos dos conjuntos de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos de cada conjunto son idénticos, complementarios o se hibridan en condiciones rigurosas con al menos un segmento de 15 nucleótidos de longitud de una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de entre las SEQ ID NO: 1 a 18, y opcionalmente un reactivo que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados. Se desvela adicionalmente al menos uno de ADORA2A, ERBB3, LY75, HOXB13, GF11, CLDN4, FDX1, ID4, NAT1, PPARGC1A, SULF2, TFF1, TKT, ATP2C, CCDC59, GSTM5m, SLC9A6 y TDG para su uso como marcadores para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente.

Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

55 Antes de describir la presente invención con más detalle posteriormente, se tiene que entender que la presente invención no se limita a una metodología, protocolos y reactivos en particular descritos en el presente documento ya que estos pueden variar. También se tiene que entender que la terminología utilizada en el presente documento tiene el objetivo de describir realizaciones particulares solo, y no tiene la intención de limitar el ámbito de la presente invención que solo se limitará por las reivindicaciones adjuntas. A menos de que se defina otra cosa, todos los

términos científicos y técnicos que se utilizan en el presente documento tienen los mismos significados que se entiende comúnmente por un experto habituado en la técnica.

5 Las concentraciones, cantidades, y otros datos numéricos se pueden presentar o expresar en el presente documento en un formato de intervalo. Se tiene que entender que dicho formato de intervalo se utiliza simplemente por conveniencia y brevedad y por lo tanto se debería interpretar flexiblemente para incluir no solo los valores numéricos enumerados explícitamente como límites del intervalo, sino también que se incluyen todos los valores numéricos individuales o sub-intervalos englobados en ese intervalo como si cada valor numérico o sub-intervalo se enumeren explícitamente. Como una ilustración, un intervalo numérico de “al menos 15 nucleótidos, preferentemente de 15 a 100” se debería interpretar que incluye no solamente los valores enumerados explícitamente de 15 a 100, sino también incluye valores individuales y sub-intervalos en el intervalo indicado. Por lo tanto, se incluyen en este intervalo numérico los valores individuales tales como 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,.... 96, 97, 98, 99 y 100 y sub-intervalos tales como desde 20 a 80, desde 30 a 70, desde 15 a 40, desde 25 a 50, desde 15 a 25, y desde 25 a 50, etc. Este mismo principio se aplica a intervalos que enumeran solamente un valor numérico. Además, dicha interpretación debería aplicarse independientemente de la amplitud del intervalo o las características que se describen.

Uso de los perfiles de metilación del ADN como diagnóstico, pronóstico y/o marcador terapéutico de una enfermedad cardíaca

20 Como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación proporciona el uso de un perfil de metilación del ADN de una muestra de un paciente que comprende ADN genómico de las células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente.

De esta manera, el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se compara con el perfil de metilación del ADN de una muestra de control.

Una diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa:

- 25
- de enfermedad cardíaca,
 - de riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca,
 - de la progresión o avance de una enfermedad cardíaca, y/o
 - para la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

30 Como se utiliza en el presente documento, la provisión de un diagnóstico de un sujeto/paciente es la determinación de una insuficiencia cardíaca, a saber independiente de la etiología del insuficiencia cardíaca, es decir, la determinación de si un sujeto ha sufrido o no una insuficiencia cardíaca recientemente o en el pasado.

35 Como se utiliza en el presente documento, la provisión de un pronóstico de un sujeto/paciente se selecciona preferentemente para determinar la gravedad del insuficiencia cardíaca, el riesgo de toda causa de mortalidad posterior y la evaluación del riesgo del sujeto con insuficiencia cardíaca o el riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca.

“Evaluación del riesgo” o “estratificación de riesgo” de los sujetos o pacientes con insuficiencia cardíaca se refiere a la evaluación de los factores, tales como los perfiles de metilación del ADN, mutaciones, biomarcadores, con el fin de predecir el riesgo de futuros eventos o incluso la muerte y con el fin de decidir acerca del tipo, manera, dosis, régimen de terapia y tratamiento del sujeto particular.

40 “Clasificación de la enfermedad” se refiere a la gravedad del tipo de insuficiencia cardíaca específico.

Preferentemente, el pronóstico de la enfermedad cardíaca comprende la estratificación del riesgo y/o la clasificación de la enfermedad.

45 Como se utiliza en el presente documento, “control de la terapia” o “manejo de la terapia” de una enfermedad cardíaca comprende el control del tratamiento o la decisión de tratamiento que se toma así como la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

El “perfil de metilación de ADN” de acuerdo con la invención comprende los niveles de metilación de ADN de islotes CpG o nucleótidos.

La diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con el perfil de metilación del ADN de la muestra de control es preferentemente

- 50
- un diferente grado de metilación de CpG.

Los sitios CpG o sitios CG son regiones del ADN en los que un nucleótido de citosina se encuentra a continuación de un nucleótido de guanina en la secuencia de bases lineal a lo largo de su longitud. “CpG” es una clave para una citosina y una guanina separadas solamente por un fosfato, la notación “CpG” se utiliza para distinguir esta

secuencia lineal del emparejamiento CG de citosina y guanina. Las citosinas en los dinucleótidos CpG pueden estar metilados para formar una 5-metilcitosina. En los mamíferos, la metilación de la citosina en un gen puede inactivar el gen, un mecanismo que es parte de un campo mayor de la ciencia que estudia la regulación genética que se llama epigenética. En los mamíferos, de un 70 % a un 80 % de las citosinas de CpG están metiladas.

- 5 Existen regiones del genoma que tienen una concentración más alta de sitios CpG, que se conocen como islotes CpG. Muchos genes de los genomas de mamífero tienen islotes CpG asociados con el inicio del gen.

Un “islot CpG” se utiliza en el presente documento y de acuerdo con Takai y Jones (2002) es una región con:

- una longitud de nucleótido de al menos 200 pb, o
 con un porcentaje de GC del 50 % o mayor, o
 10 con una relación de CpG observada respecto a la esperada que sea del 60 % o mayor (en el que la relación de CpG observada/esperada se calcula por la fórmula: número de CpG (número de C x número de G)) x número total de nucleótidos en la secuencia).

15 Los islotes CpG se producen normalmente en o cerca del sitio de inicio de la transcripción de los genes, en los vertebrados. Normalmente una base de C (citosina) seguida inmediatamente por una base de G (guanina) es rara en el ADN de vertebrados debido a que las citosinas en dicha disposición tienden a estar metiladas, Esta metilación ayuda a distinguir entre la cadena de ADN recién formada de la cadena parental, lo que ayuda en los estadios finales de prueba de lectura del ADN tras la duplicación. Sin embargo, durante el tiempo de evolución las citosinas metiladas tienden a volverse timinas debido a la desaminación espontánea. Aunque existe una enzima especial en seres humanos (Timina-ADN glicosilasa, o TDG) que reemplaza específicamente las T de las faltas de coincidencia
 20 T/G, no es suficientemente eficaz para evitar la mutación relativamente rápida de los dinucleótidos. El resultado es que los CpG son relativamente raros a menos que haya una presión selectiva que los mantenga o una región que no se metile por alguna razón, quizás que tenga que ver con la regulación de la expresión genética.

Preferentemente, los perfiles de metilación del ADN se determinan por matrices basadas en hibridación y por el uso de técnicas de secuenciación de próxima generación, tecnologías de secuenciación basadas en polimerasa así como basadas en ligasa como la pirosecuenciación, secuenciación por ligadura, secuenciación de única molécula o
 25 secuenciación por nanoporos solas o en combinación con el tratamiento de los nucleótidos de citosina con bisulfito.

- Variación de los perfiles de metilación del ADN con el tiempo

En una realización preferida, el perfil de metilación del ADN de una muestra del paciente se determina con el tiempo.

30 Esta realización se utiliza preferentemente para el control de la terapia o el manejo de la terapia, preferentemente para el control durante/a largo plazo de la terapia.

El perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se determina en diferentes momentos, durante la terapia.

De esta manera, se determina el perfil de metilación del ADN preferentemente antes o al principio de la terapia y luego se determina a diferentes momentos durante la terapia.

35 Un cambio del perfil de metilación del ADN en estos momentos diferentes, cuando se compara con el perfil de metilación del ADN del primer punto de tiempo medido, puede ser una indicación de la progresión o avance de la enfermedad cardíaca en el paciente y/o del éxito de una terapia.

- Evaluación de biomarcadores adicionales o de mutaciones

En una realización, se determinan biomarcadores adicionales y/o mutaciones genéticas en la muestra del paciente.

40 Biomarcadores adicionales son, por ejemplo, biomarcadores metabólicos bien establecidos, por ejemplo, troponinas o NT-proBNP. La determinación de dichos biomarcadores adicionales y/o mutaciones genéticas, junto con el perfil de metilación, contribuye preferentemente a la estratificación del riesgo de la enfermedad de una manera combinatoria. La expresión “enfermedad cardíaca” comprende una cardiomiopatía, insuficiencia miocárdica, insuficiencia cardíaca agudo o crónico, tal como la cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía hipertrófica (HCM), cardiomiopatía isquémica, disfunción diastólica, infarto de miocardio.

45 Cardiomiopatía, que literalmente significa “enfermedad del músculo cardíaco”, es el deterioro de la función del miocardio por cualquier razón. Las cardiomiopatías pueden clasificarse en general en dos grupos, basándose en las directrices de la OMS: cardiomiopatías extrínsecas e intrínsecas.

50 Las cardiomiopatías extrínsecas son cardiomiopatías en las que la patología primaria está fuera del propio miocardio. La mayoría de las cardiomiopatías son extrínsecas, debido a que con mucho la causa más común de cardiomiopatía es la isquemia. La cardiomiopatía isquémica, por ejemplo, es una debilidad del músculo del corazón debido a un suministro de oxígeno inadecuado al miocardio siendo la enfermedad de arterias coronarias la causa más común.

Una cardiomiopatía intrínseca es la debilidad en el músculo del corazón que no se debe a una causa externa identificable. La expresión cardiomiopatía intrínseca no describe la etiología específica de la debilidad del músculo cardíaco. Las cardiomiopatías intrínsecas son un grupo heterogéneo de estados de enfermedad, cada uno con sus propias causas. La cardiomiopatía intrínseca tiene un número de causas que incluyen la toxicidad por drogas y alcohol, ciertas infecciones (incluyendo la hepatitis C), y distintas causas genéticas e idiopáticas (es decir, desconocidas). Hay cuatro tipos principales de cardiomiopatías intrínsecas: primero, cardiomiopatía dilatada (DCM), la forma más común, y una de las indicaciones que encabezan el trasplante de corazón. En la DCM el corazón (especialmente el ventrículo izquierdo) se agranda y disminuye la función de bombeo. Segundo, cardiomiopatía hipertrófica (HCM o HOCM), un trastorno genético producido por distintas mutaciones en genes que codifican las proteínas sarcoméricas. En la HCM el músculo cardíaco está engrosado, lo que puede obstruir el flujo sanguíneo y evitar que el corazón funcione apropiadamente. Tercero, cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (ARVC) aparece por una perturbación eléctrica del corazón en el que el músculo cardíaco se reemplaza por tejido fibroso cicatricial. El ventrículo derecho es en general el más afectado. Cuarto, cardiomiopatía restrictiva (RCM) es la última cardiomiopatía común. Las paredes de los ventrículos están rígidas pero no engrosadas, y se resisten al llenado normal del corazón con sangre. Además, se ha reconocido la cardiopatía no compacta una forma más reciente de cardiomiopatía con su propio tipo desde los 80. Se refiere a una cardiomiopatía en la que la pared del ventrículo izquierdo falla para crecer apropiadamente desde el nacimiento y tiene una apariencia esponjosa que se ve durante un ecocardiograma.

La muestra del paciente es preferentemente una muestra de tejido ventricular izquierdo (tal como una biopsia de LV), una muestra de ventrículo derecho o sangre periférica.

La muestra de control es preferentemente de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal, es decir, que tiene una función miocárdica sin alterar.

Los inventores han medido los perfiles de metilación de ADN del genoma ampliamente en muestras de pacientes (DCM) y han identificado genes candidatos con un estado de metilación alterado que tiene un valor pronóstico y diagnóstico para las enfermedades cardíacas y son adecuados para el control de la terapia también.

En un aspecto preferido, el nivel de metilación de al menos una muestra en comparación con la muestra de control, los siguientes genes son diferentes en el paciente.

		Nº de acceso de banco genético **
Receptor adenosina A2A (ADORA2A)	SEQ ID NO: 1	ENSG00000128271
ERBB3	SEQ ID NO: 2	ENSG00000065361
LY75	SEQ ID NO: 3	ENSG00000054219
HOXB13	SEQ ID NO: 4	ENSG00000159184
GFI1	SEQ ID NO: 5	ENSG00000162676
CLDN4	SEQ ID NO: 6	ENSG00000189143
FDX1	SEQ ID NO: 7	ENSG00000137714
ID4	SEQ ID NO: 8	ENSG00000172201
NAT1	SEQ ID NO: 9	ENSG00000171428
PPARGC1A	SEQ ID NO: 10	ENSG00000109819
SULF2	SEQ ID NO: 11	ENSG00000196562
TFF1	SEQ ID NO: 12	ENSG00000160182
TKT	SEQ ID NO: 13	ENSG00000163931
ATP2C	SEQ ID NO: 14	ENSG00000017260
CCDC59	SEQ ID NO: 15	ENSG00000133773
GSTM5m	SEQ ID NO: 16	ENSG00000134201
SLC9A6	SEQ ID NO: 17	ENSG00000198689
TDG	SEQ ID NO: 18	ENSG00000139372

** Banco genético Ensembl (véase www.ensembl.org)

Todos los identificadores enumerados y nombres genéticos y las secuencias genéticas correspondientes y las secuencias genéticas relacionadas como transcripciones y secuencias proteicas se recuperaron de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>) edición 70 desde Enero 2013. Que se refiere a GRCh37.p10 (humano) o Zv9 (de pez cebra). Las fuentes mencionadas también se han utilizado para el diseño de cebadores.

Más preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3 y LY75 es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

Más preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre LY75, ADORA2A, ERBB3 y HOXB 13 es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

Más preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre LY75, ADORA2A, ERBB3, HOXB13 y GFI1 es

diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

Preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB13, CLDN4, FDX1, ID4, NAT1, PPARGC1A, SULF2, TFF1 y TKT (SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6-13) está reducido en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control (hipo-metilación), más preferentemente de al menos de uno de entre

5

ADORA2A, ERBB3, HOXB13.

Preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre GF11, ATP2C, CCDC59, GSTM5m, SLC9A6 y TDG (SEQ ID NO: 3, 5, 14-18) es mayor en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control (hiper-metilación), más preferentemente de LY75.

El LY75 es un receptor de la familia de la manosa que se une al colágeno que está controlado transcripcionalmente por el receptor IL6R α de Interleucina-6 (Giridhar y col., 2011). Para el LY75, los CpG dismetilados residen en un islote CpG clásico que recubre el Exón 1 así como parte de la región 5' corriente arriba. Su sitio de inicio transcripcional se ha previsto que está en muy estrecha vecindad (1.395 pb). Los hallazgos de los inventores de un aumento significativo de la metilación del ADN con niveles fuertemente reducidos de LY75-ARNm en pacientes con DCM sugerían un papel funcional. Aunque según el conocimiento de los inventores no es posible recrear exactamente los mismos patrones de metilación *in vitro* que se ven en el tejido primario, los inventores pudieron investigar aquí la consecuencia funcional de la metilación del promotor LY75, sugiriendo una unión directa entre metilación y actividad transcripcional. Los inventores también han inactivado el *ly75* en un modelo de pez cebra y han descubierto no solo disfunción cardíaca en los embriones *ly75* anulados, pero también un notable fenotipo de desprendimiento de la piel, potencialmente debido a la alteración de la producción de colágeno.

10

15

20

25

30

El receptor A2A de adenosina (ADORA2A) es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G y es altamente abundante en neuronas de los ganglios basales, linfocitos T, plaquetas, y sistema vascular, pero también muestra una expresión relevante en el miocardio como se muestra en el presente documento. En el corazón, la activación de ADORA2A aumenta la producción de cAMP mediante proteínas α Gs (Sommerschild y col., 2000) y la sobre-expresión da como resultado un aumento de la contractilidad y la captación de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico (Hamad y col., 2010) así como cardio protección a la isquemia y daño por re-perfusión (Urmaliya y col., 2009). Sorprendentemente, aunque la metilación de ADORA2A está reducida, los inventores encontraron que los niveles de ARNm estaban significativamente regulados negativamente. Por lo tanto, la hipermetilación puede dar como resultado un aumento de la expresión genética como se observa en el caso de ADORA2A. La anotación CGI de los inventores se basaba en los criterios de Takai y Jones (2002), que define un islote CpG como una secuencia de nucleótidos de 200 pb o más de longitud o con un contenido de GC de un 50 % o más, o una relación de CpG observados frente a esperados de 0,6 o mayor. En el caso de ADORA2A, los CGI ensayados solo cumplían el segundo criterio y por lo tanto puede que no sean CGI clásicos.

El receptor tirosina cinasa ERBB3 pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) unido a la membrana. La funcionalidad está implicada en la cresta neural mediada por SOX10 y el desarrollo cardíaco temprano (Erickson y col., 1997). Sin embargo, ya que la inactivación de ERBB3 da lugar a una letalidad embrionaria temprana, este papel en la regulación de la contractilidad cardíaca se desconocía previamente. En la presente invención, los inventores utilizaron el pez cebra como modelo animal para investigar el papel funcional del ERBB3. La inactivación de *erbb3* da como resultado un fenotipo similar, pero más temprano que *adora2a*. Adicionalmente los *erbb3* morfantos muestran regurgitación de sangre en el ventrículo, sugiriendo una alteración del desarrollo de la válvula. El análisis de los sitios de corte y empalme de ADNc reveló una inserción completa del intrón 2 así como una exclusión parcial del exón 2 que produce transcripciones aberrantes, con cambio de fase con codones de terminación prematuros.

35

40

El gen HOXB13 es un miembro de la familia de genes homeobox y codifica un factor de transcripción. La familia genética homeobox se agrupa en el cromosoma 17 en la región 17qw21-22 y está altamente conservada y esencial para el desarrollo de vertebrados.

45

Procedimientos para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente

Como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente.

El procedimiento comprende

50

- determinar el perfil de metilación del ADN en una muestra de un paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica; y
- comparar el perfil de metilación del ADN en la muestra del paciente con el perfil de metilación del ADN de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal.

Como se ha descrito anteriormente, una diferencia del perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa:

55

- de una enfermedad cardíaca,

- del riesgo de desarrollo de una enfermedad cardíaca, y/o
- para una predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

El procedimiento comprende además preferentemente la etapa de

- 5 - poner en contacto el ADN genómico aislado de la muestra del paciente con al menos un reactivo que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados.

Los reactivos que distinguen entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados se conocen en la técnica, tales como bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito, y combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se determina a lo largo del tiempo en diferentes momentos durante el control de la terapia como se ha descrito anteriormente.

- 10 Preferentemente, los perfiles de metilación de ADN se determinan por matrices basadas en hibridación o por el uso de técnicas de secuenciación de próxima generación, tecnologías de secuenciación basadas en polimerasa así como basadas en ligasa o secuenciación por nanoporos solas o en combinación con el tratamiento/conversión de nucleótidos de citosina con bisulfito.

- 15 Como se ha descrito anteriormente, la enfermedad cardíaca es una cardiomiopatía, insuficiencia miocárdica, insuficiencia cardíaca agudo o crónico, tal como cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía hipertrófica (HCM), cardiomiopatía isquémica, disfunción diastólica, infarto de miocardio.

La muestra de paciente es preferentemente una muestra de tejido del ventrículo izquierdo (tal como una biopsia de LV), una muestra de tejido del ventrículo derecho o sangre periférica.

- 20 La muestra de control es preferentemente de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal, es decir, que tenga una función miocárdico no alterada.

Como se ha descrito anteriormente, el pronóstico de una enfermedad cardíaca comprende preferentemente la estratificación del riesgo y/o clasificación de la enfermedad.

- 25 Como se ha descrito anteriormente, el control de la terapia de una enfermedad cardíaca preferentemente comprende el control del tratamiento o la toma de decisión del tratamiento así como la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

Los inventores han medido los perfiles de metilación de ADN del genoma ampliamente en muestras de pacientes (DCM) y han identificado genes candidatos con un estado de metilación alterado que tiene un valor pronóstico y diagnóstico para las enfermedades cardíacas y son adecuados para el control de la terapia también.

- 30 En un aspecto preferido, el nivel de metilación de al menos uno de los siguientes genes es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control:

		Nº de acceso de banco genético **
Receptor adenosina A2A (ADORA2A)	SEQ ID NO: 1	ENSG00000128271
ERBB3	SEQ ID NO: 2	ENSG00000065361
LY75	SEQ ID NO: 3	ENSG00000054219
HOXB13	SEQ ID NO: 4	ENSG00000159184
GFI1	SEQ ID NO: 5	ENSG00000162676
CLDN4	SEQ ID NO: 6	ENSG00000189143
FDX1	SEQ ID NO: 7	ENSG00000137714
ID4	SEQ ID NO: 8	ENSG00000172201
NAT1	SEQ ID NO: 9	ENSG00000171428
PPARGC1A	SEQ ID NO: 10	ENSG00000109819
SULF2	SEQ ID NO: 11	ENSG00000196562
TFF1	SEQ ID NO: 12	ENSG00000160182
TKT	SEQ ID NO: 13	ENSG00000163931
ATP2C	SEQ ID NO: 14	ENSG00000017260
CCDC59	SEQ ID NO: 15	ENSG00000133773
GSTM5m	SEQ ID NO: 16	ENSG00000134201
SLC9A6	SEQ ID NO: 17	ENSG00000198689
TDG	SEQ ID NO: 18	ENSG00000139372

** Banco genético Ensembl (véase www.ensembl.org)

Todos los identificadores enumerados y nombres genéticos y las secuencias genéticas correspondientes y las secuencias genéticas relacionadas como transcripciones y secuencias proteicas se recuperaron de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>) edición 70 desde Enero 2013. Que se refiere a GRCh37.p10 (humano) o Zv9 (de pez cebra). Las fuentes mencionadas también se han utilizado para el diseño de cebadores. Más preferentemente,

el nivel de metilación de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3 y LY75 es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

Más preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB 13 y LY75 es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

- 5 Más preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre LY75, ADORA2A, ERBB3 y HOXB 13 es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

Más preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre LY75, ADORA2A, ERBB3, HOXB13 y GFI1 es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control.

- 10 Preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB13, CLDN4, FDX1, ID4, NAT1, PPARGC1A, SULF2, TFF1 y TKT (SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6-13) está reducido en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control (hipo-metilación), más preferentemente de al menos de uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB13.

- 15 Preferentemente, el nivel de metilación de al menos uno de entre GFI1, ATP2C, CCDC59, GSTM5m, SLC9A6 y TDG (SEQ ID NO: 3, 5, 14-18) es mayor en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control (hiper-metilación), más preferentemente de LY75.

Kits para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente

Como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación proporciona un kit para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente.

- 20 El kit comprende al menos dos conjuntos de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos de cada conjunto son idénticos, complementarios o se hibridan en condiciones rigurosas con un segmento de al menos 15 nucleótidos de longitud de una secuencia de ácido nucleico que se selecciona de entre las SEQ ID NO: 1 a 18, preferentemente un segmento de 15 a 100 nucleótidos de longitud de una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1 a 18, tal como de 20 a 80 o 30 a 70, tal como de aproximadamente 25 nucleótidos.

El kit comprende opcionalmente un reactivo que distingue entre dinucleótidos CpG metilado y no metilado.

- 25 El kit es preferentemente adecuado para el uso de/con/en matrices basadas en hibridación o técnicas de secuenciación de próxima generación, tecnologías de secuenciación basadas en polimerasa así como basadas en ligasa, como pirosecuenciación, secuenciación por ligadura, secuenciación de molécula única o secuenciación por nanoporos solas o en combinación con el tratamiento/conversión de nucleótidos de citosina con bisulfito.

- 30 Por lo tanto, el kit comprende al menos dos conjuntos de oligonucleótidos para la detección de dos ácidos nucleicos/genes diana (que se seleccionan de entre las SEQ ID NO: 1 a 18).

Los reactivos que distinguen entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados se conocen en la técnica, tales como bisulfito, sulfito de hidrógeno, disulfito y combinaciones de los mismos.

Como se ha descrito anteriormente, el pronóstico de una enfermedad cardíaca preferentemente comprende la estratificación del riesgo y/o la clasificación de la enfermedad.

- 35 Como se ha descrito anteriormente, el control de la terapia de una enfermedad cardíaca comprende preferentemente el control del tratamiento o la toma de decisión del tratamiento así como la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

Marcadores de enfermedades cardíacas

- 40 Como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación proporciona el uso de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, LY75, HOXB13, GFI1, CLDN4, FDX1, ID4, NAT1, PPARGC1A, SULF2, TFF1, TKT, ATP2C, CCDC59, GSTM5m, SLC9A6 y TDG como marcadores para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente.

		Nº de acceso de banco genético **
Receptor adenosina A2A (ADORA2A)	SEQ ID NO: 1	ENSG00000128271
ERBB3	SEQ ID NO: 2	ENSG00000065361
LY75	SEQ ID NO: 3	ENSG00000054219
HOXB13	SEQ ID NO: 4	ENSG00000159184
GFI1	SEQ ID NO: 5	ENSG00000162676

(continuación)

		Nº de acceso de banco genético **
CLDN4	SEQ ID NO: 6	ENSG00000189143
FDX1	SEQ ID NO: 7	ENSG00000137714
ID4	SEQ ID NO: 8	ENSG00000172201
NAT1	SEQ ID NO: 9	ENSG00000171428
PPARGC1A	SEQ ID NO: 10	ENSG00000109819
SULF2	SEQ ID NO: 11	ENSG00000196562
TFF1	SEQ ID NO: 12	ENSG00000160182
TKT	SEQ ID NO: 13	ENSG00000163931
ATP2C	SEQ ID NO: 14	ENSG00000017260
CCDC59	SEQ ID NO: 15	ENSG00000133773
GSTM5m	SEQ ID NO: 16	ENSG00000134201
SLC9A6	SEQ ID NO: 17	ENSG00000198689
TDG	SEQ ID NO: 18	ENSG00000139372

** Banco genético Ensembl (véase www.ensembl.org)

5 Todos los identificadores enumerados y nombres genéticos y las secuencias genéticas correspondientes y las secuencias genéticas relacionadas como transcripciones y secuencias proteicas se recuperaron de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>) edición 70 desde Enero 2013. Que se refiere a GRCh37.p10 (humano) o Zv9 (de pez cebra). Las fuentes mencionadas también se han utilizado para el diseño de cebadores.

En una realización preferida al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3 y LY75 se utiliza como dicho marcador.

En una realización preferida al menos uno de entre LY75, ADORA2A, ERBB3 y HOXB13 se utiliza como dicho marcador.

10 En una realización preferida al menos uno de entre LY75, ADORA2A, ERBB3, HOXB13 y GF11 se utiliza como dicho marcador.

15 Preferentemente, el uso de dichos genes (diana), ácidos nucleicos o polipéptidos codificados por los genes/ácidos nucleicos como biomarcadores comprende la determinación del nivel de metilación de al menos una de las SEQ ID NO: 1-18 en una muestra de un paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica; y compararlo con el nivel de metilación de un sujeto normal que no tiene enfermedad cardíaca, en el que, como se ha descrito anteriormente, una diferencia en el perfil de metilación del ADN es indicativa de una enfermedad cardíaca o del riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca o de la predicción de los efectos terapéuticos o resultado de la terapia.

20 Preferentemente, y como se ha descrito anteriormente, la enfermedad cardíaca es una cardiomiopatía, insuficiencia miocárdica, insuficiencia cardíaca (agudo o crónico), tal como una cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía hipertrófica (HCM), cardiomiopatía isquémica, disfunción diastólica, infarto de miocardio.

Preferentemente, y como se ha descrito anteriormente, la muestra de un paciente es una muestra de tejido de ventrículo izquierdo, tejido de ventrículo derecho o sangre periférica.

25 Preferentemente, y como se ha descrito anteriormente, la muestra de control es de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal.

Como se ha descrito anteriormente, el pronóstico de una enfermedad cardíaca comprende preferentemente una estratificación del riesgo y/o clasificación de la enfermedad.

30 Como se ha descrito anteriormente, el control de la terapia de una enfermedad cardíaca comprende preferentemente el control del tratamiento o la toma de decisión de tratamiento así como la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia.

Descripción adicional de la invención

- Sumario

35 Problema: La cardiomiopatía dilatada (DCM) es una de las enfermedades más frecuentes del músculo cardíaco. Aunque se han descubierto varios factores incluyendo los mecanismos genéticos como causa de DDCM, los inventores aún descubren muchas causas sin explicar y observan una alta variabilidad fenotípica con respecto a la gravedad y pronóstico de la enfermedad. Los mecanismos epigenéticos se reconocen cada vez más como causas y moduladores de la enfermedad humana. Por lo tanto, los inventores estudiaron la metilación de ADN cardíaco ampliamente en el genoma en pacientes de DCM y controles para detectar una posible contribución epigenética en

la DCM.

Resultados: Los inventores detectaron distintos patrones de metilación de ADN en el tejido del ventrículo izquierdo de los pacientes con DCM y replicaron el modo de regulación epigenética en varios genes con una función desconocida anteriormente en la DCM, a saber, *el antígeno 75 de linfocitos (LY75), receptor HER3 de superficie celular tipo tirosina cinasa (ERBB3), Homeobox B13 (HOXB13), y receptor A2A de adenosina (ADORA2A)*. Los resultados se verificaron cuidadosamente por técnicas alternativas en una gran cohorte independiente bien fenotipada y grande de pacientes de DCM y controles. Además, los inventores fueron capaces de demostrar la relevancia funcional de la contribución de los genes identificados en la patogénesis del insuficiencia cardíaca utilizando el pez cebra como un modelo *in vivo*.

Impacto: Los resultados de los inventores insinúan una nueva capa en la patogénesis de la DCM y el insuficiencia cardíaca y tiene un impacto en el desarrollo de nuevos biomarcadores y estrategias terapéuticas futuras.

- Conclusión

En el presente estudio, la metilación de ADN cardíaco ampliamente genómico se examinó primera vez en pacientes con DCM idiopática y controles. Los inventores detectaron diferencias en las rutas relacionadas con la enfermedad cardíaca, peor también en los genes con una función aún desconocida en la DCM o insuficiencia cardíaca, a saber *el antígeno 75 de linfocitos (LY75), receptor HER3 de superficie celular tipo tirosina cinasa (ERBB3), Homeobox B13 (HOXB13), y receptor A2A de adenosina (ADORA2A)*. El análisis de espectrometría de masas y la secuenciación con bisulfito hacía posible la confirmación de los cambios de metilación de ADN que se observaban en cohortes independientes. La metilación de ADN aberrante en pacientes con DCM se asociaba con cambios significativos en la expresión del ARNm de *LY75 y ADORA2A*, pero no de *ERBB3 y HOXB12*. Por estudios *in vivo* de *ly75 y adora2a* en pez cebra, los inventores pudieron demostrar por primera vez un papel funcional de estos genes en las rutas adaptativas y mal adaptativas del insuficiencia cardíaca.

En detalle, los inventores investigaron aquí los patrones de metilación del ADN a un nivel ampliamente genómico en el miocardio de pacientes con DCM idiopática y corazones funcionalmente no afectados de pacientes que habían recibido un trasplante de corazón. Los inventores descubrieron y confirmaron alteraciones aberrantes de metilación del ADN en varios CGI, sugiriendo que la metilación del ADN se asocia con la función cardíaca y puede modular las características fenotípicas de la DCM idiopática.

Recientemente, Movassagh y col. (2011) informaron de distintas actuaciones epigenéticas en corazones humanos con fallo explantados, resaltando un papel potencial de la metilación del ADN también en el insuficiencia cardíaca en último estadio. Sin embargo, la fiabilidad de la precipitación y secuenciación del metil-ADN que se utilizaron está restringida por las relativamente grandes cantidades de tejido necesarias, que no están fácilmente disponibles de pacientes vivos.

Además, el manejo del tejido y los momentos del aislamiento de ADN eran bastante diferentes en los controles y en los pacientes. Los especímenes de tejido de los corazones explantados de pacientes con insuficiencia cardíaca en último estadio podían estar alterados debido al manejo del tejido y podían haber sufrido alteraciones secundarias debido a la degradación, pérdida de oxigenación, inervación y detención de la función de bombeo (Talens y col., 2010). También, los autores no replicaban sus hallazgos, que se obtuvieron en 4 pacientes, en una serie independiente de muestras no relacionadas y por una metodología alternativa. Por lo tanto, los inventores utilizaron una estrategia diferente, que confirmaban los hallazgos de los inventores en una gran cohorte de replicación con dos metodologías alternativas y aplicaron estudios funcionales para valorar la relevancia de los resultados de los inventores.

Como la disponibilidad de tejido miocárdico apropiado de pacientes vivos es limitada, los estudios de las alteraciones epigenéticas en pacientes con enfermedad cardíaca son raros. Como un centro de referencia primario para cardiomiopatías, los inventores pudieron inscribir un alto número de pacientes y controles en este estudio. Los controles de los inventores no estaban completamente sanos, sino que habían recibido previamente un trasplante de corazón. Por lo tanto, los factores de confusión potenciales incluyen la medicación del paciente y la historia médica. De manera importante, a nivel funcional todos los controles tenían una función cardíaca sin restricciones como requisito y los inventores podían aplicar el mismo procedimiento convencional a la muestra y el procesamiento de las biopsias del ventrículo izquierdo de pacientes de DCM y controles. Sin embargo, todos los controles recibían mediaciones inmunosupresoras para evitar el rechazo del órgano. Esta medicación podía tener influencia sobre al menos algunos genes. Como se muestra en el presente documento, los inventores no descubrieron en los niveles de metilación de los genes ensayados en sujetos de control antes y después del trasplante de corazón, demostrando que los inmunosupresores no, al menos en sangre periférica completa, tenían un impacto sobre la metilación de ADN CGI de *LY75, ADORA2A, ERBB3 y HOB13*.

Las muestras de tejido estaban compuestas por diferentes tipos celulares, que pueden cambiar durante la progresión de la enfermedad. En el presente estudio, los inventores prestaron especial atención a la selección de pacientes y al proceso de toma de muestras de tejido. En consecuencia, dio como resultado una alta homogeneidad de todos los patrones de metilación como se ha demostrado anteriormente. En un estudio por Grzeskowiak et al.

(2003) se demostró que las diferencias en la expresión genética de biopsias miocárdicas LV de controles y pacientes de DCM idiopática eran casi exclusivamente debido a genes expresados en los cardiomiocitos y que la contribución del segundo tipo celular más común, los fibroblastos, es bastante baja y sobre todo sin cambios durante la DCM. El aumento de fibrosis que se observa en la DCM humana, por ejemplo, parece que se debe principalmente al depósito de colágeno extracelular más que a un incremento de cardiofibroblastos. Los experimentos *in vivo* de los inventores subrayan que la expresión reducida de *LY75* y *ADORA2A* en los cardiomiocitos da lugar a insuficiencia cardíaca como se observaba en los pacientes de los inventores. En conjunto, esta estrategia les permitía a los inventores estudiar mecanismos epigenéticos y sus consecuencias funcionales sin fondo de confusión de hipoxia del órgano y apoptosis en corazones explantados de pacientes muertos.

En una estrategia de embudo, los inventores investigaron primero los patrones de metilación global y descubrieron que los patrones de metilación también reflejan rutas de enfermedad cardíaca. El análisis de metilación global de los inventores identificaba rutas de enfermedad cardíaca y se complementaban con estudios de validación extensos aplicando MassARRAY altamente precisa y técnicas de secuenciación con bisulfito. Los inventores descubrieron que 12 de 20 genes mostraban la misma dirección de dimetilación como se encontraba en el estado de exploración, y cuatro consiguieron una significación estadística. Esto tiene al menos tres razones: 1) los inventores esperaban una alta tasa de falsos positivos debido a cohortes de exploración relativamente pequeñas en contraste con el número de características epigenéticas medidas, 2) los inventores llevaron a cabo las mediciones de replicación con una metodología completamente independiente, y 3) los inventores llevaron a cabo estos análisis en pacientes y controles independientes. Por lo tanto, los genes identificados aquí representan dianas validadas consistentemente que muestran un modo epigenético de regulación.

Descifrar las implicaciones funcionales de los cambios en la metilación del ADN es difícil pero de una importancia crucial. Como en muchos casos los cambios en la metilación de CpG se correlacionan con la accesibilidad de ADN a los factores de transcripción y polimerasas, las mediciones de niveles de ARNm representan una metodología apropiada. En el presente estudio, los inventores descubrieron que la metilación de nuevos genes cardiacos se altera en pacientes con DCM. Por lo tanto, se puede hacer la hipótesis de que os genes dimetilados y mal regulados también ejercen un papel funcional en el corazón.

El receptor tirosina-proteína cinasa ERBB3 pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EFGFR) unido a la membrana. La funcionalidad está implicada en la cresta neural mediada por SOX10 y el desarrollo cardíaco temprano (Erickson y col., 1997). Sin embargo, como la inactivación de ERBB3 da lugar a una letalidad embrionaria temprana, su papel en la regulación de la contractilidad cardíaca era desconocido previamente. Aunque los inventores no observaron cambios en los niveles de transcripción de ERBB3, los cambios significativos en la metilación de ADN podía ser un factor de susceptibilidad mediado a través de rutas aún desconocidas, por ejemplo, ejerciendo efectos sobre la estabilidad del ADN, la expresión de la isoforma de ERBB3, o la unión a una histona.

El LY75, un receptor de la familia de manosa de unión al colágeno, está controlado transcripcionalmente por el receptor de la interleucina-6, IL6R α (Giridhar y col., 2011) y media en la captación de antígenos y la presentación de una manera dependiente de Clatrina. Para la DCM, se descubrió una correlación de los niveles de IL-6 y el colágeno de tipo I reticulado, implica potencialmente un papel de la señalización IL-6/LY75 en la remodelación cardíaca (Timonen y col., 2008). Para LY75, los CpG dimetilados residen en un islote CpG clásico que cubre el Exón 1 así como parte de la región 5' corriente abajo. Su sitio de inicio transcripcional se prevé que está en muy estrecha vecindad (1.395 pb). Los hallazgos de los inventores de un aumento significativo de la metilación de ADN junto con niveles de ARNm LY75 fuertemente reducidos en los pacientes de DCM sugerían un papel funcional. Aunque no es posible para el conocimiento de los inventores recrear exactamente los mismos patrones de metilación *in vitro* que se ve en el tejido primario, los investigadores podían investigar aquí la consecuencia funcional de la metilación del promotor global LY75, sugiriendo una unión directa entre la metilación y la actividad transcripcional. Los inventores también anularon el *ly75* del modelo en pez cebra y descubrieron no solo una disfunción cardíaca en embriones con *ly75* anulado, sino también un notable fenotipo de desprendimiento de la piel, potencialmente debido a la alteración de la producción de colágeno.

El receptor de adenosina A2A (ADORA2A) es un miembro de la familia de receptores acoplados a Proteína G y es muy abundante en neuronas de los ganglios basales, linfocitos T, plaquetas y sistema vascular, pero también muestra una expresión relevante en el miocardio como se demuestra en el presente documento. En el corazón, la activación de ADORA2A aumenta la producción de cAMP mediante las proteínas α G (Sommerschild y col., 2000) y la sobre-expresión da como resultado un aumento de contractilidad y captación de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico (Hamad y col., 2010) así como cardioprotección en el daño por isquemia y re-perfusión (Urmaliya y col., 2009). Sorprendentemente, aunque la metilación de ADORA2A está reducida, los inventores descubrieron que los niveles de ARNm estaban significativamente regulados negativamente. Dicha relación positiva se había descrito para otros genes y no se entiende completamente en cada caso (Zhang y col., 2006). La anotación CGI de los inventores se basaba en los criterios de Takai y Jones (2002), que defina un islote CpG como una secuencia de 200 pb o más de longitud o con un contenido de GC del 50 % o más, o una relación de CpG observados frente a esperados de 0,6 o mayor. En el caso de ADORA2A, los CGI ensayados solamente cumplían el segundo criterio y por lo tanto no son CGI clásicos.

Para dichos sitios, una explicación puede ser que la hiper-metilación no solo puede impedir la unión de activadores transcripcionales sino también afectar los represores de la transcripción. Los inventores por tanto llevaron a cabo un análisis *in silico* de la región del promotor de *ADORA2A* y descubrieron dos sitios de unión del factor de transcripción CTCF (factor de unión a CCCTC) en estrecha vecindad a ambos CGI significativamente hipo-metilados, pero no en el único CGI no afectado de *ADORA2A*. La CTCF es una proteína de unión a un único aislador, que puede actuar como un represor transcripcional bloqueando distintas regiones amplificadoras (Bell y col., 1999; Gaszner y Felsenfield, 2006). De manera enigmática, los sitios CTCF emergen como actores centrales en las redes reguladoras ligadas a la regulación genética con modificaciones epigenéticas (Bell y Felsenfield, 2000). En consecuencia, la disminución observada por los inventores de la expresión de *ADORA2A* podría ser el resultado del aumento de unión de represores de CTCF debido a la hipo-metilación de CGI. Una explicación es que la hiper-metilación no solo puede silenciar la unión de activadores transcripcionales, sino también afectar a los represores de la transcripción. Por lo tanto, la hiper-metilación puede dar como resultado a veces un aumento de la expresión genética como se observa en el caso de *ADORA2A*.

La detección de los mecanismos epigenéticos en las enfermedades cardíacas humanas representa una opción atractiva para identificar y diseccionar y más nueva en el direccionamiento de patomecanismos completamente nuevos. Por lo tanto, las dianas validadas a partir de este estudio que han demostrado una relevancia funcional son los modificadores más probables de DCM más que tratarse de causas de la enfermedad independientes y pueden, por lo tanto, investigarse adicionalmente en cuanto a su potencial diagnóstico y terapéutico. Por lo tanto, es razonable investigar su potencial como dianas diagnósticas y terapéuticas específicamente en DCM pero también en el insuficiencia cardíaca debido a toras causas. En el campo del cáncer, los fármacos epigenéticos ya han entrado en el ruedo clínico (por ejemplo, la Decitabina o Azacitidina en el tratamiento de los síndromes mielodisplásicos), y los patrones de metilación se utilizan como biomarcadores para subtipar y estadificar distintos cánceres como una etapa crítica hacia una atención personalizada más eficaz (Coppede 2011; Litzow 2011). Por lo tanto, los genes identificados en el presente documento son dianas tratables con fármacos relevantes en la DCM y el insuficiencia cardíaca y ayuda a la clasificación de la enfermedad o la estratificación del riesgo.

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención, sin embargo, por ello no limitan la misma.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 *Detección de patrones de metilación de ADN.*

A) Gráfico de correlación que muestra el porcentaje de metilación en controles frente a pacientes de DCM que da como resultado una correlación muy alta. En general, la correlación entre las cohortes es alta, sin embargo algunos casos aparte muestran hiper o hipo-metilación según los casos.

B) Análisis de enriquecimiento del conjunto genético para las rutas de enfermedad NIA humanas. El área proporcional del diagrama de Venn muestra que los cambios de metilación en los genes de enfermedad cardiovascular están significativamente enriquecidos junto con el solapamiento de otros conjuntos genéticos que se indican.

C) Análisis de agrupamiento para los genes con expresión conocida en el corazón humano y metilación significativamente alterada. El código de color utilizado en el mapa caliente se muestra en la esquina izquierda superior, los valores varían de 1 (muestra con la menor metilación para el gen considerado) a 17 (muestra con la metilación más alta para los genes considerados). Los genes con mayor metilación encontrada en los controles se agruparon en el cuarto superior derecho. Los genes con la mayor metilación en DCM se agrupan en el cuarto inferior izquierdo. La hipo-metilación se muestra para los genes que se agrupan en el cuarto superior izquierdo para DCM y el cuarto inferior derecho para los controles.

Figura 2 *Genes metilados diferencialmente en pacientes de DCM*

A-C) Gráficos de barras que muestran el grado de metilación de CGI de la cohorte de exploración (n = 9 pacientes de DCM; n = 8 controles). Los 5 genes con el mayor aumento de metilación en pacientes con DCM se muestran en A) y los genes con la mayor disminución de la metilación se representan en B). C) Lo que se muestra son los 20 genes con los cambios de metilación más significativos en la fase de exploración. Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 3 *Validación basada en MassArray de genes dismetilados*

A y B) Validación basada en MassArray de metilación diferencial en *LY75* y *ERBB3*. Los pacientes de DCM presentaban una metilación de ADN significativamente aumentada en *LY75* (A), mientras que el *ERBB3* está significativamente menos metilado (B). Los esquemas por encima de los gráficos de metilación representan los CGI ensayados (CGI-1, CGI-2, CGI-3), en relación con el sitio de inicio de la transcripción previsto (la línea vertical más a la izquierda), los exones (barras negras) y los exones cortados y empalmados alternativamente (cuadros blancos) de los genes. A) Los gráficos de caja y bigote (mín. a máx.) en el lado superior izquierdo representa la media de metilación de CpG medida por MassARRAY, la metilación de CpG individual se muestra en la parte inferior. El patrón de metilación de CpG en múltiples clones se muestra en la inserción superior derecha. B) El gráfico de caja y bigotes (mín. a máx.) en el lado izquierdo representa la

metilación de CpG media medida por MassARRAY, la metilación de CpG individual se muestra a la derecha. C y D) Validación basada en MassARRAY de la metilación diferencial en *HOXB13* y *ADORA2A*. Los pacientes de DCM presentan una metilación de ADN significativamente disminuida en *HOXB13* (A) y *ADORA2A* (B). A) El gráfico de caja y bigotes (mín. a máx.) del lado izquierdo representa la media de la metilación de CpG medida por MassARRAY, la metilación individual de CpG se muestra a la derecha. B) El esquema por encima del gráfico representa el CGI ensayado, en relación para el sitio de inicio de la transcripción previsto (la línea vertical más a la izquierda), los exones (cuadros negros) y exones alternativamente cortados y empalmados (cuadros blancos) de *adora2a*. Las líneas discontinuas indican 1500 pb de la región corriente arriba y abajo de los CGI en los que se encuentran los sitios de unión al factor de transcripción enumerado. Los gráficos de cajas muestran la media de metilación en DCM y controles en el CGI correspondiente. El patrón de metilación de CpG según se evalúa por secuenciación con bisulfito en múltiples clones se muestra para el CGI-1 en la parte inferior de la figura. E) Validación basada en MassARRAY de la metilación diferencial en *ADORA2A*. El gráfico representa la metilación individual de CpG en *ADORA2A* medida por MassARRAY en pacientes con DCM y controles.

Figura 4 Validación basada en MassARRAY de genes dismetilados adicionalmente

Los gráficos representan la metilación media de CGI de dianas incluidas en el estadio de replicación. Los pacientes con DCM muestran una reducción en el nivel de metilación en *CLDN4*, *FDX1*, *ID4*, *NAT1*, *PPARGC1A*, *SULF2*, *TFF1*, *TKT*, *FLJ20701* y un aumento de metilación en *ATP2C*, *CCDC59*, *GFI1*, *GSTM5m*, *SLC9A6*, y *TDG*.

Figura 5 Metilación de islote CpG de sujetos de control antes y después del trasplante cardíaco.

El diagrama lineal muestra el grado altamente similar de metilación de ADN derivado de la sangre periférica de los sujetos de control antes (línea con círculos) y después (línea con cuadrados) del trasplante de corazón (n = 11) para *LY75*, *ADORA2A*, *ERBB3* y *HOXB13*. Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 6 Expresión de ARNm de genes con estado de metilación alterado y análisis del promotor genético.

A-C) Gráfico de barras que muestra los niveles de expresión de ARNm relativos de *LY75*, *ERBB3* y *ADORA2A* en DCM leve y moderada-grave en comparación con los controles. A) La expresión de *LY75* está fuertemente reducida (expresión relativa = 0,04), mientras que los niveles de ARNm *ERBB3* (B) no están regulados. C) *ADORA2A* también está regulado negativamente significativamente en DCM (expresión relativa = 0,37).

D) Se dan los valores medios delta-CT (\pm SEM) de *LY75*, *ERBB3* y *ADORA2A* en los diferentes grupos (controles, DCM moderada, DCM grave). La referencia se basa en la media de los tres genes constitutivos: *GAPDH*, *RPL13*, β -*Actina*.

E) Izquierda: Esquema del vector construido para medir la actividad del promotor *LY75* sin y tras el tratamiento con la metilasa *SssI*. Derecha: Actividad del promotor relativa (media de tres repeticiones técnicas \pm SD) que muestran la actividad fuertemente reducida en *LY75* después de la metilación, mientras que el control negativo no muestra diferencias significativas.

Figura 7 Expresión tipo celular y tisular de *ly75* y *adora2a*.

A) Niveles de expresión relativos de *ly75* y *adora2a* cuantificados por q-PCR en 40 embriones de pez cebra completos (barras grises) y 200 corazones embrionarios aislados de pez cebra (barras negras). B-C) Expresión de *ly75* y *adora2a* en cardiomiocitos y cardioblastos neonatales de rata (n = 3 repeticiones biológicas). Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 8 El *ly75* es esencial para mantener la contractilidad cardíaca

A) La hibridación de ARNm antisentido muestra que el *ly75* se expresa significativamente en el corazón del pez cebra. B, C) vistas laterales de embriones infectados con MO3-control (B) y MO-*ly75* (C) a las 72 hpf. Tras el agotamiento de *ly75*, que se puede controlar por el análisis de corte y empalme de ADNc (D), corazones de pez cebra que muestran una reducción de fuerza contráctil (E) y congestión pre-cardíaca de sangre (punta de flecha) como un signo de insuficiencia cardíaca manifiesto. Los *ly75*-morfantes también muestran un desprendimiento notable de la piel más pronunciado en la región de cabeza/ojos (C).

F) La definición de la cámara molecular no está alterada en los *ly75*-morfantes en comparación con los peces cebra inyectados con el control como se demuestra por la expresión regular de *amhc*, *vmhc*, MF20, y S46. hpf = horas post fertilización; *amhc* = cadena pesada de miosina auricular; *vmhc* = cadena pesada de miosina ventricular; A = aurícula; V = ventrículo. Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 9 La pérdida de *adora2a* da lugar a insuficiencia cardíaca en pez cebra.

A) Alineamientos de secuencia de aminoácidos de *ADORA2A* humana (h) y de pez cebra (z) que demuestra su alta homología entre especies. Los cuadros negros indican la identidad de aminoácidos, los cuadros grises indican los aminoácidos con propiedades químicas similares. B) El *adora2a* se expresa significativamente en el corazón del pez cebra. C, D) Vista lateral de los embriones de MO-control (B), y MO-*adora2a* (C) inyectados 72 hpf. Después de la inyección de MO-*adora2a*, un 66 % de los embriones morfantes

desarrollaban un insuficiencia cardíaca progresivo y el deterioro de la contractilidad ventricular medida por el acortamiento fraccional (E) en los estadios de desarrollo. Las barras de error indican la desviación estándar. F) la definición de cámara molecular no está alterada en los *adora2a*-morfantes en comparación con los peces cebrá inyectados con el control como se demuestra por la expresión regular de *amhc* y *vmhc*.

5 **Figura 10 Conservación proteica de LY75**

Alineamientos de secuencias de aminoácidos de LY75 humano (h), de ratón (m) y pez cebrá (z) que demuestra su homología entre especies. Los cuadros negros indican la identidad de aminoácidos, los cuadros grises indican los aminoácidos con propiedades químicas similares.

Ejemplos

10 **1. Materiales y procedimientos**

1.1 Pacientes y controles

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes del estudio habían dado un consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por los comités de ética. La DCM se diagnosticó de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los criterios de inclusión de los casos de DCM eran la presencia de función sistólica ventricular izquierda reducida (fracción de eyección ventricular izquierda < 45 % evaluada por ecocardiografía) en ausencia de enfermedad coronaria relevante (CAD) como se determina por angiografía coronaria. Los pacientes con enfermedad valvular o hipertensiva cardíaca, historia de miocarditis, consumo regular de alcohol o quimioterapia cardio-tóxica también se excluyeron. Los especímenes de biopsias de control se obtuvieron de pacientes que habían recibido un trasplante cardíaco. Todos los pacientes de la cohorte de control tenían un trasplante cardíaco satisfactorio de hacía más de 6 meses con función sistólica y diastólica normal y sin evidencia de vasculopatía relevante como se juzgó por la angiografía coronaria. Además, todos los controles se presentaban libres de rechazo orgánico agudo o crónico relevante.

1.2 Procesamiento de las biopsias de ventrículo izquierdo

Los especímenes de biopsia se obtuvieron de la parte apical de la pared libre del ventrículo izquierdo (LV) de pacientes con DCM o pacientes de trasplante sanguíneo (controles) sometidos a cateterización cardíaca utilizando un protocolo convencionalizado. Las biopsias se lavaron con NaCl (0,9 %) e inmediatamente se transfirieron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se extrajo el ARN y ADN. El ADN se extrajo utilizando el kit DNeasy de sangre y tejido, el ARN total utilizando el kit RNeasy de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen, Alemania). La pureza y concentración del ARN se determinó utilizando el Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies, Berkshire, RU) con un chip de ensayo Pico de ARN total de Eucariotas. Como un problema crítico para la fiabilidad del análisis de expresión genética es la calidad de las muestras de ARN, se definió un número de integridad de ARN (RIN) > 6 como el requerimiento mínimo para análisis posteriores.

1.3 Perfil de metilación del ADN y mapeo de precisión

Para la medición de los perfiles de metilación, los inventores utilizaron el ensayo Infinium HumanMethylation 27 BeadChip de Illumina con 1000 ng de ADN por muestra. El procedimiento seguía el flujo de trabajo convencional de los fabricantes, comenzando con el tratamiento con bisulfito de la muestra de ADN que daba lugar a la conversión de las citosinas no metiladas en uracilo, mientras que las 5-metilcitosinas permanecían sin cambios. Después de la amplificación y fragmentación del ADN convertido con bisulfito, se hibridaron con las Infinium BeadChips.

1.4 Validación de metilación de ADN por MassARRAY

La metilación de ADN se validó por la técnica MassARRAY como se había descrito anteriormente (Ehrich y col., 2005). En resumen, se modificaron 400-500 ng de ADN con bisulfito sódico utilizando el kit de metilación EZ (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN tratado con bisulfito se amplificó por PCR por los cebadores diseñados para cubrir las sondas Infinium que presentaban metilación diferencial en cada locus. Los amplicones se transcribieron por polimerasa T7, seguido por la escisión con la ARNasa-A específica de T. Los fragmentos digeridos se cuantificaron por una técnica basada en MALDI-TOF. Las secuencias de cebadores se dan en la Tabla 1. Las referencias de metilación de ADN (un 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, y 100 % de ADN genómico metilado) se utilizaron para confirmar la amplificación no tendenciosa de los amplicones. Para LY75 y ADORA2A los inventores generaron 14 y 12 clones, respectivamente, de 2 pacientes con DCM y 2 controles, cada uno, y se secuenciaron antes y después del tratamiento con bisulfito. Los datos de metilación se analizaron estadísticamente por el ensayo t de Student, o ANOVA, seguido por comparación múltiple de Dunnett.

Tabla 1: Secuencias de cebador para la metilación de islotes CpG de genes candidatos.

Genes	Cebadores directos	Cebadores inversos
<i>ADORA2A</i>	TTTTTTAGGTGGGTGTTGGTAGTT (SEQ ID NO: 19)	AATCCCCTAATCCAATAAAATTCC (SEQ ID NO: 20)
<i>ATP2C1</i>	ATTGGATAAAGGTATAGTTGTAAAAGAAG (SEQ ID NO: 21)	AACAATCACAATCTCAACAAACAAC (SEQ ID NO: 22)
<i>CCDC59</i>	TTTTTAGTGGAAAGTAGAGTGGGAAG (SEQ ID NO: 23)	TTAAAACAACCTCCTTACACAATCC (SEQ ID NO: 24)
<i>CLDN4</i>	GTTTATTTATAGGTTTTTTTAGATGGTTTG (SEQ ID NO: 25)	CATCAAACTAACTTTATCTCCTAACTCA (SEQ ID NO: 26)
<i>ERBB3</i>	GGAGATTTTTTAGTAGAGAATAGGTTTTTT (SEQ ID NO: 27)	TACTACCCAAAACCCTACTAATCCC (SEQ ID NO: 28)
<i>FDX1</i>	TTTGTTTTATAGTGGGTAGAATTTATTT (SEQ ID NO: 29)	AACCTATAAAAACATTAACAAACAAAAC (SEQ ID NO: 30)
<i>FLJ20701</i>	GATTTTAAATTTTAGTGAGGGGTGAA (SEQ ID NO: 31)	TCCAAAACAAAAATAAACTCCAAA (SEQ ID NO: 32)
<i>GFI1</i>	TTTATTTAATGAGTAAAGGGTGTAGGT (SEQ ID NO: 33)	CCTAAAATCATACCCAAACACTAAAT (SEQ ID NO: 34)
<i>GSTM5</i>	GGAGGGGGTTTATTGATTTTAGTTT (SEQ ID NO: 35)	TAACCTTCTCTACACCAAACCAACC (SEQ ID NO: 36)
<i>HOXB13</i>	GGTAGTTTTGGTTTTGGGTTTT (SEQ ID NO: 37)	ACTATCCCTAAATCTCATCTCTCCC (SEQ ID NO: 38)
<i>ID4</i>	AATGGAGTGTTTTTTTTATTGGTT (SEQ ID NO: 39)	AATATCCTAATCACTCCCTTC (SEQ ID NO: 40)
<i>LY75</i>	GTATTTTTGTTTAGGTTTTTGGGG (SEQ ID NO: 41)	AAAAATCATAAATCCCTTTCCAATC (SEQ ID NO: 42)
<i>NAT1</i>	TTTTTTAGGAAGTAAAAGGAATGTT (SEQ ID NO: 43)	TCAAACCTACCTAATCTCACTATCCC (SEQ ID NO: 44)
<i>PPARGC1 A</i>	GATTTTTTAAAAGTTTTGTTTGG (SEQ ID NO: 45)	ACAAATACCTTCAATTCCTCTCAA (SEQ ID NO: 46)
<i>SLC9A6</i>	GTTTTTGATTGGGTAGGGGT (SEQ ID NO: 47)	AACTTACCATAAATCATAACCAAACC (SEQ ID NO: 48)
<i>SULF2</i>	GAGTTTTGTGAAAGTAGATAAAAAGAAAAT (SEQ ID NO: 49)	TAACACACAAACCAAAAAACATC (SEQ ID NO: 50)
<i>TDG</i>	TGGTTGGTAGTATTTAGATAGTGGTTG (SEQ ID NO: 51)	ATATACACAACACCCCAAAAACAA (SEQ ID NO: 52)
<i>TFF1</i>	AGGTTGTAGAGTTGGTTGTGGTT (SEQ ID NO: 53)	AACTTTCTAAATCTCAAATCCCTCAA (SEQ ID NO: 54)
<i>TKT</i>	GGGAAGGTTATTATTATTGTTGTTTT (SEQ ID NO: 55)	AAATCCCAAAATTCTACACCCA (SEQ ID NO: 56)
<i>XRCC5</i>	GTTTTTTGTTAGGTTTGAAAGGGG (SEQ ID NO: 57)	AAAAAAAATCTAACTCCAAAACCTCTAA (SEQ ID NO: 58)

Las secuencias genómicas diana respectivas se muestran en las SEQ ID NO: 59 a 78: secuencia genómica diana del gen

<i>ADORA 2A</i>	SEQ ID NO: 59;
<i>ATP2C1</i>	SEQ ID NO: 60;
<i>CCDC59</i>	SEQ ID NO: 61;
<i>CLDN4</i>	SEQ ID NO: 62;
<i>ERBB3</i>	SEQ ID NO: 63;
<i>FDX1</i>	SEQ ID NO: 64;
<i>FLJ20701</i>	SEQ ID NO: 65;

<i>GFI1</i>	SEQ ID NO: 66;
<i>GSTM5</i>	SEQ ID NO: 67;
<i>HOXB13</i>	SEQ ID NO: 68;
<i>ID4</i>	SEQ ID NO: 69;
<i>LY75</i>	SEQ ID NO: 70;
<i>NAT1</i>	SEQ ID NO: 71;
<i>PPARGC1A</i>	SEQ ID NO: 72;
<i>SLC9A6</i>	SEQ ID NO: 73;
<i>SULF2</i>	SEQ ID NO: 74;
<i>TDG</i>	SEQ ID NO: 75;
<i>TFF1</i>	SEQ ID NO: 76;
<i>TKT</i>	SEQ ID NO: 77;
<i>XRCC5</i>	SEQ ID NO: 78.

1.5 Ensayo de promotor de luciferasa

Para evaluar la unión causal de la metilación de CGI con la región promotora de *LY75* con expresión reducida de ARNm observada en el tejido miocárdico, los inventores llevaron a cabo un ensayo de promotor de luciferasa esencialmente como se había descrito anteriormente (Smith y col., 2006). Por lo tanto, los inventores clonaron un fragmento centra grande de 1,6 kb (Tabla 2) de la región promotora de *LY75* incluyendo el CGI analizado en los sitios *Spel/BamHI* del vector básico pCpGL de luciferasa libre de CpG. Como control negativo del efecto de metilación los inventores utilizaron el vector pCpGL-CMV/ER1 indicador de control libre de CpG (Klug y Rehli, 2006). A continuación, los inventores trataron ambos vectores con la metilasa *SssI* (New England BioLabs) o se dejaron sin tratar, respectivamente. La metilación se llevó a cabo en 10 mM Tris, pH 7,9, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT y 160 μM de SAM a 37 °C durante 1 hora (Blesa y col., 2008). Se llevó a cabo la transfección de células HEK293A humanas con cantidades iguales de los vectores pCpG-LY75 tratados con *SssI* o sin tratar o con pCpGL-CMV/EF1 utilizando Lipofectamina (Invitrogen). Adicionalmente, los inventores co-transfectaron estas células con el vector pGL4.74 [hRluc/TK] *Renilla* de control como una referencia (Promega). Después de 48 horas, las células se lisaron y se midió la actividad de luciferasa y *Renilla* de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual, Promega). Los resultados se expresaron como la actividad de luciferasa relativa (fondo sustraído y normalizado a la referencia de *Renilla*; tres repeticiones técnicas) de las construcciones metiladas frente a las no metiladas.

Tabla 2: Secuencias de cebador para el ensayo del promotor de luciferasa

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
<i>LY75</i>	TGGCACTACCCTGAACATCA (SEQ ID NO: 79)	CATGAAATTTCTGGTTCTGCAT (SEQ ID NO: 80)

La secuencia genómica diana respectiva se muestra en la SEQ ID NO: 81.

1.6 Predicción de la región promotora y análisis del sitio de unión al factor de transcripción

Los inventores aplicaron el software de Predicción de Promotor 2.0 que predice los sitios de inicio de la transcripción (TSS) de los promotores Pol II de vertebrados en el ADN genómico para estimar la distancia de los CGI desde los sitios de inicio transcripcionales potenciales (Knudsen 1999). Para la detección de unión al factor de transcripción, se utilizaron los datos del ChIP-seq del factor de transcripción ENCODE. Para cada región (tamaño de CGI y 1500 pb corriente arriba y abajo), los inventores seleccionaron en el máximo los tres factores corriente arriba y tres factores corriente abajo con unión observada más fuerte.

1.7 Agrupamiento jerárquico

Para generar una representación gráfica de los genes cardíacos dimetilados más significativamente en el estadio de exploración y para detectar patrones entre los genes respectivos, se aplicó un agrupamiento jerárquico. Antes del agrupamiento, a los pacientes se les atribuyó un rango para cada gen de acuerdo con el grado de metilación, es decir, el paciente con menor grado de metilación para un cierto gen recibió un rango de 1, mientras que el paciente con el grado más alto de metilación recibió un rango de 17, ya que 17 muestras cumplían con los criterios para el estadio de exploración. Después, para todas las muestras y todos los genes se computaron las distancias Euclidianas por parejas y se llevó a cabo un agrupamiento de abajo a arriba de estas distancias. Todas las computaciones se llevaron a cabo utilizando programación estadística en lenguaje R.

1.8 Análisis de la red genética

Para ensayar si los genes con patrones de metilación diferencial pertenecían a cierta categoría biológica los inventores llevaron a cabo un Análisis de Enriquecimiento del Conjunto Genético (GSEA) sin sopesar. En detalle, los inventores clasificaron primero todos los genes de acuerdo con el valor absoluto de la mediana de distancias entre los pacientes de DCM y los controles, generaron una lista clasificada de genes donde los genes más metilados diferencialmente estaban en la parte superior mientras que los genes sin metilación diferencial estaban localizados en la última parte de la lista. Si un gen estaba representado por múltiples actuaciones en el biochip (sitios de metilación diferentes) se computaba la mediana de posición de todos los que estaban repetidos en la lista clasificada. Esta lista clasificada se utilizó entonces como entrada en el Gene Trail (Backes y col. 2007). Para cada categoría se computa un valor de significancia por una estrategia de programación dinámica (Keller y col. 2007) y todos los valores de significancia de una cierta categoría se han ajustado por ensayo múltiple utilizando el ajuste de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995). La ventaja de la estrategia bioestadística libre de punto de corte que se aplica es que los genes con valores de p de 0,049 y 0,051 se consideran que son casi igualmente importantes en la estrategia de los inventores mientras que los genes con valores mayores en el medio y el final de la lista se consideran que no son relevantes. Por el contrario, los análisis de sobre-presentación clásica que se basan en puntos de corte (habitualmente de 0,05) considerarían los genes con un valor de p de 0,049 como relevantes mientras que los genes con valores de p de 0,051 se considerarían no relevantes, que tienen el mismo impacto que los genes con valores de p mayores.

1.10 Análisis transcriptómicos

Se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR) con el fin de medir la expresión de genes seleccionados. Los cebadores se diseñaron utilizando el NCBI Primer-Balst y se sintetizaron por el Operón MWG Eurofins (Ebersberg, Alemania). Se transcribieron inversamente 60 ng de ARN total extraído de biopsias de pacientes de DCM independientes (moderada: n = 7; grave n = 5) y los controles (n = 7) utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena SuperScript III (Thermo Scientific) utilizando un sistema 7000 ABI (ABI). Se controló la especificidad de cada par de cebadores por el análisis de la curva de disociación. Los valores del umbral del ciclo (CT) se evaluaron en la fase exponencial de amplificación y los datos se analizaron utilizando el procedimiento delta-CT. El valor medio de los genes de referencia *GAPDH*, *RPL13*, *β-Actina* se utilizó como referencia.

Para identificar la isoforma cardíaca predominante de *ADORA2A*, los inventores llevaron a cabo la PCR con el siguiente par de cebadores para ambas isoformas (ENST00000337539 y ENST00000541988):

5'-CTGTGACATGGAGCAGGAGC-3' [SEQ ID NO: 82] y
5'-GCTGTGCTTTGCCATCGGCCT-3' [SEQ ID NO: 83].

Para evaluar los niveles de expresión de *ly75* y *adora2a* en el corazón de pez cebra y organismo completo, los inventores llevaron a cabo la q-PCR con el siguiente par de cebadores para *ly75*:

5'-CATGGCCAGTTTCGATCCAT-3' [SEQ ID NO: 84] y
5'-CACCTGGGACTACCTCCT-3' [SEQ ID NO: 85]

y *adora2a*:

5'-TGCTGACCCAGAGCTCCATA-3' [SEQ ID NO: 86] y
5'-AGAGGCATCATCGCGATCTG-3' [SEQ ID NO: 87].

Los resultados se muestran como valores de expresión relativos (normalizados contra el gen constitutivo *elf1a*).

Para analizar la expresión de *ly75* y *adora2a* en diferentes tipos celulares, los inventores cultivaron cardiomiocitos y cardiofibroblastos neonatales de rata durante 5 días y se procedió como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo la q-PCR utilizando los pares de cebadores ARN 18S:

5'-GGACATCTAAGGGCATCAC-3' [SEQ ID NO: 88] y
5'-CCTCCGACTTTCTGTTCTTGA-3' [SEQ ID NO: 89];

LY75

5'-CACGGTCTGATGAGCTGTGT-3' [SEQ ID NO: 90] y
5'-ACGAAGTGAACCTGACCAT-3' [SEQ ID NO: 91];

ADORA2A

5'-CTGGTCCTCACGCAGAGTTC-3' [SEQ ID NO: 92] y

5'-GCGAAGGGCATCATTGCAAT-3' [SEQ ID NO: 93].

Los datos de metilación se analizaron estadísticamente por el ensayo t de Student.

1.10 Inactivación genética mediada por Morfolino en el pez cebra

Los experimentos en pez cebra se llevaron a cabo bajo la aprobación institucional que conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicó el Instituto Nacional de Salud de EE. UU. (Publicación NIH N° 85-23, revisado en 1996). El cuidado y cría de pez cebra (*Danio rerio*) fue como se había descrito (Meder y col. 2011).

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos antisentido modificados con Morfolino (Gene Tools, EE. UU.):

El *ly75* (ENSDARG00000053113) Morfolino se dirige al sitio donante de corte y empalme del exón 3:

MO-*ly75*: 5'-GTGATGAAACGCACACCTCTCTCTGA-3' [SEQ ID NO: 94];

control mezclado MO3-*control*: 5'-GTCATGAAAGGCACACGTCTGCTCA-3' [SEQ ID NO: 95],

mientras que *adora2a* (ENSDARG00000033706) se dirigía a su sitio de inicio:

MO-*adora2a*: 5'-CATTGTTTCAGCATGGTGAGGTCGCT-3' [SEQ ID NO: 96];

control mezclado MO2-*control*: 5'-CATTCTTCACCATCGTGACGTGGCT-3' [SEQ ID NO: 97].

Se inyectaron los Morfolinos u oligonucleótidos de control (MO-*control*) en embriones en estadio de 1 célula como se había descrito anteriormente (Meder y col. 2009). Para confirmar la eficacia del sitio de corte y empalme de Morfolinos, los inventores analizaron su región diana por análisis de corte y empalme de ADNc (Meder y col. 2011).

1.11 Evaluación funcional y análisis estadístico de la función cardíaca

Se registraron imágenes y películas de vídeo y se digitalizaron con un microscopio Zeiss/MCU II. La evaluación funcional de la contractilidad cardíaca se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (Meder y col. 2009). Se midieron los diámetros auricular y ventricular para calcular el acortamiento fraccional con la ayuda del software zebraFS (<http://www.mederlab.com>). Los resultados se expresaban como la media \pm desviación estándar. Se llevaron a cabo tinciones MF20/S46 e hibridación *in situ* de ARNm antisentido como se había descrito anteriormente (Meder y col. 2009).

2. Resultados

2.1 La metilación de ADN está alterada en pacientes con DCM

Los inventores llevaron a cabo aquí un mapeo de metilación de ADN tipo embudo, de dos etapas en pacientes con DCM idiopática, no sistémica y en los controles (Tabla 3).

Tabla 3: Estudio de las características de la muestra de las cohortes de exploración y replicación

Cohorte	N	Femenino (%)	Edad (años)	LV-EF (%)
Exploración				
Casos de DCM	9	33	57 \pm 5,4	27 \pm 7,5
Controles	8	38	42 \pm 14	60 \pm 4
Replicación				
Casos de DCM	30	37	58 \pm 14	25,6 \pm 8,4
Controles	28	46	57 \pm 12	61,5 \pm 5,3

Femenino = estado de donante femenino del corazón trasplantado;
LV-EF = fracción de eyección ventricular izquierda.

En el estadio de exploración, los inventores evaluaron los niveles de metilación del ADN ampliamente genómico de los islotes CpG (CGI) utilizando la plataforma Infinium HumanMethylation 27. Para hacerlo, los inventores primero extrajeron 1000 ng de ADN genómico de las biopsias del LV de 10 pacientes de DCM y 10 controles. Tras hacer el perfil de metilación, 17 conjuntos de datos pasaban los criterios del filtro de calidad rigurosos, ejemplarmente mostrados por alcanzar intensidades de señal de color de perla altamente similares (datos no mostrados). La Figura 1A muestra un gráfico de correlación de los 27.578 sitios de metilación individuales para todos los pacientes y

controles analizados adicionalmente. Aunque el grado de metilación de la mayoría de los sitios CpG está altamente correlacionado entre los dos grupos, los inventores detectaron varios CGI que estaban hipo- (puntos verdes) o hiper-metilados (puntos rojos) en la DCM en comparación con los controles (sin ajustar a valor $p < 0,05$).

5 Los inventores utilizaron conjuntos de datos de exploración completos en el Análisis de Enriquecimiento de
 Conjuntos Genéticos (GSEA) e identificaron en la parte superior (con rango atribuido por los valores de p) las tres
 categorías de enfermedad enriquecidas proporcionadas por las rutas de enfermedad del “Instituto Nacional de la
 Vejez” (NIA) “Enfermedad Cardiovascular”, “Enfermedad Metabólica”, y “Afecciones Patológicas”, todas asociadas
 razonablemente con DCM y con considerables solapamientos entre ellas (Fig. 1B). Para detectar los patrones de
 10 genes con metilación diferencial en las cohortes de exploración, los inventores llevaron a cabo una estrategia de
 agrupamiento en genes con una expresión conocida abundante en el corazón humano (<http://c-it.mpi-bn.mpg.de>).
 DE los 2.018 genes individuales anotados, 1.858 (el 92,1 %) estaban cubiertos por el ensayo Infinium aplicado.
 Aunque los grados de metilación para los genes no estaban distribuidos normalmente, los inventores utilizaron un
 ensayo de rango de sumas de Wilcoxon de dos colas para computar un valor de significancia para cada gen, lo que
 15 resultó en un total de 90 genes que superaban la significación estadística (valor de $p < 0,05$). Mientras que
 aproximadamente un tercio mostraba un aumento de metilación en los pacientes de DCM, aproximadamente dos
 tercios estaban significativamente menos metilados. La Figura 1C da una representación gráfica de patrones de
 metilación diferencial utilizando el agrupamiento jerárquico de la distancia Euclidiana. El mapa caliente muestra los
 patrones de genes altamente y bajamente metilados en pacientes con DCM y controles.

20 Para el estadio de replicación en una cohorte independiente, se utilizaron los patrones de metilación de genes
 únicos para definir candidatos para el mapeo de precisión basado en espectrometría de masas. La Figura 2A y B
 muestran los cinco genes hiper e hipo-metilados, mientras que la C detalla los 20 genes más significativamente
 dismetilados del estadio de exploración. La selección final se basó en los valores de p no ajustados o la diferencia de
 metilación absoluta, localización de los CGI, capacidad para diseñar sondas de ensayo específicas, y la expresión
 conocida en el corazón.

25 2.2 Validación de metilación de ADN aberrante en DCM

Como se ha señalado anteriormente, los inventores llevaron a cabo una replicación independiente y mapeo de
 precisión de los genes seleccionados en una cohorte más grande de 30 pacientes de DCM idiopática y 28 controles.
 Los candidatos seleccionados se mapearon con precisión utilizando el MassARRAY (Ehrich y col. 2005).

30 Para cada gen, se recuperaron varios CpG y se cuantificó su estado de metilación. De 20 genes candidatos, doce
 mostraban la misma dirección de metilación alterada entre el estadio de exploración y de replicación y cuatro de
 ellos alcanzaron significación estadística, a saber, *LY75* ($p=0.000$), *ERBB3* ($p=0,013$), *HOXB13* ($p=0,001$), y
ADORA2A ($p=0,011$). La Figura 3 presenta la media de cambios de metilación de los genes replicados.
 Adicionalmente, se presenta la metilación de los CpG individuales para *LY75* y *ERBB3* (Fig. 3A, B), *HOXB13* (Fig.
 35 3C) y *ADORA2A* (Fig. 3D). De manera interesante, *ADORA2A* presentaba una metilación significativamente alterada
 a lo largo de todos los CpG ensayados, mientras que *ERBB3* o *LY75* presentaban alteraciones de metilación en un
 subconjunto de nucleótidos CpG, posiblemente que daban como resultado consecuencias funcionales. La Figura 4
 da la media de metilación del resto de los CGI investigados. Como las marcas epigenéticas también pueden
 depender del género, los inventores hicieron coincidir adicionalmente la relación de género de los casos y controles
 40 de la cohorte de replicación con la relación de la cohorte de exploración, dando lugar a la significación de los mismos
 CGI que se muestra anteriormente. También es cierto cuando se hacen coincidir hembras y machos 1:1.

Además del MassARRAY, los inventores también aplicaron la secuenciación con bisulfito para *LY75* y *ADORA2A*
 para mapear con precisión y de nuevo replicar técnicamente los resultados. Para hacer esto, los inventores
 generaron 14 clones de *LY75* y 12 de *ADORA2A* de dos pacientes de DCM y dos controles de cada uno, y los
 45 secuenciaron antes y después del tratamiento con bisulfito (Fig. 3A y Fig. 3D; círculos negros = CpG metilados,
 círculos blancos = CpG no metilados). La secuenciación con bisulfito confirmó los datos del MassARRAY
 correspondientes y, por lo tanto, demostraron la fiabilidad de la última técnica.

A continuación, para descartar un potencial efecto de la medicación inmunosupresora que recibían los sujetos de
 control (Tabla 4) sobre la metilación de los genes investigados aquí, los inventores analizaron los patrones de
 50 metilación del ADN genómico de 11 sujetos extraídos antes y después del trasplante de corazón (HTX) (media del
 periodo de tiempo tras la HTX = 37 meses con medicación). Como se muestra en la Figura 5 los inventores
 descubrieron niveles de metilación altamente comparables ($p = n.s.$) de los CGI *LY75*, *ADORA2A*, *ERBB3*, y
HOXB13 antes y después de la HTX, indicando que las diferencias de metilación observadas en la DCM no eran
 debidas a cambios de metilación en los controles que recibían medicación inmunosupresora.

Tabla 4: Medicación inmunosupresora de los individuos de control

Medicación	N	%
Tacrolimus	19	54
Micofenolato	23	66
Ciclosporina	8	23

(continuación)

Medicación	N	%
Prednisolona	11	31
Everolimus	14	40

Todos los controles individuales recibieron uno o más inmunosupresores.

2.3 La expresión genética diferencial y evaluación funcional *in vivo* apunta hacia un papel funcional de la metilación de ADN alterada en la DCM

La metilación de ADN a menudo se correlaciona con cambios en la accesibilidad de ADN a los activadores transcripcionales, amplificadores, o represores. Por lo tanto, los inventores estudiaron primero el impacto de la metilación de ADN en los loci *LY75*, *ERBB3*, *HOXB13*, y *ADORA2A* sobre su expresión genética por PCR cuantitativa (q-PCR) en controles, DCM leve (NYHA clase II) y DCM moderada a grave (NYHA clase III-IV).

Para *ADORA2A*, los inventores descubrieron una relación positiva de expresión genética con metilación (expresión relativa = 0,33; $p = 0,002$), mientras que *ERBB3* no mostraba alteraciones significativas en los niveles de expresión cardíaca (Fig. 6B, C, D). Las transcripciones de *HOXB13* no se pudieron amplificar por PCR en las biopsias de LV tanto de pacientes como de controles. En el caso de *LY75*, el islote CpG hipermetilado está relativamente cerca del sitio de inicio de la transcripción (distancia 1.395 pb), mientras que la distancia entre los CGI en *ERBB3* (7.518 pb) y *ADORA2A* (14.329 pb) es marcadamente mayor (Fig. 3). Aunque los inventores observaron también una fuerte reducción de la expresión de *LY75* en tejido miocárdico (expresión relativa = 0,4; $p = 0,001$) en pacientes con DCM (Fig. 6A, D), los inventores se preguntaron si el aumento de metilación del promotor era directamente responsable de la disminución de la actividad transcripcional. Por lo tanto los inventores llevaron a cabo un ensayo de promotor luciferasa con promotores *LY75* no metilados y metilados. Como control negativo servía el vector pCpGL-CMV/EF1 indicador de control libre de CpG. Como se muestra en la Figura 6E, los inventores descubrieron una fuerte reducción de la actividad del promotor después de la metilación *in vitro*, apoyando la relación funcional entre la hipermetilación de *LY75* y la reducción de la expresión en la DCM humana.

Como los inventores encontraron una relación positiva bastante inusual de la expresión y metilación del gen *ADORA2A*, los inventores primero buscaron identificar la isoforma de *ADORA2A* predominante en el miocardio humano. Por PCR, los inventores descubrieron que las transcripciones más largas de *ADORA2A* ENST00000337539 y ENST00000541988 se expresaban altamente en el corazón. Sin embargo, la isoforma ENST00000417596, que se expresa altamente en sangre periférica, no se expresaba significativamente en el corazón. Los inventores investigaron entonces las regiones represoras potenciales en próxima vecindad de los CGI ensayados. Para la detección de los sitios de unión al factor de transcripción, se utilizaron los datos del ChIP-seq del factor de transcripción ENCODE. Los inventores descubrieron dos sitios represores potenciales (CTCF y NFKB) para el CGI-1 metilado aberrantemente, un sitio represor (CTCF) para el CGI-2 metilado aberrantemente y un sitio represor (Max) para el CGI-3 sin alterar. De manera interesante, ambos CGI hipometilados (1 y 2) albergan sitios de unión CTCF, que se identificaron recientemente como reguladores epigenéticos clave en otras enfermedades distintas.

Como no se sabía previamente que *LY75* y *ADORA2A* estaban implicadas en la patogénesis de DCM y insuficiencia cardíaca y ambos presentan una regulación negativa significativa en el miocardio de pacientes de DCM, los inventores investigaron sus papeles funcionales por inactivación genética en embriones de pez cebra (Dahme y col., 2009). Los inventores identificaron secuencias ortólogas para *LY75* y de *ADORA2A* humanas por búsquedas BLAST contra la base de datos Genbank de pez cebra. La identidad de secuencia proteica entre las versión de pez cebra y humana era del 61 % para *adora2a* (Figura 9A) y del 37 % para *ly75* (Figura 10). De manera similar a la situación humana, los inventores descubrieron que *adora2a* y *ly75* se expresaban altamente en el corazón del pez cebra utilizando q-PCR e hibridación *in situ* de ARN antisentido (Fig. 7, 8 y 9). Adicionalmente, como se muestra en células de rata neonatales cultivadas, ambos genes se expresan más en cardiomiocitos que en cardiofibroblastos (Figura 7B, C). Por lo tanto, para recapitular la regulación negativa de ambos genes como se observa en el corazón humano, los inventores los inactivaron en embriones de pez cebra por la inyección de oligonucleótidos modificados con Morfolino dirigidos contra el sitio donante de corte y empalme de *ly75* o el sitio de inicio de la traducción de *adora2a*. Como los peces cebra inyectados con el control (control Morfolino convencional así como Morfolinos de control mezclados) los embriones no mostraban ningún fenotipo obvio, la inactivación mediada por Morfolino del sitio de corte y empalme de *ly75* daba como resultado el salto parcial del exón 8 (Fig. 8D) y una fase consecutiva que previsiblemente daba lugar a una parada prematura de la traducción proteica. Como resultado, los *ly75* morfantes desarrollaban un insuficiencia cardíaca de "aparición tardía" con dilatación de la aurícula (Figura 8C) y contractilidad ventricular reducida que comienza a las 96 horas del estadio de desarrollo (FS = 46 ± 5 % a las 48 hpf y de un 29 ± 4 % a las 96 hpf) (Fig. 8E). Adicionalmente, los *ly75* morfantes mostraban un desprendimiento pronunciado y edema de la piel especialmente notable en el ojo y la región de la cabeza (Fig. 8C). Los embriones inyectados con MO-*adora2a* también desarrollaban insuficiencia cardíaca grave con una disminución progresiva de la contractilidad ventricular según se mide por el acortamiento fraccional (Fig. 9E). En detalle, la contractilidad ventricular de *adora2a* morfantes disminuía del 47 ± 11 % a las 48 hpf a 39 ± 8 % a las 72 hpf. A las 96 hpf, ambas cámaras cardíacas se

convertían casi en silentes. Ocasionalmente, los inventores también observaron fibrilación auricular en *adora2a* morfantos y embriones que desarrollaban un derrame pericárdico excesivo y congestión sanguínea pre-cardial como consecuencia de función cardíaca reducida. Para ambos, *ly75* y *adora2a* morfantos, los inventores no vieron alteraciones en la especificación y expresión de la cámara molecular de los genes de cadena pesada de miosina ventricular (Fig. 8 y 9).

Para investigar el papel funcional de ERBB3, los inventores también utilizaron en modelo animal de pez cebra. Los inventores descubrieron una homología de 56 % entre las secuencias de ortólogos humanas y de pez cebra de ERBB3. La inactivación de *erbb3b* da como resultado un fenotipo similar pero más temprano que *adora2a*. Ta a las 72 hpf, el 86 % de los *erbb3b* morfantos sufren de contractilidad cardíaca significativamente reducida, reducción del flujo sanguíneo entre la aurícula y el ventrículo, y derrame pericárdico (datos no mostrados). El FS a las 96 hpf está reducido a un 21 ± 64 % y la sangre se agrega en el tracto de flujo interno cardíaco (datos no mostrados). Adicionalmente, los *erbb3b* morfantos muestran regurgitación de sangre en el ventrículo (datos no mostrados), lo que sugiere un desarrollo deficiente de la válvula cardíaca. El análisis del sitio de corte y empalme de ADNc revelaba una inserción completa del intrón 2 así como una exclusión parcial del exón 2 que produce transcripciones aberrantes, de fase cambiada con codones de terminación prematuros.

Referencias

Backes C, Keller A, Kuentzer J, Kneissl B, Comtesse N, Elnakady YA, Muller R, Meese E, Lenhof HP. GeneTrail-advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Web Server issue):W186-92.

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2006; 116(7):1853-64.

Backs J, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA, Olson EN. Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. *Mol Cell Biol* 2008; 28(10):3437-45.

Bell, A.C., A.G. West, y G. Felsenfeld, The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*, 1999. 98(3): p. 387-96.

Bell, A.C. y G. Felsenfeld, Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* genes. *Nature*, 2000. 405(6785): p. 482-5.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 1995; 57:289-300.

Bielecka-Dabrowa y col., New methods in laboratory diagnostics of dilated cardiomyopathy. *Cardiol J.* 2008; 15(4):388-95

Blesa, J.R., A.A. Hegde, y J. Hewandez-Yago, *In vitro* methylation of nuclear respiratory factor-2 binding sites suppresses the promoter activity of the human TOMM70 gene. *Gene*, 2008. 427(1-2): p. 58-64.

Coppede F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: focus on DNA methylation. *Cancer Lett* 2011.

Dahme, T., H.A. Katus, y W. Rottbauer, Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. *Dis Model Mech*, 2009. 2(1-2): p. 18-22.

Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, Cantor CR, Field JK, van den Boom D. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(44):15785-90.

Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development*. Dic 1997; 124(24):4999-5011.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2):143-53. Friedrichs F, Zugck C, Rauch GJ, Ivandic B, Weichenhan D, Muller-Bardorff M, Meder B, El Mokhtari NE, Regitz-Zagrosek V, Hetzer R, Schafer A, Schreiber S, Chen J, Neuhaus I, Ji R, Siemers NO, Frey N, Rottbauer W, Katus HA, Stoll M. HBEGF, SRA1, and IK: Three cosegregating genes as determinants of cardiomyopathy. *Genome Res* 2009; 19(3):395-403.

Gaszner, M. y G. Felsenfeld, Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet*, 2006. 7(9): p. 703-13.

Giridhar PV, Funk HM, Gallo CA, Porollo A, Mercer CA, Plas DR, Drew AF. Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28(8):887-97.

- Grzeskowiak, R., y col., Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 2003. 59(2): p. 400-11.
- Hamad EA, Li X, Song J, Zhang XQ, Myers V, Funakoshi H, Zhang J, Wang J, Li J, Swope D, Madonick A, Farber J, Radice GL, Cheung JY, Chan TO, Feldman AM. Effects of cardiac-restricted overexpression of the A (2A) adenosine receptor on adriamycin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(6):H1738-47.
- Herceg Z, Vaissiere T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 2011; 6(7):804-19.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; 8(4):253-62.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6):415-28.
- Keller A, Backes C, Lenhof HP. Computation of significance scores of unweighted Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:290.
- Klug, M. y M. Rehli, Functional analysis of promoter CpG methylation using a CpG-free luciferase reported vector. *Epigenetics*, 2006. 1(3): p. 127-30.
- Knudsen, S., Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics*, 1999. 15(5): p. 356-61.
- Litzow MR. Novel therapeutic approaches for acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25(6):1303-17.
- Meder B, Laufer C, Hassel D, Just S, Marquart S, Vogel B, Hess A, Fishman MC, Katus HA, Rottbauer W. A single serine in the carboxyl terminus of cardiac essential myosin light chain-1 controls cardiomyocyte contractility *in vivo*. *Circ Res* 2009; 104(5):650-9.
- Meder B, Huttner IG, Sedaghat-Hamedani F, Just S, Dahme T, Frese KS, Vogel B, Kohler D, Kloos W, Rudloff J, Marquart S, Katus HA, Rottbauer W. PINCH proteins regulate cardiac contractility by modulating integrin-linked kinase-protein kinase B signaling. *Mol Cell Biol* 2011; 31(16):3424-35.
- Meurs KM, Kuan M. Differential methylation of CpG sites in two isoforms of myosin binding protein C, an important hypertrophic cardiomyopathy gene. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52(2):161-4.
- Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 2007; 21(14):1790-802.
- Movassagh M, Choy MK, Knowles DA, Cordeddu L, Haider S, Down T, Siggins L, Vujic A, Simeoni I, Penkett C, Goddard M, Lio P, Bennett MR, Foo RS. Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation* 2011; 124(22):2411-22.
- Smith, L.T., y col., Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006.103(4): p. 982-7.
- Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44(9):1038-55.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3740-5.
- Talens, R.P., y col., Variation, patterns, and temporal stability of DNA methylation: considerations for epigenetic epidemiology. *Faseb J*, 2010. 24(9): p. 3135-44.
- Timonen P, Magga J, Risteli J, Punnonen K, Vanninen E, Turpeinen A, Tuomainen P, Kuusisto J, Vuolteenaho O, Peuhkurinen K. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008; 124(3):293-300.
- Urmaliya VB, Church JE, Coupar IM, Rose'Meyer RB, Pouton CW, White PJ. Cardioprotection induced by adenosine A1 receptor agonists in a cardiac cell ischemia model involves cooperative activation of adenosine A2A and A2B receptors by endogenous adenosine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53(5):424-33.
- Villard E, Perret C, Gary F, Proust C, Dilanian G, Hengstenberg C, Ruppert V, Arbustini E, Wichter T, Germain M, Dubourg O, Tavazzi L, Aumont MC, Degroote P, Fauchier L, Trochu JN, Gibelin P, Aupetit JF, Stark K, Erdmann J, Hetzer R, Roberts AM, Barton PJ, Regitz-Zagrosek V, Aslam U, Duboscq-Bidot L, Meyborg M, Maisch B, Madeira H, Waldenstrom A, Galve E, Cleland JG, Dorent R, Roizes G, Zeller T, Blankenberg S, Goodall AH,

Cook S, Tregouet DA, Tiret L, Isnard R, Komajda M, Charron P, Cambien F. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2011.

Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell* 2006; 126(6):1189-201.

5

REIVINDICACIONES

1. Uso de un perfil de metilación del ADN de una muestra de paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica para el diagnóstico y/o control de la terapia de la cardiomiopatía dilatada (DCM) o insuficiencia cardíaca en un paciente,
- 5 en el que el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se compara con el perfil de metilación del ADN de una muestra de control,
- y en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa de DCM o insuficiencia cardíaca o del riesgo de desarrollar DCM o insuficiencia cardíaca o para la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia,
- 10 en el que la diferencia en el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente en comparación con el perfil de metilación del ADN de la muestra de control es un grado diferente de metilación de CpG y en el que el nivel de metilación de al menos el gen LY75 (SEQ ID NO: 3) es mayor en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control,
- 15 en el que la muestra del paciente es una muestra de tejido del ventrículo izquierdo, tejido del ventrículo derecho o sangre periférica, y
- en el que la muestra de control es de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el perfil de metilación del ADN de la muestra del paciente se determina durante el tiempo, en diferentes momentos, preferentemente durante el control de la terapia.
- 20 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el nivel de metilación de al menos uno de los siguientes genes adicionales es diferente en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control:

Receptor adenosina A2A (ADORA2A)	SEQ ID NO: 1
ERBB3	SEQ ID NO: 2
HOXB13	SEQ ID NO: 4
PPARGC1A	SEQ ID NO: 10
SLC9A6	SEQ ID NO: 17
FDX1	SEQ ID NO: 7
ATP2C	SEQ ID NO: 14
CCDC59	SEQ ID NO: 15
CLDN4	SEQ ID NO: 6
GFI1	SEQ ID NO: 5
GSTM5m	SEQ ID NO: 16
ID4	SEQ ID NO: 8
NAT1	SEQ ID NO: 9
SULF2	SEQ ID NO: 11
TDG	SEQ ID NO: 18
TFF1	SEQ ID NO: 12
TKT	SEQ ID NO: 13

preferentemente al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, y HOXB 13.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el nivel de metilación de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB13, CLDN4, FDX1, ID4, NAT1, PPARGC1A, SULF2, TFF1 y TKT (SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6-13) está reducido en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control (hipo-metilación), preferentemente al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB13,
- 25 o en el que el nivel de metilación de al menos uno de GFI1, ATP2C, CCDC59, GSTM5m, SLC9A6 y TDG (SEQ ID NO: 5, 14-18) es mayor en la muestra del paciente en comparación con la muestra de control (hiper-metilación).
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende poner en contacto el ADN genómico aislado de la muestra del paciente con al menos un reactivo que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados.
- 30 6. Kit para el diagnóstico y/o control de la terapia de la cardiomiopatía dilatada (DCM) o insuficiencia cardíaca en un paciente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que consiste en al menos dos conjuntos de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos de un conjunto son idénticos, complementarios o se hibridan en condiciones rigurosas con un segmento de al menos 15 nucleótidos de longitud de una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, y en el que los oligonucleótidos de cada conjunto adicional son idénticos, complementarios o se hibridan en condiciones rigurosas con un segmento de al menos 15 nucleótidos de longitud de una secuencia de
- 35

ácido nucleico seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2 y 4 a 18; y opcionalmente, un reactivo que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados.

5 7. Kit de acuerdo con la reivindicación 6, adecuado para su uso con técnicas de secuenciación de próxima generación, tecnologías de secuenciación basadas en polimerasa así como basadas en ligasa, como pirosecuenciación, secuenciación por ligadura, secuenciación de molécula única o secuenciación por nanoporos solas o en combinación con el tratamiento con bisulfito de nucleótidos de citosina.

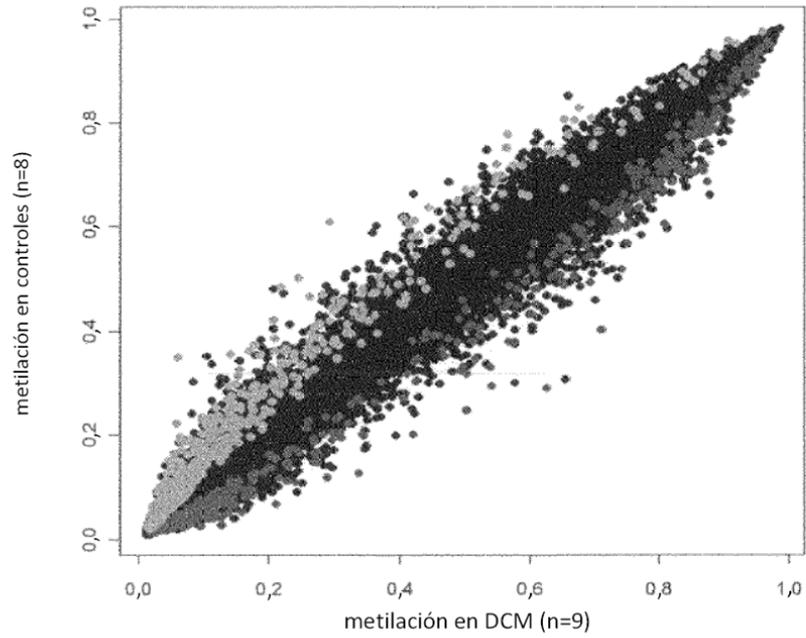
10 8. Uso de LY75 como marcador para el diagnóstico y/o control de la terapia de cardiomiopatía dilatada (DCM) o insuficiencia cardíaca en un paciente,
que comprende la determinación del nivel de metilación de SEQ ID NO: 3 en una muestra del paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica; y compararlo con el nivel de metilación de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca,
15 en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN es indicativa de DCM o del riesgo de desarrollar DCM o insuficiencia cardíaca o para la predicción de los efectos terapéuticos o el resultado de la terapia,
en el que la muestra del paciente es una muestra de tejido de ventrículo izquierdo, tejido de ventrículo derecho o sangre periférica, y
20 en el que la muestra de control es de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca o que tiene una función cardíaca normal.

9. El uso como marcador de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende el uso adicional de al menos uno de entre ADORA2A, ERBB3, HOXB13, GFI1, CLDN4, FDX1, ID4, NAT1, PPARGC1A, SULF2, TFF1, TKT, ATP2C, CCDC59, GSTM5m, SLC9A6 y TDG como marcador para el diagnóstico, pronóstico y/o control de la terapia de una enfermedad cardíaca en un paciente,
25 preferentemente al menos uno de ADORA2A, ERBB3, y HOXB13.

10. El uso como marcador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, que comprende la determinación del nivel de metilación de al menos uno de SEQ ID NO: 1, 2 y 4 a 18 en una muestra de paciente que comprende ADN genómico de células cardíacas, tejido cardíaco o sangre periférica; y compararlo con el nivel de metilación de un sujeto normal que no tiene una enfermedad cardíaca,
25 en el que una diferencia en el perfil de metilación del ADN es indicativa de una enfermedad cardíaca o del riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca o para la predicción de los efectos terapéuticos o resultado de la terapia.

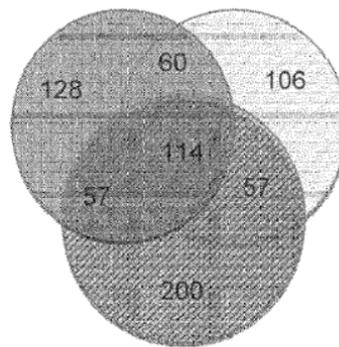
Figura 1 A y B

A



B

Rutas enriquecidas de enfermedades humanas



Categoría

- Enfermedades cardiovasculares
- Enfermedades Nutricionales y Metabólicas
- Afecciones patológicas. Signos y Síntomas

Observadas (n)

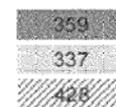


Figura 1 C

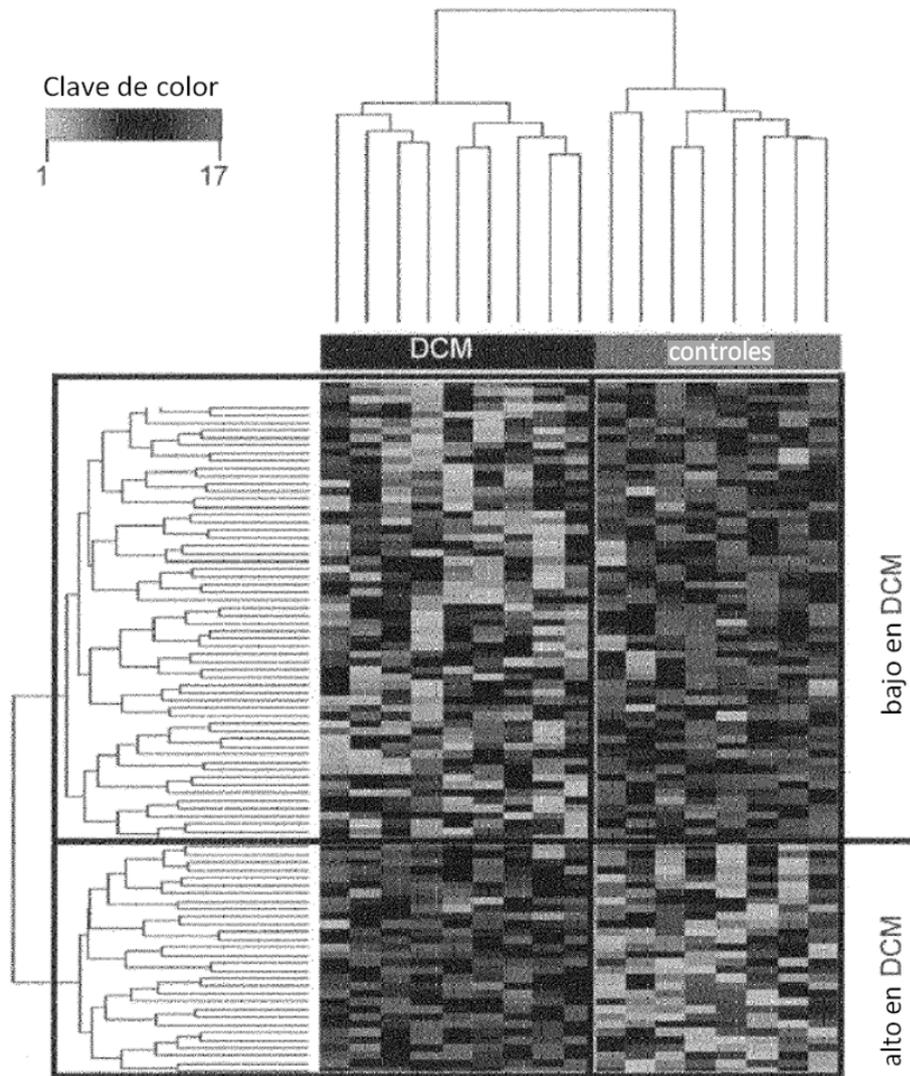


Figura 2

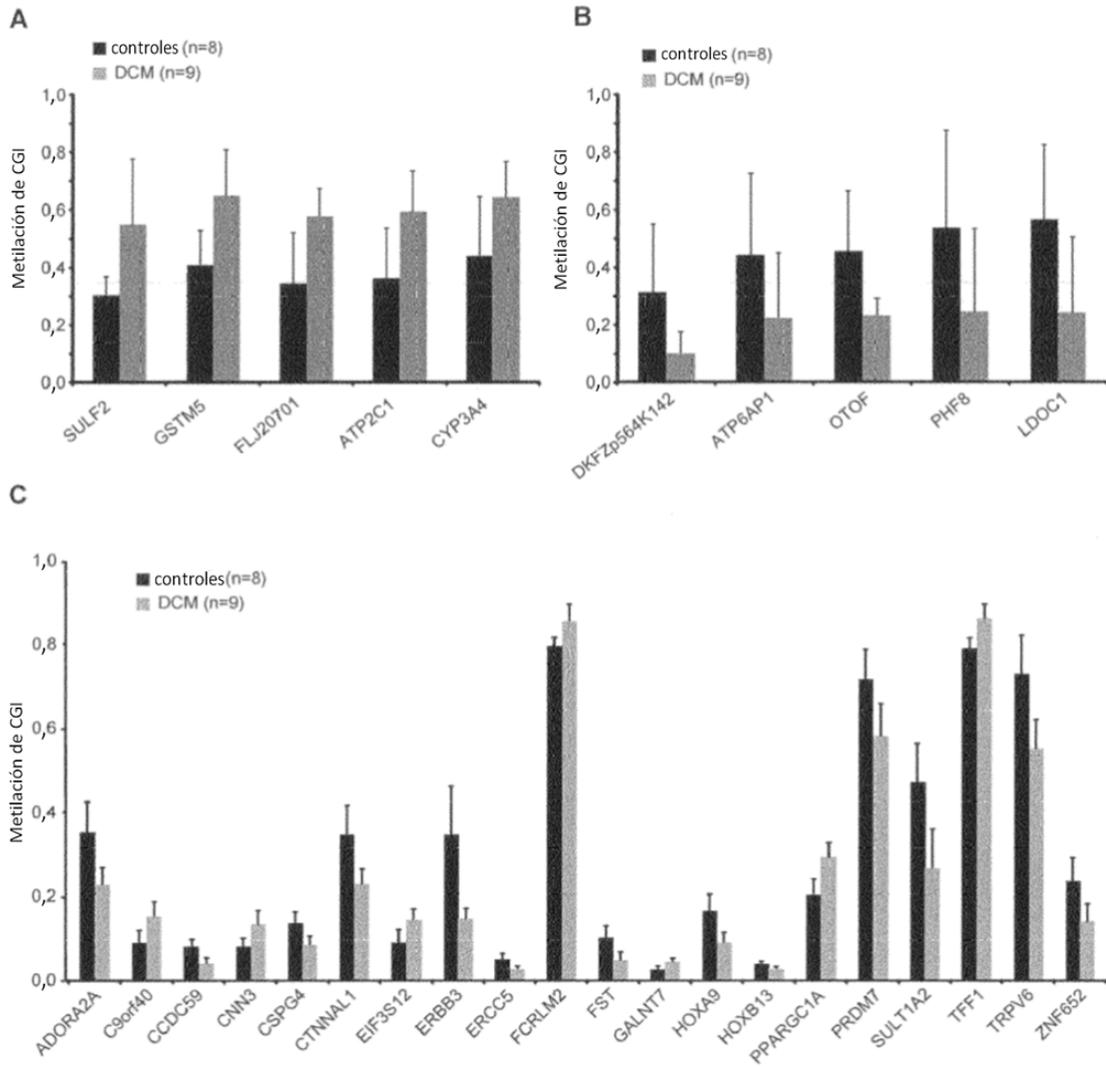


Figura 3 A y B

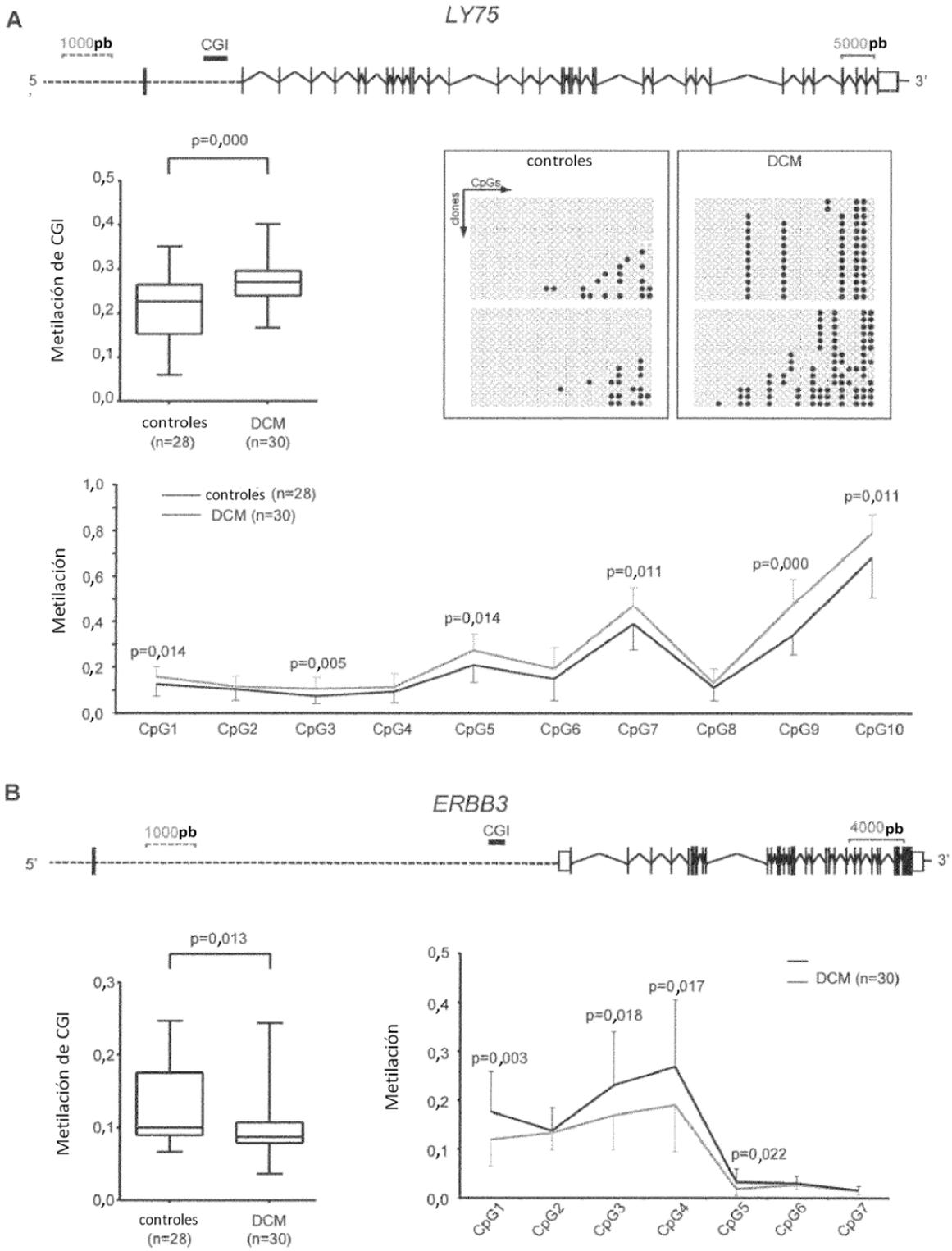


Figura 3 C y D

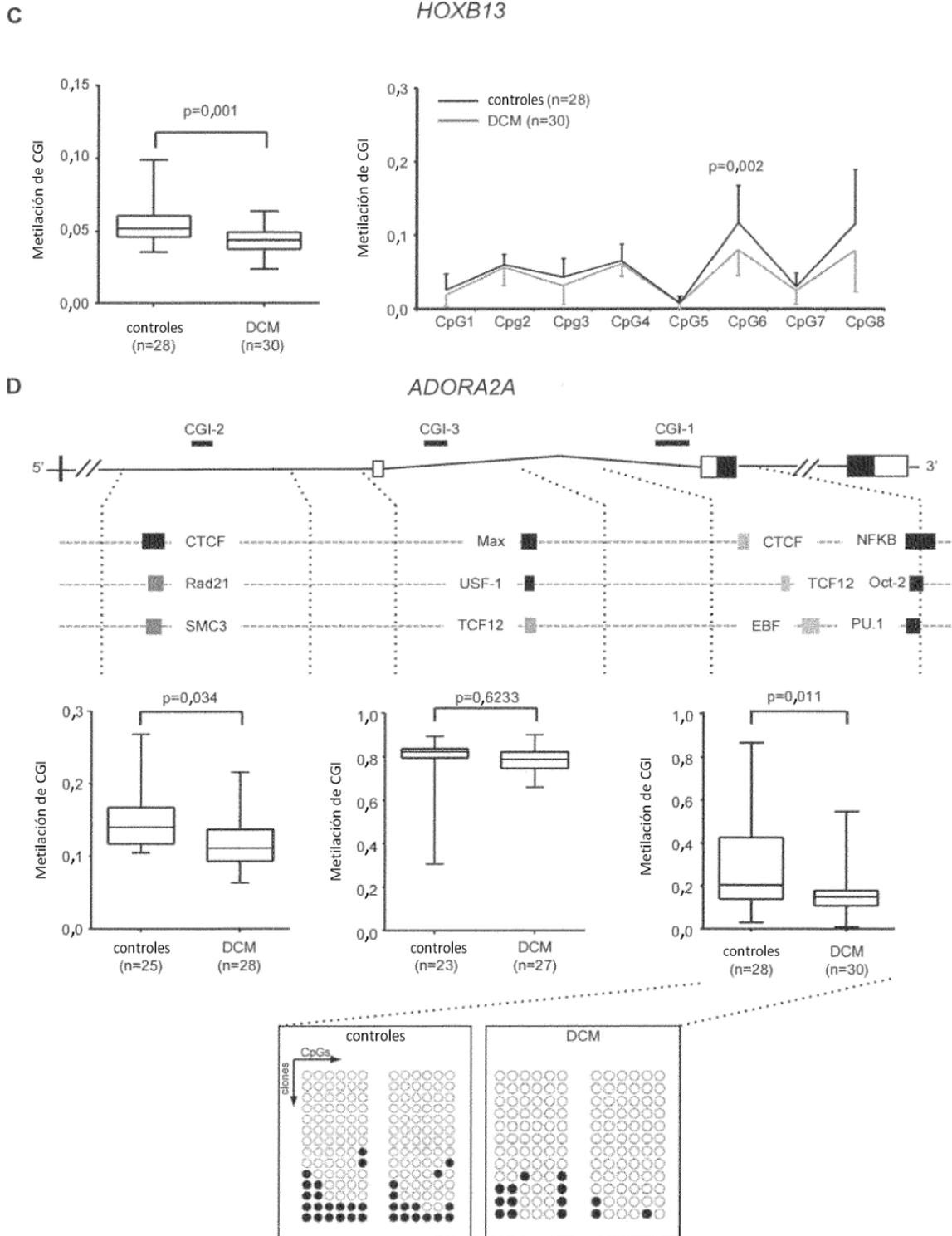


Figura 3 E

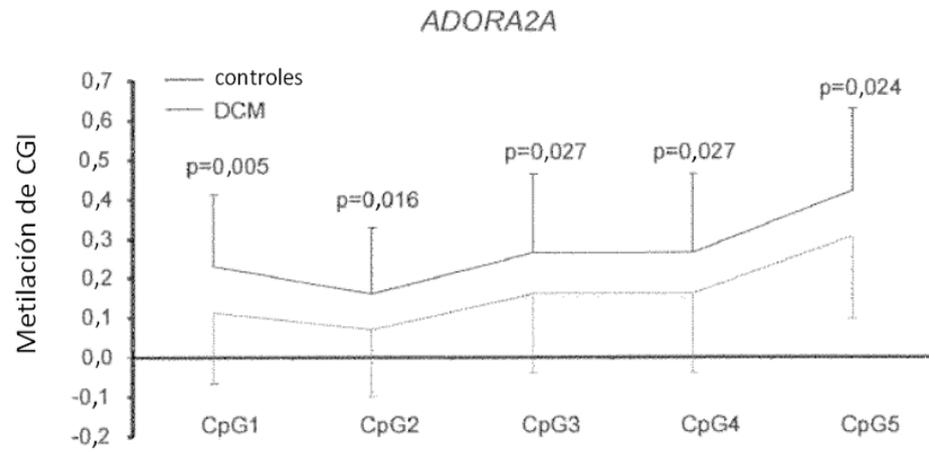


Figura 4 A-F

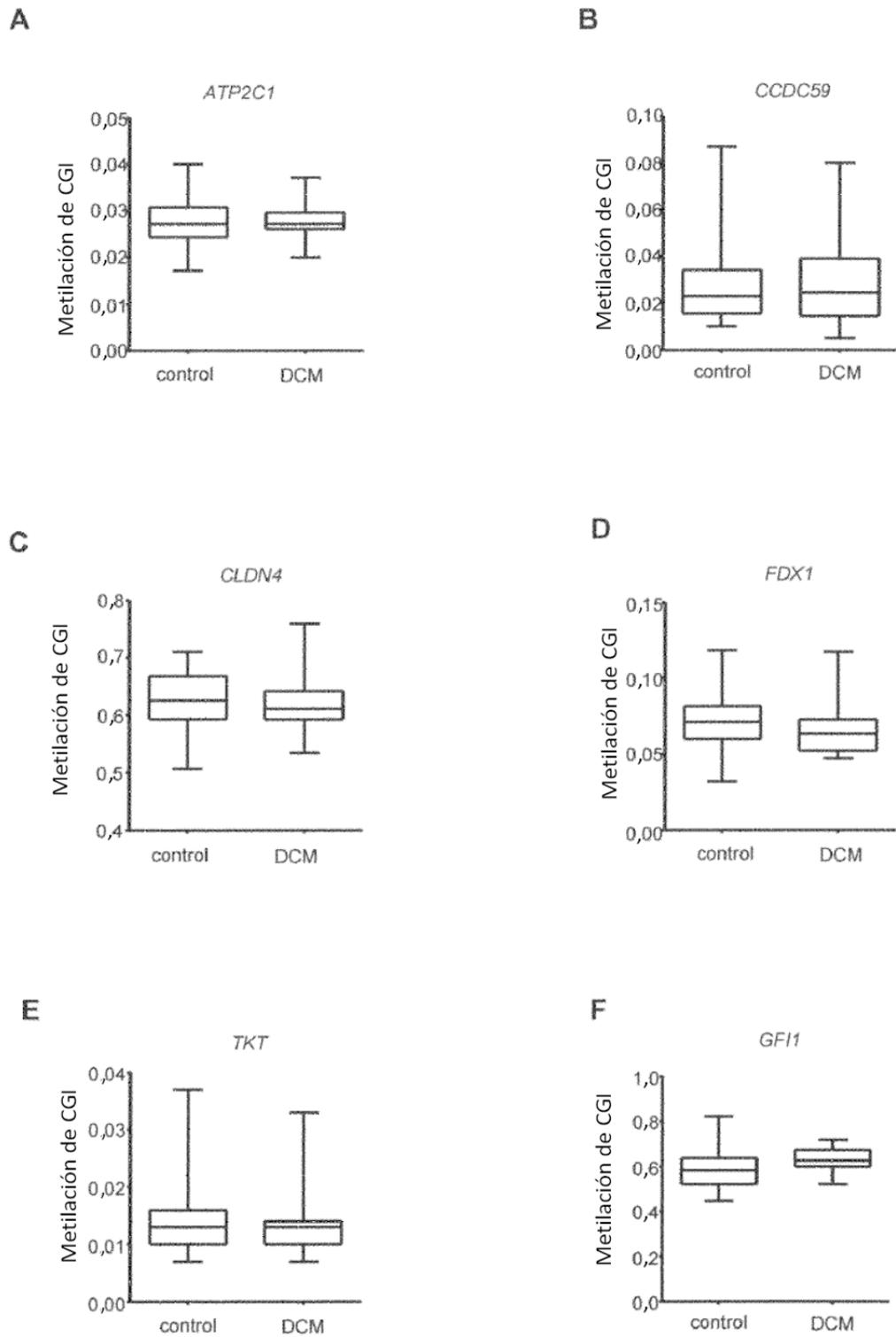
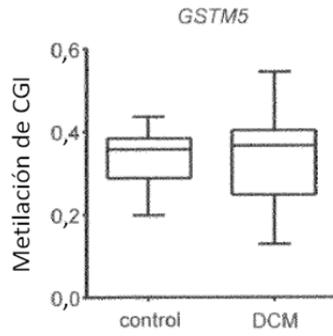
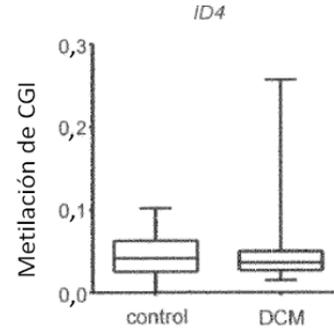


Figura 4 G-L

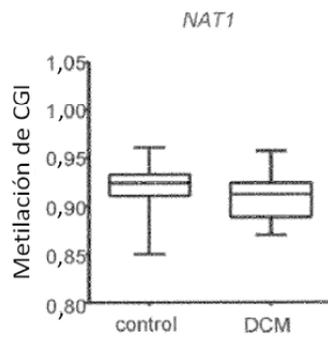
G



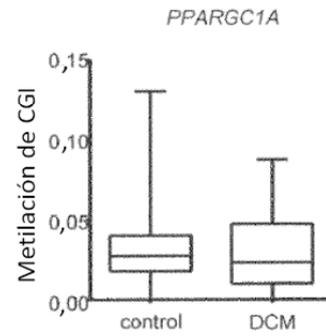
H



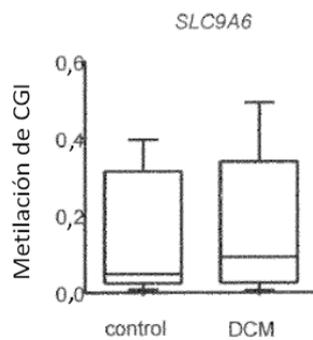
I



J



K



L

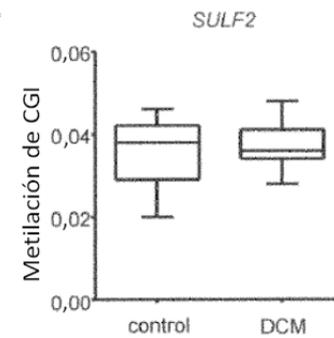
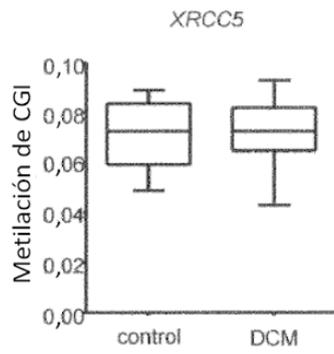
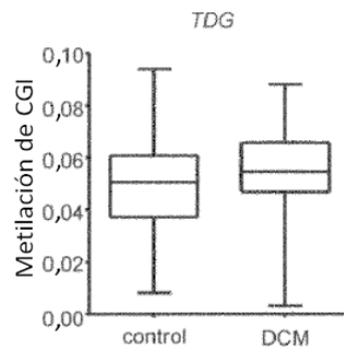


Figura 4 M-P

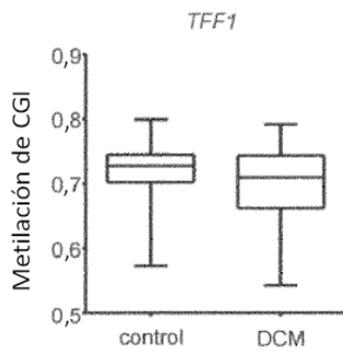
M



N



O



P

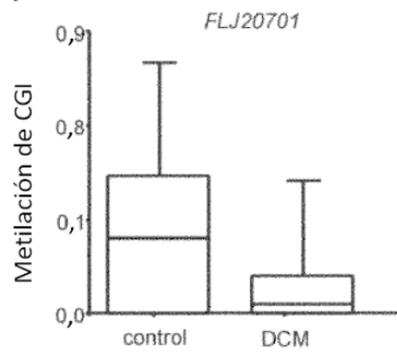


Figura 5

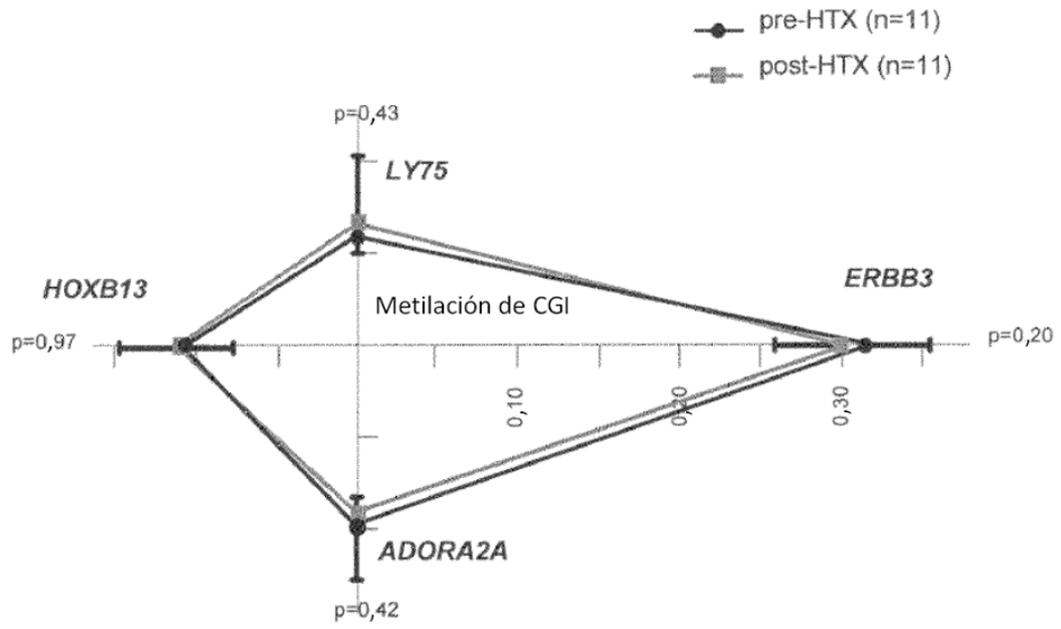
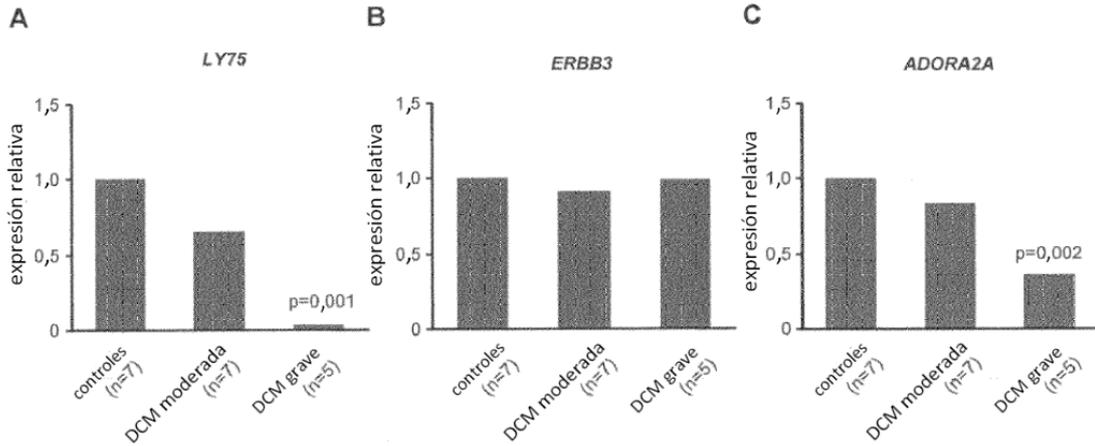


Figura 6



D

	LY75 [Δ CT]	ERBB3 [Δ CT]	ADORA2A [Δ CT]
controles (n=7)	8,51 \pm 0,66	9,88 \pm 0,80	8,65 \pm 0,26
DCM moderada (n=7)	9,11 \pm 0,40	10,02 \pm 0,63	8,90 \pm 0,53
DCM grave (n=5)	13,11 \pm 0,78	9,90 \pm 0,53	10,08 \pm 0,20

E

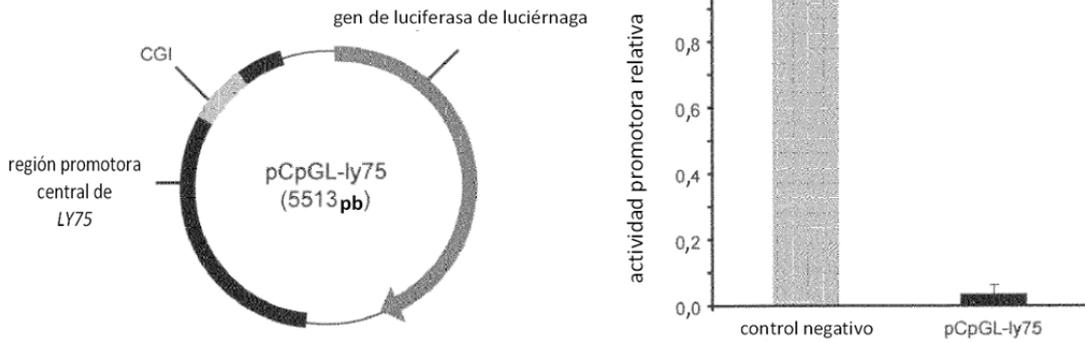
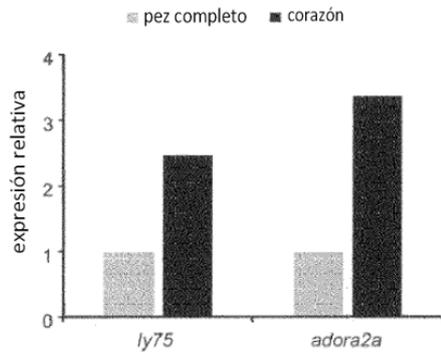
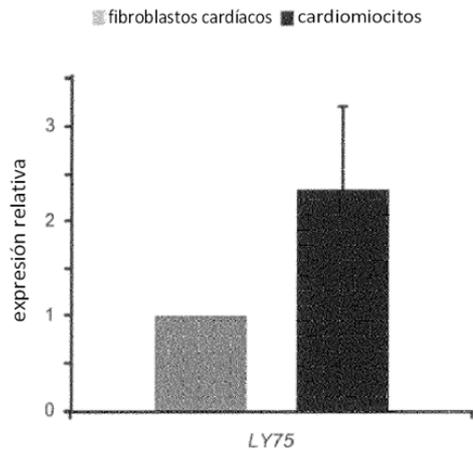


Figura 7

A



B



C

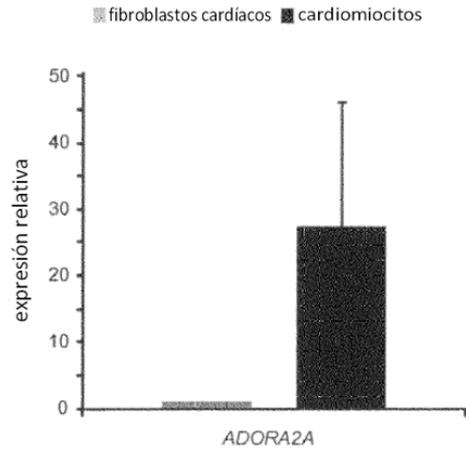


Figura 8

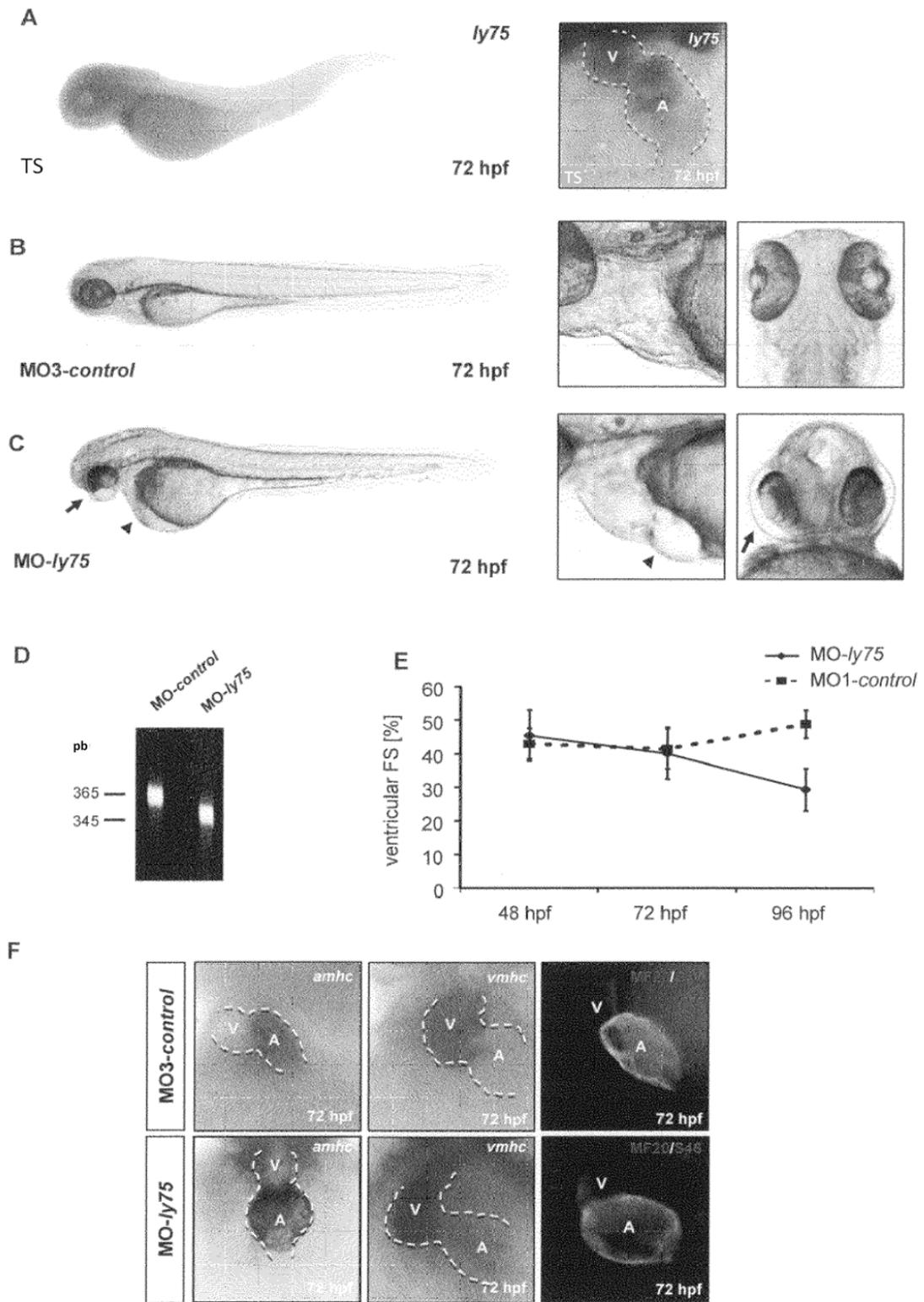


Figura 9 A

A

```

hadora2a 1  MPTMGSSVYIIVELAIIVLAILGNVLCWAVWLNNSLQNVTNFVVSLLAAADIAVGVLAIPFAITISTG
madora2a 1  ----MGSSVYIIVELAIIVLAILGNVLCWAVWLNNSLQNVTNFVVSLLAAADIAVGVLAIPFAITISTG
zadora2a 1  MPTNNVFDVYIIVLELLIATLISVILGNVLCWAVGLNSNLSITNFFVVSLLAVADIAGVLAIPFSAIVLSTG

hadora2a 70  FCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTF
madora2a 67  FCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTF
zadora2a 71  FCANFYGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIPIPLRYNSLVTGQRAIGIIAICWVLSVITGLTF

hadora2a 140  MLGWNNCGOPKEGKNHSQCGEGVAACLFEDVVPMMYVYFNFFACVLVPLLLMLQVYLRIFLAARROLK
madora2a 137  MLGWNNCSQKDE--NSKTCGEGRVTCLEFEDVVPMMYVYFNFFAVLPLLLMLATYLRIFLAARROLK
zadora2a 141  MLGWHKARLQEG---ENGTCPPEMMECLFEVVMVDYVYFNFFACVLVPLLLMLATYLRIFLAARHQLK

hadora2a 210  QMESQPLPGE--RIRSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPPLHIINCFTFFCPECSHAPLWMLYLAIIISH
madora2a 205  QMESQPLPGE--RIRSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPPLHIINCFTFFCSTCHAPPWMLYLAIIISH
zadora2a 208  QESKAPFCERKSRIRSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPPLHIINCFTFFCPECCERFPALWMLYLAIIISH

hadora2a 279  ANSVVNPFYIAYRIREFRQTFRKIIRFHVLRQCEPFKAGCTSARVLAHGSQGEQVSLRLNGHPFCVWAN
madora2a 274  ANSVVNPFYIAYRIREFRQTFRKIIRFHVLRQCEPFKAGSSAWALAAHSTQGEQVSLRLNGHPFCVWAN
zadora2a 278  ANSVVNPFYIAYRIREFRQTFRKIIRFHVLRQCEPFKAGREELSCNGSTR--TSTRISVASSLRKINGLVRELVAE

hadora2a 349  GSAPHP--ERRPNCYALCLVSCG-----SACESOCNTGLEDVELLSEHLKVCPEPPGLDDPLA
madora2a 344  GSAPHS--GRRPNCYTLGFGGCG-----STCGSPG----DVELLSEHQ-EGGCHGGLGDEPLA
zadora2a 346  QSSTTSCEESAEPCHTHRPVSTENSILDNQPIEINSHRHTALRHPSPPLTGSNEGLACRKHAGLDITDE

hadora2a 406  QDGAQVS-----
madora2a 395  QGRVCTASWSSEFAPS-----
zadora2a 416  KLLSSPLHIKSAIYVQTAHCVELTEVS
    
```

Figura 9 B-F

