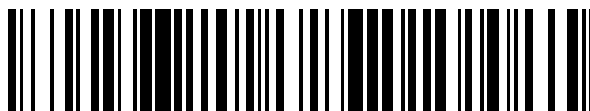


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 069**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012** **PCT/EP2012/058502**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012** **WO12152811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012** **E 12720167 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2707501**

54 Título: **Marcadores moleculares en cáncer de próstata**

30 Prioridad:

**12.05.2011 WO PCT/EP2011/057716**

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

**11.04.2018**

73 Titular/es:

**MDXHEALTH RESEARCH B.V. (100.0%)**  
**Transistorweg 5 Mailbox 5E**  
**6534 AT Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**SMIT, FRANCISCUS PETRUS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 663 069 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Marcadores moleculares en cáncer de próstata

La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico de cáncer de próstata (PrCa).

En la población masculina occidental, el cáncer de próstata se ha convertido en un problema importante de salud pública. En muchos países desarrollados no es sólo el cáncer más frecuentemente diagnosticado sino que también es la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en varones. Debido a que la incidencia del cáncer de próstata aumenta con la edad, el número de casos recién diagnosticados sigue aumentando a medida que aumenta la esperanza de vida de la población general. En los Estados Unidos, aproximadamente 218.000 hombres y en Europa aproximadamente 382.000 hombres son recién diagnosticados con cáncer de próstata cada año.

Estudios epidemiológicos demuestran que el cáncer de próstata es una enfermedad indolora y que mueren más hombres con cáncer de próstata que de él. Sin embargo, una fracción significativa de los tumores se comporta agresivamente y como resultado aproximadamente 32.000 hombres americanos y aproximadamente 89.000 hombres europeos mueren por esta enfermedad anualmente.

La alta tasa de mortalidad es consecuencia del hecho de que no existen opciones terapéuticas curativas para el cáncer de próstata metastásico. La ablación de andrógenos es el tratamiento de elección en hombres con metástasis. Inicialmente, el 70 a 80% de los pacientes con enfermedad avanzada muestran respuesta al tratamiento, pero con el tiempo la mayoría de los tumores se vuelven independientes de los andrógenos. Como resultado la mayoría de los pacientes desarrollará enfermedad progresiva.

Dado que no existen opciones terapéuticas eficaces para el cáncer de próstata avanzado, la detección precoz de este tumor es fundamental y puede aumentar la tasa de éxito curativo. Aunque el uso rutinario de pruebas del antígeno prostático específico (PSA) de suero sin duda ha aumentado la detección de cáncer de próstata, uno de sus principales inconvenientes ha sido la falta de especificidad. El PSA del suero es un marcador excelente para enfermedades de la próstata e incluso modestas elevaciones reflejan casi siempre una enfermedad o perturbación de la próstata como la hiperplasia prostática benigna (BPH) y la prostatitis. Desde la aparición de frecuentes pruebas de PSA hace más de 20 años, la especificidad del PSA para el cáncer ha disminuido debido a la selección de un gran número de hombres que tienen elevados de PSA debido a mecanismos no cancerosos. Esto da lugar a una tasa de biopsia muy negativa.

Por lo tanto, se necesitan urgentemente pruebas moleculares (no invasivas), que pueden identificar con precisión aquellos hombres que están en la fase inicial, el cáncer de próstata clínicamente localizado y que se beneficiarían de una supervivencia prolongada y de calidad de vida desde la intervención radical temprana. Los biomarcadores moleculares identificados en los tejidos pueden servir como blanco para nuevas pruebas moleculares basado en fluidos corporales.

Un biomarcador adecuado preferentemente cumple los siguientes criterios: 1) debe ser reproducible (intra- e inter-institucional) y 2) debe tener un impacto en la gestión clínica.

Además, con fines de diagnóstico, es importante que los biomarcadores se prueban en cuanto a la especificidad en los tejidos y la posible discriminación entre el cáncer de próstata, próstata normal y HPB. Además, cabe esperar que ensayos de biomarcadores (múltiples) mejoren la especificidad para la detección del cáncer.

Teniendo en cuenta lo anterior, hay una necesidad urgente de biomarcadores moleculares de pronósticos para predecir el comportamiento biológico del cáncer y resultados.

Para la identificación de nuevos marcadores experimentales para el cáncer de próstata, es necesario estudiar patrones de expresión en tejidos de próstata malignos como no malignos, preferiblemente en relación con otros datos médicos.

Desarrollos recientes en el campo de las técnicas moleculares han proporcionado nuevas herramientas que permitieron la evaluación tanto de alteraciones genómicas como de alteraciones proteómicas en estas muestras de una manera integral y rápida. Estas herramientas han llevado al descubrimiento de muchos nuevos biomarcadores prometedores para el cáncer de próstata. Estos biomarcadores pueden ser instrumentales en el desarrollo de nuevas pruebas que tienen una alta especificidad en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata.

Por ejemplo, la identificación de diferentes anomalías cromosómicas como cambios en el número de cromosomas, translocaciones, supresiones, reconfiguraciones y duplicaciones en las células puede estudiarse usando análisis de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La hibridación genómica comparativa (CGH) es capaz de identificar todo el genoma para grandes cambios en el número de copias de la secuencia de ADN o supresiones más de 10 millones de pares de bases. Análisis de expresión diferencial, análisis en serie de expresión génica (SAGE), chips de oligonucleótidos y chips de ADNc caracterizan perfiles de expresión génica. Estas técnicas se utilizan a menudo combinado con chips de tejido (TMA) para la identificación de genes que desempeñan una función importante en

procesos biológicos específicos.

Dado que las alteraciones genéticas a menudo conducen a proteínas mutadas o alteradas, las vías de señalización de una célula pueden ser afectadas. Eventualmente, esto puede llevar a una ventaja del crecimiento o la supervivencia de una célula de cáncer. La proteómica estudia la identificación de proteínas alteradas en cuanto a estructura, cantidad y modificaciones tras la traducción. Proteínas relacionadas con la enfermedad pueden secuenciarse directamente e identificarse en secciones de tejido completo intacto usando desorción-ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un espectrómetro de masas en tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Además, Desorción-ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un espectrómetro de masas (MS) en tiempo de vuelo (SELDI)-TOF puede proporcionar un perfil rápido de expresión proteica de células de tejidos y fluidos corporales como el suero o la orina.

En los últimos años, estas herramientas moleculares han llevado a la identificación de cientos de genes que se cree que son relevantes en el desarrollo de cáncer de próstata. No sólo estos resultados han llevado a una percepción en la iniciación y evolución del cáncer de próstata, sino que también han demostrado que el cáncer de próstata es una enfermedad heterogénea.

Algunos tumores de próstata pueden ocurrir en la próstata de un solo paciente debido a la naturaleza multifocal de la enfermedad. Cada uno de estos tumores puede mostrar diferencias notables en la expresión génica y el comportamiento que se asocian con diferentes pronósticos. Por lo tanto, para predecir el resultado de la enfermedad es más probable que un conjunto de diferentes marcadores sea clínicamente importante.

Los biomarcadores pueden clasificarse en cuatro casos específicos de cáncer de próstata diferentes: alteraciones genómicas, procesos biológicos específicos de cáncer de próstata, modificaciones epigenéticas y genes expresados únicamente en cáncer de próstata.

Uno de los factores de riesgo epidemiológico más fuertes para el cáncer de próstata es una historia familiar positiva. Un estudio de 44.788 pares de gemelos en Dinamarca, Suecia y Finlandia ha demostrado que el 42% de los casos de cáncer de próstata fueron atribuibles a la herencia. Consecuentemente se ha observado mayor riesgo de la enfermedad en hermanos de pacientes afectados en comparación con los hijos de los mismos pacientes. Esto ha llevado a la hipótesis de que hay un componente genético ligado a X o recesivo en el riesgo de cáncer de próstata.

Exploraciones en el genoma completo en familias afectadas implicadas al menos en siete locus con sensibilidad al cáncer de próstata, HPC1 (1q24), CAPB (1 p 36), PCAP (1q42), ELAC2 (17p11), HPC20 (20q13), 8 p22-23 y HPCX (Xq27-28). Recientemente, se han asignado a estos locus tres genes experimentales de cáncer de próstata hereditario, ribonucleasa L dependiente de HPC1/2'-5'-oligoadenilato (RNASEL) en el cromosoma 1q24-25, gen del fagocitador 1 de macrófagos (MSR1) situado en el cromosoma 8p22-23 y HPC2/ELAC2 en el cromosoma 17p11.

Se ha estimado que genes con sensibilidad al cáncer de próstata probablemente representan sólo el 10% de los casos de cáncer de próstata hereditario. Los cánceres de próstata familiares son los más probablemente relacionados con los factores ambientales compartidos o con variantes genéticas o polimorfismos más comunes. Dado que dichas variantes pueden ocurrir con mucha frecuencia en la población afectada, su impacto sobre el riesgo de cáncer de próstata puede ser sustancial.

Recientemente, se han estudiado polimorfismos en los genes que codifican el receptor del andrógeno (AR), 5 $\alpha$ -reductasa tipo II (SRD5A2), CYP17, CYP3A, receptor de vitamina D (VDR), PSA, GST-T1, GST-M1, GST-P1, factor de crecimiento insulínico (IGF-I) y proteína de unión a IGF 3 (IGFBP3).

Estos estudios fueron realizados para comprobar si estos genes pueden predecir la presencia de cáncer de próstata en los pacientes indicados para las biopsias de próstata debido a concentraciones de PSA > 3 ng/ml. No se encontraron asociaciones entre genotipos de AR, SRD5A2, CYP17, CYP3A4, VDR, GST-M1, GST-P1 e IGFBP3 y riesgo de cáncer de próstata. Sólo los polimorfismos GST-T1 y IGF-I se encontraron que estaban moderadamente relacionados con el riesgo de cáncer de próstata.

A diferencia del gen de poliposis adenomatosa coli (APC) en cáncer de colon familiar, ninguno de los genes y locus con sensibilidad al cáncer de próstata mencionados es por sí mismo responsable de la mayor parte de los cánceres de próstata.

Estudios epidemiológicos apoyan la idea de que más cánceres de próstata pueden ser atribuidos a factores como la raza, la forma de vida y la alimentación. El papel de las mutaciones génicas en conocidos oncogenes y genes supresores de tumores es probablemente muy pequeño en el cáncer primario de próstata. Por ejemplo, la frecuencia de las mutaciones de p53 en el cáncer de próstata primario está publicado que es baja, pero se han observado en casi el 50% de los cánceres de próstata avanzados.

La detección en hombres de la presencia de mutaciones o polimorfismos en el gen específico del cáncer es lenta y costosa. Por otra parte, es muy poco eficaz en la detección de cánceres primarios de próstata en la población masculina general. Por lo tanto, no puede aplicarse como una prueba para la detección el cáncer de próstata.

El ADN mitocondrial está presente en aproximadamente 1.000 a 10.000 copias por célula. Debido a estas cantidades, mutaciones de ADN mitocondrial se han utilizado como blanco para el análisis de ADN del plasma y suero de pacientes con cáncer de próstata. Recientemente, se detectaron mutaciones de ADN mitocondrial en tres de cada tres pacientes con cáncer de próstata tenían las mismas mutaciones de ADN mitocondrial en su tumor primario. Diferentes muestras de tumor urológico deben estudiarse y mayores grupos de pacientes son necesarios para definir la sensibilidad general del diagnóstico de este método.

Las alteraciones críticas en la expresión génica pueden conducir a la evolución del cáncer de próstata. Alteraciones de microsatélites, que son secuencias de ADN repetitivas polimórficas, aparecen a menudo como pérdida de heterocigosidad (PDH) o como inestabilidad de microsatélites. En el cáncer de próstata se conocen alteraciones definidas de microsatélites. Hasta ahora, la utilidad clínica es insignificante. Los chips del genoma completo y de SNP se consideran herramientas poderosas de descubrimiento.

Las alteraciones en el ADN, sin cambiar el orden de las bases en la secuencia, conducen a menudo a cambios en la expresión génica. Estas modificaciones epigenéticas incluyen cambios tales como metilación del ADN y la acetilación/desacetilación de histonas. Muchos activadores de genes contienen regiones ricas en GC también conocidas como islas de CpG. La metilación anormal de islas de CpG da como resultado la transcripción disminuida del gen en el ARNm.

Recientemente, se ha sugerido que el estado de metilación de ADN puede ser influenciado en primeros años de vida por exposiciones ambientales, tales como factores nutricionales o el estrés, y que esto lleva a un mayor riesgo de cáncer en adultos. Se han observado cambios en los patrones de metilación del ADN en muchos tumores humanos. Para la detección de la hipermetilación del activador se utiliza una técnica llamada PCR específica de metilación (MSP). En contraste con los análisis de microsatélites o PDH, esta técnica requiere una relación de tumor a normal de sólo 0,1-0,001%. Esto significa que utilizando esta técnica, pueden detectarse alelos hipermetilados en el ADN del tumor en presencia de  $10^4$  -  $10^5$  cantidades en exceso de alelos normales.

Por lo tanto, la metilación del ADN puede servir como un marcador útil en la detección del cáncer. Recientemente, ha habido muchos informes sobre los genes hipermetilados en cáncer de próstata humano. Dos de estos genes son RASSF1A y GSTP1.

La hipermetilación de RASSF1A (isoforma A de la proteína de la familia con dominio de asociación ras) es un fenómeno común en el cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón y cáncer de próstata. El crecimiento de las células cancerosas humanas puede reducirse cuando se expresa nuevamente RASSF1A. Esto apoya el papel de RASSF1A como gen supresor del tumor. Inicialmente no se detectó hipermetilación de RASSF1A en el tejido prostático normal. Recientemente, la metilación del gen RASSF1A se observó en neoplasias intraepiteliales prostáticas pre-malignas y en epitelios prostáticos benignos. La hipermetilación de RASSF1A se ha observado en el 60-74% de los tumores de próstata y en el 18,5% de las muestras de HPB. Además, la frecuencia de metilación está claramente relacionada con la alta puntuación de Gleason y la fase. Estos resultados sugieren que la hipermetilación de RASSF1A puede distinguir los tumores más agresivos de los indolores.

La alteración epigenética más descrita en el cáncer de próstata es la hipermetilación del activador de la Glutación S-transferasa P1 (GSTP1). GSTP1 pertenece al sistema de protección celular contra los efectos tóxicos y como tal esta enzima está implicada en la desintoxicación de muchos xenobióticos.

La hipermetilación de GSTP1 se ha descrito en aproximadamente el 6% de las lesiones de atrofia proliferativa inflamatoria (PIA) y en el 70% de las lesiones PIN. Se ha demostrado que algunas lesiones de PIA se combinan directamente con PIN y las lesiones de carcinoma precoz, aunque son necesarios estudios adicionales para confirmar estos resultados. Se ha detectado hipermetilación de GSTP1 en más del 90% de los tumores de próstata, mientras que no se ha observado hipermetilación en la HBP y los tejidos de próstata normales.

La hipermetilación del gen GSTP1 se ha detectado en el 50% de los eyaculados de pacientes de cáncer de próstata pero no en hombres con HBP. Debido al hecho de que los eyaculados no son siempre fácilmente obtenidos de pacientes de cáncer de próstata, la hipermetilación del GSTP1 se determinó en los sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con cáncer de próstata después de masaje prostático. El cáncer podría detectarse en el 77% de estos sedimentos.

Por otra parte, la hipermetilación del GSTP1 se ha encontrado en los sedimentos urinarios después de masaje prostático en 68% de los pacientes con enfermedad precoz confinada, el 78% de los pacientes con enfermedad localmente avanzada, el 29% de los pacientes con PIN y 2% de los pacientes con HBP. Estos resultados dieron lugar a una sensibilidad del 73% y una especificidad del 98%. El valor predictivo negativo de esta prueba fue del 80%, lo que demuestra que este análisis tiene gran potencial para reducir el número de biopsias innecesarias.

Recientemente, se confirmaron estos resultados y se observó una mayor frecuencia de metilación de GSTP1 en la orina de hombres con enfermedad en fase 3 frente a en fase 2.

Debido a que la hipermetilación de GSTP1 tiene una gran especificidad para el cáncer de próstata, la presencia de hipermetilación de GSTP1 en sedimentos urinarios de pacientes con biopsias negativas (33%) y pacientes con

atípias o PIN de alto grado (67%) sugiere que estos los pacientes pueden tener cáncer de próstata oculto.

Recientemente, se probó un ensayo multiplexado que consta de 3 marcadores de metilación, *GSTP1*, *RARB*, *APC* y una referencia endógena en muestras de orina de pacientes con concentraciones séricas de PSA  $\geq 2,5$   $\mu\text{g/l}$ . Se observó una buena correlación de *GSTP1* con el número de núcleos positivos a cáncer de próstata en la biopsia. Además, las muestras que contenían metilación para *GSTP1* o *RARB* se correlacionaron con volúmenes tumorales mayores. Los genes metilados tienen potencial para proporcionar una nueva generación de biomarcadores del cáncer.

Los estudios con microchips han sido muy útiles e informativos para identificar genes que están constantemente regulados por incremento o regulados por disminución en el cáncer de próstata en comparación con el tejido prostático benigno. Estos genes pueden proporcionar biomarcadores específicos para el cáncer de próstata y dar más información en la etiología de la enfermedad.

Para el diagnóstico molecular del cáncer de próstata, los genes que están muy regulados por incremento en el cáncer de próstata en comparación con la expresión baja o normal en el tejido prostático normal son de especial interés. Dichos genes podrían permitir la detección de una célula tumoral en un enorme fondo de células normales, y por lo tanto podrían aplicarse como marcadores de diagnóstico en la detección del cáncer de próstata.

El análisis diferencial de expresión génica se ha utilizado con éxito para identificar biomarcadores específicos de cáncer de próstata al comparar tejidos de próstata malignos con no malignos. Recientemente, se utilizó un nuevo método bioestadístico llamado análisis de perfil atípico del cáncer (COPA) para identificar genes que se expresan diferencialmente en un subconjunto de cánceres de próstata. COPA identificó potentes perfiles atípicos para el oncogén E26 del virus de la eritroblastosis v-ets (*ERG*) y gen 1 variante ets (*ETV1*) en el 57% de los casos de cáncer de próstata. Esto estaba en concordancia con los resultados de un estudio donde la sobreexpresión de *ERG* asociada al cáncer de próstata se encontró en el 72% de los casos de cáncer de próstata. En más del 90% de los casos que sobreexpresaron *ERG* o *ETV1* se encontró una fusión de la región 5' no traducida del gen de serina proteasa transmembrana específico de la próstata y regulado por andrógenos (*TMPRSS2*) con estos miembros de la familia ETS. Recientemente, se ha descrito otra fusión entre *TMPRSS2* y un miembro de la familia ETS, la fusión *TMPRSS2-ETV4*, aunque esta fusión se encuentra esporádicamente en cánceres de próstata.

Además, se encontró una fusión de *TMPRSS2* con *ETV5*. Se demostró que la sobreexpresión de *ETV5* *in vitro* induce un programa de transcripción invasivo. Estas fusiones pueden explicar la aberrante sobreexpresión dependiente de andrógenos de los miembros de la familia ETS en subconjuntos de cáncer de próstata porque *TMPRSS2* está regulado por andrógenos. El descubrimiento de la fusión del gen *TMPRSS2-ERG* y el hecho de que *ERG* es el proto-oncogén sobreexpresado más frecuentemente descrito en las células epiteliales prostáticas malignas sugiere su papel en la tumorigénesis de próstata. Se han descrito fusiones de la región 5' no traducida del gen *TMPRSS2* con los factores de transcripción de ETS *ERG*, *ETV1* y *ETV4* en el cáncer de próstata.

Recientemente, se demostró que la detección no invasiva de transcritos de fusión *TMPRSS2-ERG* es factible en sedimentos urinarios obtenidos después del ERD usando un ensayo de investigación basado en RT-PCR. Debido a la alta especificidad de la prueba (93%), la combinación de transcritos de fusión *TMPRSS2-ERG* con el gen 3 del cáncer de próstata (*PCA3*) mejoró la sensibilidad del 62% (*PCA3* solo) al 73% (combinado) sin afectar la especificidad para detectar el cáncer de próstata.

Se ha encontrado que el gen que codifica la  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR) en el cromosoma 5p13 está constantemente regulado por incremento en el cáncer de próstata. Esta enzima desempeña una función crítica en la oxidación peroxisomal beta de moléculas de ácidos grasos con cadena ramificada obtenidas a partir de productos lácteos y carne de vacuno. Curiosamente, el consumo de lácteos y carne de vacuno se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer de próstata.

En el tejido de cáncer de próstata clínico, se ha encontrado una sobreexpresión de 9 veces del AMACR ARNm en comparación con el tejido de próstata normal. Estudios inmunohistoquímicos (IHC) y análisis de transferencia Western han confirmado la regulación por incremento de AMACR en las proteínas. Además, se ha demostrado que el 88% de los casos de cáncer de próstata y tanto las metástasis no tratadas como los cánceres de próstata resistentes a hormonas fueron muy positivos a AMACR. La expresión de AMACR no se ha detectado en glándulas atroficas, hiperplasia de células basales y epitelio urotelial o metaplasia. Los estudios de IHC también demostraron que la expresión de AMACR en biopsias con aguja tenía una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100% para la detección de cáncer de próstata.

Combinado con una tinción para p63, un marcador de células basales que no está en el cáncer de próstata, AMACR facilitó en gran medida la identificación de células de próstata malignas. Su alta expresión y la especificidad de las células cancerígenas implican que AMACR también puede ser un candidato para el desarrollo de sondas moleculares que pueden facilitar la identificación del cáncer de próstata utilizando modalidades de diagnóstico por la imagen no invasivas.

Se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un ensayo basado en fluidos corporales para AMACR. Un pequeño estudio indicó que un análisis de PCR en tiempo real cuantitativo basado en AMACR en muestras de orina

obtenidas después del masaje prostático tiene el potencial de excluir a los pacientes con enfermedad clínicamente insignificante cuando la expresión del *AMACR* ARNm se normaliza para el PSA. El análisis de transferencia Western en muestras de orina obtenidas después del masaje prostático tuvo una sensibilidad del 100%, una especificidad del 58%, un valor predictivo positivo (VPP) del 72% y un valor predictivo negativo (VPN) del 88% para el cáncer de próstata. Estos ensayos que usan *AMACR* ARNm para la detección de cáncer de próstata en muestras de orina son prometedores.

Usando análisis de chip de ADNc, se ha demostrado que la hepsina, una serina proteasa transmembrana de tipo II, es uno de los genes sobreexpresados de manera más diferenciada en el cáncer de próstata en comparación con el tejido de próstata normal y el tejido de BPH. Usando un análisis de PCR cuantitativo en tiempo real, se ha demostrado que la hepsina está sobreexpresada en el 90% de los tejidos de cáncer de próstata. En el 59% de los cánceres de próstata, esta sobreexpresión fue de 10 veces mayor.

También ha habido una correlación significativa entre la regulación por incremento de hepsina y el grado tumoral. Se necesitarán más estudios para determinar la especificidad histórica de la hepsina y el valor diagnóstico de esta serina proteasa como nuevo marcador sérico. Dado que la hepsina está regulada por incremento en tumores avanzados y más agresivos, sugiere un papel como marcador de tejido pronóstico para determinar la agresividad de un tumor.

La telomerasa, una ribonucleoproteína, participa en la síntesis y reparación de los telómeros que cubren y protegen los extremos de los cromosomas eucarióticos. Los telómeros humanos consisten en repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG así como varias proteínas de unión diferentes. Durante la división celular, los telómeros no se pueden replicar por completo y serán más cortos. La telomerasa puede alargar los telómeros y así evitar el acortamiento de estas estructuras. La división celular en ausencia de actividad de telomerasa conducirá al acortamiento de los telómeros. Como resultado, la vida útil de las células se vuelve limitada y esto conducirá al envejecimiento y la muerte celular.

En las células tumorales, incluidas las células de cáncer de próstata, los telómeros son significativamente más cortos que en las células normales. En las células cancerosas con telómeros cortos, se requiere la actividad de la telomerasa para escapar del envejecimiento y permitir el crecimiento inmortal. Se ha encontrado una alta actividad de la telomerasa en el 90% de los cánceres de próstata y se ha demostrado que está ausente en el tejido prostático normal.

En un pequeño estudio sobre 36 muestras de telomerasa la actividad se ha utilizado para detectar células de cáncer de próstata en orina evacuada o lavado uretral después de un masaje prostático. Esta prueba tenía una sensibilidad del 58% y una especificidad del 100%. El valor predictivo negativo de la prueba fue del 55%.

Aunque ha sido un estudio pequeño y preliminar, el bajo valor predictivo negativo indica que la actividad de la telomerasa medida en muestras de orina no es muy prometedora para reducir el número de biopsias innecesarias.

La cuantificación de la subunidad catalítica de la telomerasa, hTERT, mostró una sobreexpresión media de hTERT ARNm de 6 veces en los tejidos de cáncer de próstata en comparación con los tejidos de próstata normales. Se encontró una relación significativa entre la expresión de hTERT y la fase tumoral, pero no con puntuación de Gleason. La cuantificación de hTERT usando PCR en tiempo real demostró que hTERT podría distinguir los tejidos de cáncer de próstata de los tejidos de próstata no malignos. Sin embargo, hTERT ARNm se expresa en leucocitos, que están regularmente presentes en los fluidos corporales, como la sangre y la orina. Esto puede producir falsos positivos. Como tal, la medición cuantitativa de hTERT en fluidos corporales no es muy prometedora como herramienta de diagnóstico para el cáncer de próstata.

El antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) es una glucoproteína transmembrana que se expresa en la superficie de las células epiteliales de próstata. La expresión de PSMA parece estar restringida a la próstata. Se ha demostrado que el PSMA aumenta en el tejido del cáncer de próstata en comparación con los tejidos de próstata benignos. No se ha encontrado una superposición en la expresión de PSMA entre BPH y el cáncer de próstata, lo que indica que PSMA es un marcador de diagnóstico muy prometedor.

Recientemente, se ha demostrado que la expresión alta de PSMA en los casos de cáncer de próstata se correlaciona con el grado tumoral, la fase patológica, la aneuploidía y la recaída bioquímica. Además, la expresión incrementada de *PSMA* ARNm en cánceres de próstata primarios y metástasis se correlacionaba con la sobreexpresión de la proteína PSMA. Su utilidad clínica como marcador de diagnóstico o pronóstico para el cáncer de próstata se ha visto obstaculizada por la falta de un inmunoanálisis sensible para esta proteína. Sin embargo, una combinación de chips ProteinChip® (CIPHERGEN Biosystems) y SELDI-TOF MS ha llevado a la introducción de un inmunoanálisis de biochips de proteínas para el análisis cuantitativo de PSMA en suero. Se demostró que los niveles séricos promedio de PSMA en pacientes con cáncer de próstata era significativamente mayor en comparación con los de hombres con BPH y referencias sanas. Estos hallazgos implican un papel para la PSMA sérica para distinguir a los hombres con BPH de los pacientes con cáncer de próstata. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar su valor diagnóstico.

Una combinación de chips ProteinChip® y SELDI-TOF MS ha llevado a la introducción de un inmunoanálisis con biochip de proteínas para la cuantificación de PSMA en el suero. Se demostró que las concentraciones promedio de

PSMA en el suero para pacientes con cáncer de próstata eran significativamente más altas en comparación con las de los hombres con BPH y referencias sanas. Estos resultados implican un papel para la PSMA sérica para distinguir a los hombres con BPH de los pacientes con cáncer de próstata. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar su valor diagnóstico.

- 5 Los estudios de RT-PCR han demostrado que PSMA en combinación con su variante de empalme PSM' podría usarse como un marcador de pronóstico para el cáncer de próstata. En la próstata normal, la expresión de PSM' es mayor que la expresión de PSMA. En los tejidos de cáncer de próstata, la expresión de PSMA es más dominante. Por lo tanto, la relación de PSMA a PSM' es muy indicativa de la evolución de la enfermedad. Diseñar un análisis cuantitativo de PCR que discrimine entre las dos formas de PSMA podría generar otra aplicación para PSMA en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata.

Debido a su expresión específica en las células epiteliales de próstata y su aumento en el cáncer de próstata, PSMA se ha convertido en el objetivo de los tratamientos. Las estrategias propuestas van desde toxinas específicas y radionúclidos a agentes inmunoterapéuticos. Productos de primera generación han entrado en pruebas clínicas.

- 15 Delta-catenina (p120/CAS), una proteína asociada a la unión adhesiva, ha demostrado ser muy discriminativa entre BPH y el cáncer de próstata. Los estudios de hibridación *in situ* mostraron la expresión más alta de transcritos de  $\delta$ -catenina en el adenocarcinoma de próstata y una expresión baja o nula en el tejido de BPH. La sobreexpresión media de  $\delta$ -catenina en el cáncer de próstata en comparación con BPH es 15,7 veces.

Tanto la PCR cuantitativa como el análisis de hibridación *in situ* no pudieron encontrar una correlación entre la expresión de  $\delta$ -catenina y las puntuaciones de Gleason.

- 20 El aumento de la expresión de  $\delta$ -catenina en el cáncer de próstata humano da como resultado alteraciones del ciclo celular y genes de supervivencia, favoreciendo así la progresión tumoral. Se detectó  $\delta$ -catenina en prostasomas de orina humanos evacuados sin células. La inmunorreactividad de  $\delta$ -catenina aumentó significativamente en la orina de pacientes con cáncer de próstata. Se necesitan más estudios para evaluar su utilidad potencial en el diagnóstico del cáncer de próstata.

- 25 PCA3, anteriormente conocido como DD3, ha sido identificado usando análisis de expresión diferencial. Se encontró que PCA3 estaba muy sobreexpresada en tumores de próstata en comparación con el tejido de próstata normal del mismo paciente usando análisis de transferencia Northern. Además, se encontró que PCA3 se sobreexpresaba fuertemente en más del 95% de las muestras de cáncer de próstata primario y en la metástasis del cáncer de próstata. Además, la expresión de PCA3 está restringida al tejido prostático, es decir, no se ha encontrado expresión en otros tejidos humanos normales.

- 30 El gen que codifica PCA3 se encuentra en el cromosoma 9q21.2. El PCA3 ARNm contiene una alta densidad de codones de terminación. Por lo tanto, falta un marco de lectura abierto que lo que da como resultado un ARN no codificante. Recientemente, se ha desarrollado un análisis cuantitativo RT-PCR resuelto en el tiempo (que utiliza un patrón interno y una curva de calibración externa). El poder de cuantificación preciso de este análisis mostró un aumento medio de 66 veces de PCA3 en el tejido de cáncer de próstata en comparación con el tejido de próstata normal. Por otra parte, se encontró un aumento medio de 11 veces en los tejidos de próstata que contienen menos del 10% de las células de cáncer de próstata. Esto indicó que PCA3 era capaz de detectar un pequeño número de células tumorales en un gran fondo de células normales.

- 40 Esta hipótesis ha sido probada usando el análisis cuantitativo RT-PCR en muestras de orina evacuadas. Estas muestras de orina se obtuvieron después del examen rectal digital (ERD) de un grupo de 108 hombres a quienes se les había indicado biopsias de próstata en base a un valor de PSA sérico total de más de 3 ng/ml. Esta prueba tenía 67% de sensibilidad y 83% de especificidad usando biopsias prostáticas como patrón oro de la presencia de un tumor. Además, esta prueba tenía un valor predictivo negativo del 90%, lo que indica que la determinación cuantitativa de transcritos de PCA3 en sedimentos urinarios obtenidos después de un extenso masaje de próstata tiene un gran potencial en la reducción del número de biopsias invasivas guiadas por TRUS en esta población de hombres.

- 45 La especificidad histórica y la alta sobreexpresión en tumores de próstata indican que PCA3 es el gen más específico para el cáncer de próstata descrito hasta ahora. Gen-probe Inc. tiene la licencia mundial exclusiva para la tecnología PCA3. Los estudios multicéntricos que usan el análisis de PCA3 validado pueden proporcionar la primera base para el diagnóstico molecular en la práctica urológica clínica.

- 50 La expresión modulada de las proteínas HSP-27 citoplasmáticas y los miembros de la familia de la isoenzima PKC se han correlacionado con la evolución del cáncer de próstata.

- 55 La modulación de la expresión ha identificado claramente aquellos cánceres que son agresivos y, por lo tanto, aquellos que pueden requerir tratamiento urgente, independientemente de su morfología. Aunque no se emplean ampliamente, los anticuerpos contra estas proteínas están autenticados, están disponibles en el mercado y son sencillos en su aplicación e interpretación, especialmente junto con otros reactivos como preparados doblemente teñidos.

La importancia de este grupo de marcadores es que distinguen con precisión los cánceres de próstata de fenotipo agresivo. Modulados en su expresión por cánceres invasivos, en comparación con los tejidos prostáticos no neoplásicos, los tumores malignos que expresan HSP27 o PKC $\beta$  a alto nivel presentan invariablemente un resultado clínico pobre. El mecanismo de esta asociación garantiza dilucidación y validación.

- 5 Los factores de transcripción E2F, incluido el E2F3 situado en el cromosoma 6p22, modulan directamente la expresión de EZH2. La sobreexpresión del gen EZH2 ha sido importante en el desarrollo del cáncer de próstata humano.

Varambally y colegas identificaron EZH2 como un gen sobreexpresado en cáncer de próstata metastásico resistente a hormonas y demostraron que los pacientes con cánceres de próstata clínicamente localizados que expresan EZH2 tienen una evolución peor que los que no expresan la proteína.

- 10

Usando chips de tejido, la expresión de altos niveles de E2F3 nuclear ocurre en una gran proporción de cánceres de próstata humanos, pero es un caso raro en el epitelio prostático no neoplásico. Estos datos, junto con otra información publicada, sugirieron que el eje de referencia pRB-E2F3-EZH2 puede tener un papel crucial en la modulación de la agresividad de los cánceres de próstata humanos individuales.

- 15 El principal desafío para diagnósticos moleculares es la identificación del cáncer de próstata clínicamente insignificante, es decir, separar los cánceres biológicamente agresivos de los tumores indoloros. Además, los marcadores que predicen y controlan la respuesta al tratamiento se necesitan urgentemente.

En los establecimientos clínicos actuales el sobrediagnóstico y el sobretratamiento se vuelve cada vez más manifiestos, lo que subraya la necesidad de biomarcadores que pueden ayudar en la identificación precisa de los

- 20 pacientes que no necesitan tratamiento y que lo necesitan.

El uso de la inmunohistoquímica de AMACR se usa ahora en la identificación de procesos malignos en la próstata, lo que ayuda al diagnóstico del cáncer de próstata. Lamentablemente, la introducción de marcadores moleculares en el tejido como herramienta de pronóstico no ha sido validada para ninguno de los marcadores expuestos.

- 25 Las experiencias en las últimas dos décadas han revelado la complejidad práctica y logística en la traducción de marcadores moleculares en uso clínico. Varios esfuerzos prospectivos, teniendo en cuenta estos problemas, están actualmente en curso para establecer la utilidad clínica de una serie de marcadores. Claramente, las biorreservas de tejido de muestras bien documentadas, incluidos los datos de seguimiento clínico, desempeñan un papel fundamental en el proceso de validación.

- 30 Nuevas pruebas de fluidos corporales basadas en la hipermetilación de GSTP1 y el gen PCA3, que está muy sobreexpresado en el cáncer de próstata, permitieron la detección del cáncer de próstata en fluidos corporales obtenidos de manera no invasiva, como la orina o los eyaculados.

La aplicación de nuevas tecnologías ha demostrado que una gran cantidad de genes han aumentado en el cáncer de próstata. Por ejemplo, el documento WO 2009/042742 describe un método para diagnosticar *in vitro* cáncer de próstata en un ser humano determinando la expresión de DLX1, estableciendo su aumento o disminución y

- 35 posteriormente diagnosticando el cáncer de próstata.

Aunque los marcadores descritos anteriormente, al menos parcialmente, abordan la necesidad en la técnica de marcadores tumorales, y especialmente marcadores tumorales de próstata, existe una necesidad continua de marcadores tumorales (prostáticos) fiables, y especialmente marcadores indicativos del curso de la enfermedad.

- 40 Es un objeto de la presente invención, entre otros, alcanzar al menos parcialmente, si no completamente, el objeto anterior.

Según la presente invención, el objeto anterior, entre otros, se cumple mediante marcadores tumorales y métodos como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Específicamente, el objeto anterior, entre otros, se cumple mediante un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de próstata en un ser humano que comprende:

- 45 - determinar la expresión de DLX1; y  
- establecer el aumento o disminución de la expresión de la expresión de DLX1 en comparación con la expresión de DLX1 en una muestra de un individuo sin cáncer de próstata;

proporcionando de ese modo dicho diagnóstico de cáncer de próstata.

- 50 Según la presente invención, el diagnóstico del cáncer de próstata preferiblemente comprende el diagnóstico, el pronóstico y/o la predicción de la supervivencia de la enfermedad.

Según la presente invención, el análisis de expresión comprende establecer una expresión aumentada o disminuida

de un gen en comparación con la expresión del gen en un tejido de cáncer no prostático, es decir, en condiciones sin enfermedad.

Según una realización preferida, el presente método se realiza en muestras urinarias, preferiblemente de sedimentos urinarios.

- 5 Según una realización preferida del presente método, determinar la expresión comprende determinar la expresión de ARNm de dichos gen o más genes.

El análisis de expresión basado en ARNm es generalmente conocido en la técnica y se practica rutinariamente en laboratorios de diagnóstico en todo el mundo. Por ejemplo, las técnicas adecuadas para el análisis de ARNm son técnicas basadas en la hibridación y amplificación de transferencia Northern tales como PCR, y especialmente PCR en tiempo real, y NASBA.

10 Según una realización particularmente preferida, el análisis de expresión comprende un análisis de chips de ADN de alto rendimiento que no solo permite el análisis simultáneo de múltiples muestras sino también un procesamiento de análisis automático.

- 15 El presente método proporciona diagnóstico de cáncer de próstata en un ser humano seleccionado del grupo consistente en diagnosticar PrCa de alto grado (HG), PrCa Met y CPRC.

LG indica PrCa de bajo grado (puntuación de Gleason igual o menor a 6) y representa pacientes con buen pronóstico. HG indica PrCa de alto grado (puntuación de Gleason de 7 o más) y representa pacientes con mal pronóstico. CPRC indica cáncer de próstata resistente a la castración y representa a pacientes con enfermedad agresiva localizada. Por último, PrCa Met representa pacientes con mal pronóstico.

- 20 Según una realización particularmente preferida del presente método, la presente invención proporciona el diagnóstico de CPRC.

Teniendo en cuenta el valor de diagnóstico de los genes presentes como biomarcadores de cáncer de próstata, la presente invención también se refiere al uso de DLX1 para el diagnóstico *in vitro* del presente cáncer de próstata.

En la presente descripción, se hace referencia a genes adecuados como biomarcadores para cáncer de próstata al

- 25 referirse a sus nombres arbitrariamente asignados. Aunque el experto en la técnica es capaz de identificar fácilmente y usar los genes presentes como biomarcadores basándose en estos nombres, las figuras adjuntas proporcionan tanto la secuencia de ADNc como las secuencias de proteínas de estos genes en la base de datos pública como también las referencias que describen estos genes. Basándose en los datos proporcionados en las figuras, el experto en la técnica, sin excesiva experimentación y usando medios normales de biología molecular, será capaz de determinar la expresión de los biomarcadores indicados en una muestra proporcionando de este modo el presente método de diagnóstico.

La presente invención se aclarará más en los siguientes ejemplos. En los ejemplos, se hace referencia a las figuras, en las que:

- 35 Figuras 1-13: muestran las secuencias de ARNm y aminoácidos del gen ACSM1 (NM\_052956, NP\_443188); del gen ALDH3B2 (NM\_000695, NP\_000686); del gen CGREF1 (NM\_006569, NP\_006560); del gen COMP (NM\_000095, NP\_000086); del gen C19orf48 (NM\_199249, NP\_954857); del gen DLX1 (NM\_178120, NP\_835221); del gen GLYATL1 (NM\_080661, NP\_542392); del gen MS4A8B (NM\_031457, NP\_113645); del gen NTA1 (NM\_024522, NP\_078798); del gen PPFIA2 (NM\_003625, NP\_003616); del gen PTPRT (NM\_133170, NP\_573400); del gen TDRD1 (NM\_198795, NP\_942090) y del gen UGT2B15 (NM\_001076, NP\_001067).

Figuras 14-26: muestra diagramas de caja basados en los datos de validación de TLDA en los grupos de próstata normal (NPr), BPH, cáncer de próstata de bajo grado (LG PrCa), HG, cáncer de próstata de alto grado (HG PrCa), CPRC, metástasis de cáncer de próstata (PrCa Met), vejiga normal, linfocitos de sangre periférica (PBL) y sedimentos urinarios.

- 45 Figuras 27-33: muestran las secuencias de ADNc y aminoácidos del gen HOXC6 (NM\_004503.3, NP\_004494.1); del gen SFRP2 (NM\_003013.2, NP\_003004.1); del gen HOXD10 (NM\_002148.3, NP\_002139.2); del gen RORB (NM\_006914.3, NP\_008845.2); del gen RRM2 (NM\_001034.2, NP\_001025.1); del gen TGM4 (NM\_003241.3, NP\_003232.2); y del gen SNAI2 (NM\_003068.3, NP\_003059.1, respectivamente;

- 50 Figuras 34-40: muestran los datos del TLDA en diagrama de caja basados en el análisis de expresión del grupo LG (bajo grado), HG (alto grado), CPRC (resistente a la castración) y PrCa Met (metástasis del cáncer de próstata) del gen HOXC6 (NM\_004503.3); del gen SFRP2 (NM\_003013.2); del gen HOXD10 (NM\_002148.3); del gen RORB (NM\_006914.3); del gen RRM2 (NM\_001034.2); del gen TGM4 (NM\_003241.3); y del gen SNAI2 (NM\_003068.3), respectivamente. NP indica sin cáncer de próstata,

es decir, niveles de expresión normales o estándar.

#### Ejemplo 1

Para identificar marcadores de cáncer de próstata agresivo, se utilizó el perfil de expresión génica (chips Affymetrix exon 1.0) de muestras de pacientes con cáncer de próstata en las siguientes categorías:

5 Se usaron muestras de próstata en las siguientes categorías:

- Próstata normal (NPr), n = 8.
- Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), n = 12.
- Cáncer de próstata de bajo grado (LG PrCa): muestras de tejido de tumores primarios con una puntuación de Gleason  $\leq 6$  obtenidas después de prostatectomía radical. Este grupo representa pacientes con un buen pronóstico, n = 25.
- Cáncer de próstata de alto grado (HG PrCa): muestras de tejido de tumores primarios con una puntuación de Gleason  $\geq 7$  obtenidas después de una prostatectomía radical. Este grupo representa pacientes con mal pronóstico, n = 24.
- Cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC): las muestras de tejido se obtienen de pacientes que están bajo tratamiento endocrino progresivo y que se someten a una resección transuretral de la próstata (RTUP), n = 23
- Metástasis de cáncer de próstata (Met PrCa): las muestras de tejido se obtienen de linfomas positivos después de LND o después de la autopsia. Este grupo representa pacientes con mal pronóstico, n = 7.

Además, para diagnosticar cáncer de próstata clínicamente significativo (pacientes con mal pronóstico), se determinaron los perfiles de expresión de las categorías pT2 (tumor confinado a la próstata, n = 10) y pT3 (cáncer de próstata localmente avanzado, n = 9).

El análisis de expresión se realiza según protocolos normalizados.

En pocas palabras, el tejido de pacientes con cáncer de próstata (pertenecientes a una de las últimas cuatro categorías mencionadas anteriormente) se obtuvo después de la prostatectomía radical o RTUP. La próstata normal se obtuvo de regiones sin cáncer de estas muestras o de la autopsia. El tejido de BPH se obtuvo de RTUP o prostatectomía abierta transvesical (Hryntschak). Los tejidos se congelaron rápidamente y las secciones de criostato se tiñeron H.E. para su clasificación por un patólogo

Se disecaron las áreas con tumor y sin tumor y se extrajo todo el ARN con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se purificó todo el ARN con el miniequipo Qiagen RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). La integridad del ARN se comprobó por electroforesis usando Agilent 2100 Bioanalyzer.

A partir del ARN total purificado, se utilizó 1  $\mu$ g para el GeneChip Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.). Según el protocolo de este ensayo, la mayoría del ARN ribosómico se eliminó utilizando un RiboMinus Human/ Mouse Transcriptoma Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Utilizando un hexámero aleatorio que incorpora un activador T7, se sintetizó ADNc bicatenario. Luego se generó ARNc a partir de la plantilla de ADNc bicatenario mediante una reacción de transcripción *in vitro* y se purificó utilizando el módulo de limpieza de muestras Affymetrix. El ADNc monocatenario se regeneró mediante una transcripción inversa cebada aleatoriamente usando una mezcla de dNTP que contenía dUTP. El ARN se hidrolizó con ribonucleasa H y el ADNc se purificó. El ADNc se fragmentó a continuación por incubación con una mezcla de endonucleasas de restricción UDG (uracil ADN glucosilasa) y APE1 (endonucleasa 1 apurínica/apirimidínica) y, por último, se marcó en el extremo mediante una reacción de transferasa terminal que incorpora un didesoxinucleótido biotinilado.

Se añadieron 5,5  $\mu$ g del ADNc biotinilado y fragmentado a una mezcla de hibridación, se cargaron en un chip ST de Exón 1.0 humano y se hibridaron durante 16 horas a 45°C y 60 rpm.

Utilizando el chip de exón de Affymetrix, se miden indirectamente los genes por el análisis de exones cuyas mediciones se pueden combinar en mediciones de grupos de transcripción. Hay más de 300.000 grupos de transcripción en el chip, de los cuales 90.000 contienen más de un exón. De estos 90.000, hay más de 17.000 genes de alta confianza (CORE) que se utilizan en el análisis predeterminado. En total, hay más de 5,5 millones de elementos por chip.

Después de la hibridación, el chip se lavó y se tiñó según el protocolo de Affymetrix. El chip teñido se escaneó a 532 nm utilizando un Affymetrix GeneChip Scanner 3000, generando archivos CEL para cada chip.

Los valores de expresión en el exón procedían de las intensidades de hibridación en la sonda de archivo CEL

utilizando el algoritmo RMA basado en modelo tal como se realizó en el programa informático Affymetrix Expression Console™. RMA (Robust Multiarray Average) realiza la normalización, la corrección de fondo y el resumen de datos.

Los genes expresados diferencialmente entre las condiciones se calculan utilizando Anova (ANalysis Of Variance), prueba de la T para más de dos grupos.

- 5 La identificación del objetivo está sesgada ya que se analizaron grupos de riesgo clínicamente bien definidos. Los marcadores se clasifican según su función en la biología del cáncer. Para la identificación de marcadores se compararon diferentes grupos: NPr con LG- y HG PrCa, PrCa Met con LG- y HG PrCa, CPRC con LG- y HG PrCa. Por último, las muestras se clasificaron según el estadio clínico y se comparó PrCa confinado en un órgano (pT2) con PrCa no confinado en un órgano (pT3).
- 10 En base al análisis de expresión obtenido, se identificaron biomarcadores basados en 99 muestras de próstata; las diferencias en los niveles de expresión entre los diferentes grupos se proporcionan en la Tabla 1 a, b, c y d.

Tabla 1a: Diferencias de nivel de expresión entre PrCa de bajo grado (LG) y de alto grado (HG) frente a próstata normal (NPr) de 25 dianas según el análisis de 99 muestras muy comentadas

| Símbolo del gen | Nombre del gen                                                      | Asignación del gen | Cambio de veces | LG + HG frente a NPr | Fila |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------|------|
| CRISP3          | proteína 3 secretora rica en cisteína                               | NM_006061          | 17,05           | aumento              | 1    |
| GLYATL1         | seudoglicina-N-aciltransferasa 1                                    | NM_080661          | 10,24           | aumento              | 2    |
| AMACR           | alfa-metilacil-CoA racemasa                                         | NM_014324          | 9,59            | aumento              | 4    |
| TARP            | proteína alternativa del marco de lectura TCR gamma                 | NM_001003799       | 9,42            | aumento              | 5    |
| ACSM1           | miembro 1 de la familia de cadena media acil-CoA sintetasa          | NM_052956          | 8,43            | aumento              | 7    |
| TDRD1           | dominio tudor que contiene 1                                        | NM_198795          | 7,70            | aumento              | 8    |
| TMEM45B         | proteína transmembrana 45B                                          | NM_138788          | 7,05            | aumento              | 9    |
| FOLH1           | folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de la próstata) 1 | NM_004476          | 6,47            | aumento              | 10   |
| C19orf48        | marco de lectura abierto 48 del cromosoma 19                        | NM_199249          | 5,91            | aumento              | 12   |
| ALDH3B2         | familia de aldehído deshidrogenasa 3, miembro B2                    | NM_000695          | 5,66            | aumento              | 13   |
| NETO2           | neurofilina (NRP) y pseudotoloid (TLL) 2                            | NM_018092          | 5,63            | aumento              | 14   |
| MS4A8B          | miembro 8B de la subfamilia A de 4 dominios que cubren la membrana  | NM_031457          | 5,00            | aumento              | 18   |
| TLCD1           | dominio TLC que contiene 1                                          | NM_138463          | 4,73            | aumento              | 21   |
| FASN            | ácido graso sintasa                                                 | NM_004104          | 4,69            | aumento              | 22   |
| GRPR            | receptor del péptido liberador de gastrina                          | NM_005314          | 4,51            | aumento              | 24   |
| HPN             | hepsina                                                             | NM_182983          | 4,44            | aumento              | 25   |
| PTPRT           | proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, T                       | NM_133170          | 4,21            | aumento              | 29   |
| TOP2A           | topoisomerasa (ADN) II alfa 170 kDa                                 | NM_001067          | 3,79            | aumento              | 37   |
| FAM111B         | miembro B de la familia con similitud de secuencia 111              | NM_198947          | 3,77            | aumento              | 39   |
| NKAIN1          | ATPasa interactuante 1 transportadora de $Na^+/K^+$                 | NM_024522          | 3,76            | aumento              | 40   |
| DLX1            | homeosecuencia 1 menos distante                                     | NM_178120          | 3,54            | aumento              | 52   |
| TPX2            | TPX2, homólogo, asociado a microtúbulos                             | NM_012112          | 3,47            | aumento              | 54   |
| CGREF1          | regulador de crecimiento celular con dominio mano EF                | NM_006569          | 3,22            | aumento              | 66   |
| DPT             | Dermatopontina                                                      | NM_001937          | -6,31           | disminución          | 2    |
| ASPA            | aspartoacilasa (enfermedad de Canavan)                              | NM_000049          | -5,17           | disminución          | 7    |

Tabla 1b: Diferencias de nivel de expresión entre metástasis de cáncer de próstata (Met PrCa) frente a PrCa de bajo grado (LG) y de alto grado (HG) de 11 dianas basadas en el análisis de 99 muestras muy comentadas

| Símbolo del gen | Nombre del gen                                                                        | Asignación del gen | Cambio de veces | PrCa Met frente a LG + H | Fila |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------------|------|
| PPFIA2          | proteína $\alpha 2$ que interactúa con receptor tipo f de proteína tirosina fosfatasa | NM_003625          | 4,59            | aumento                  | 3    |
| CDC20           | homólogo 20 del ciclo de división celular ( <i>S. cerevisiae</i> )                    | NM_001255          | 4,27            | aumento                  | 4    |
| FAM110B         | miembro B de la familia con similitud de secuencia 110                                | NM_147189          | 3,70            | aumento                  | 6    |
| TARP            | proteína alternativa del marco de lectura TCR gamma                                   | NM_001003799       | 3,26            | aumento                  | 12   |
| ANLN            | anillin, proteína de unión a actina                                                   | NM_018685          | 3,17            | aumento                  | 13   |
| KIF20A          | miembro 20A de la familia de cinesina                                                 | NM_005733          | 3,16            | aumento                  | 14   |
| TPX2            | TPX2, homólogo, asociado a microtúbulos                                               | NM_012112          | 3,15            | aumento                  | 15   |
| CDC2            | ciclo 2 de división celular, G1 a S y G2 a M                                          | NM_001130829       | 2,88            | aumento                  | 23   |
| PGM5            | fosfoglucomutasa 5                                                                    | NM_021965          | -15,71          | disminución              | 10   |
| MSMB            | microseminoproteína, beta-                                                            | NM_002443          | -12,23          | disminución              | 15   |
| HSPB8           | proteína 8 del choque térmico de 22 kDa                                               | NM_014365          | -12,10          | disminución              | 16   |

5 Tabla 1c: Diferencias de nivel de expresión entre CPRC frente a PrCa de bajo grado (LG) y alto grado (HG) de 21 dianas basadas en el análisis de 99 muestras muy comentadas

| Símbolo del gen | Nombre del gen                                                     | Asignación del gen | Cambio de veces | CPRC frente a LG + HG | Fila |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------------|------|
| AR              | Receptor de andrógenos                                             | NM_000044          | 4,66            | aumento               | 1    |
| UGT2B15         | polipéptido B15 de la familia de UDP glucuronosiltransferasa 2     | NM_001076          | 4,20            | aumento               | 2    |
| CDC20           | homólogo 20 del ciclo de división celular ( <i>S. cerevisiae</i> ) | NM_001255          | 3,86            | aumento               | 4    |
| TOP2A           | topoisomerasa (ADN) II alfa 170 kDa                                | NM_001067          | 3,54            | aumento               | 5    |
| MKI67           | antígeno identificado por anticuerpo monoclonal Ki-67              | NM_002417          | 3,47            | aumento               | 6    |
| TPX2            | TPX2, homólogo, asociado a microtúbulos                            | NM_012112          | 3,40            | aumento               | 7    |
| AKR1C1          | Miembro C1 de la familia aldo-ceto reductasa 1                     | NM_001353          | 3,35            | aumento               | 8    |
| CDC2            | ciclo 2 de división celular, G1 a S y G2 a M                       | NM_001130829       | 3,21            | aumento               | 10   |
| ANLN            | anillin, proteína de unión a actina                                | NM_018685          | 3,08            | aumento               | 11   |
| KIF4A           | miembro 4A de la familia de cinesina                               | NM_012310          | 3,02            | aumento               | 12   |
| PTTG1           | Transformante 1 del tumor de pituitaria                            | NM_004219          | 2,95            | aumento               | 13   |
| KIF20A          | miembro 20A de la familia de cinesina                              | NM_005733          | 2,90            | aumento               | 14   |
| AKR1C3          | Miembro C3 de la familia aldo-ceto reductasa 1                     | NM_003739          | 2,88            | aumento               | 15   |
| FAM111B         | miembro B de la familia con similitud de secuencia 111             | NM_198947          | 2,81            | aumento               | 16   |
| CKS2            | subunidad 2 reguladora de proteína cinasa CDC28                    | NM_001827          | 2,79            | aumento               | 19   |
| UGT2B17         | polipéptido B17, de la familia UDP glucuronosiltransferasa 2       | NM_                | 2,77            | aumento               | 20   |
| BUB1            | incipiente no inhibido por homólogo 1 de bencimidazoles            | NM_004336          | 2,75            | aumento               | 21   |
| MSMB            | microseminoproteína, beta-                                         | NM_002443          | -6,99           | disminución           | 6    |

|       |                                                       |           |       |             |    |
|-------|-------------------------------------------------------|-----------|-------|-------------|----|
| NR4A1 | miembro 1, grupo A, subfamilia 4 del receptor nuclear | NM_002135 | -6,57 | disminución | 7  |
| MT1M  | metalotioneína 1M                                     | NM_176870 | -6,08 | disminución | 10 |
| DUSP1 | fosfatasa 1 de doble especificidad                    | NM_004417 | -5,59 | disminución | 12 |

Tabla 1d: *Diferencias de nivel de expresión entre PrCa(pT2) confinada en el órgano frente a (pT3)PrCa no confinada en el órgano de 21dianas basadas en el análisis de 99 muestras muy comentadas*

| Símbolo del gen | Nombre del gen                                                                        | Asignación del gen | Cambio de veces | pT3 frente a pT2 | Fila |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|------------------|------|
| TTN             | Titina                                                                                | NM_133378          | 4,88            | aumento          | 2    |
| SSL             | Sarcolipina                                                                           | NM_003063          | 3,62            | aumento          | 3    |
| PPFIA2          | proteína $\alpha 2$ que interactúa con receptor tipo f de proteína tirosina fosfatasa | NM_003625          | 3,47            | aumento          | 4    |
| COMP            | proteína de matriz oligomérica del cartílago                                          | NM_000095          | 2,74            | aumento          | 6    |
| ABI3BP          | miembro 3 de la familia ABI                                                           | NM_015429          | 2,71            | aumento          | 7    |
| NEB             | Nebulina                                                                              | NM_004543          | 2,58            | aumento          | 8    |
| MT1M            | metalotioneína 1M                                                                     | NM_176870          | -6,03           | disminución      | 1    |
| MT1G            | metalotioneína 1G                                                                     | NM_005950          | -3,61           | disminución      | 2    |

- 5 Como puede verse claramente en la tabla 1, un aumento o disminución de la expresión de los genes mostrados se asoció con el cáncer de próstata, CPRC, metástasis de próstata o fase tumoral.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores obtenidos en 99 muestras tumorales, los datos de expresión demuestran claramente que estos genes son adecuados como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de próstata.

## 10 Ejemplo 2

- Utilizando el perfil de expresión génica (chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, Affymetrix) en 99 muestras de próstata, se encontró que varios genes se expresan diferencialmente en próstata normal en comparación con cáncer de próstata y/o cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) o se expresan diferencialmente entre el cáncer de próstata de bajo grado y de alto grado en comparación con CPRC y/o la metástasis del cáncer de próstata. Junto con varios otros en los genes expresados diferencialmente chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, los niveles de expresión de estos genes se validaron usando los chips TaqMan® de baja densidad (TLDA, Applied Biosystems). En la Tabla 2, se muestra una descripción general de los genes validados.

Tabla 2: *Ensayos de expresión génica utilizados para el análisis de TLDA*

| Símbolo del gen | Descripción                                                | ID del gen | Tamaño del amplicón (pb) |
|-----------------|------------------------------------------------------------|------------|--------------------------|
| ABI3BP          | proteína de unión familia ABI, miembro 3 (NESH)            | NM_015429  | 84                       |
| ACSM1           | miembro 1 de la familia de cadena media acil-CoA sintetasa | NM_052956  | 74                       |
| ALDH3B2         | familia de aldehído deshidrogenasa 3, miembro B2           | NM_000695  | 126                      |
| AMACR           | alfa-metilacil-CoA racemasa                                | NM_014324  | 97                       |
| ANLN            | anillina, proteína de unión a actina                       | NM_018685  | 71                       |
| ASPA            | aspartoacilasa (enfermedad de Canavan)                     | NM_000049  | 63                       |
| BUB1            | incipiente no inhibido por homólogo 1 de bencimidazoles    | NM_004336  | 61                       |
| C19orf48        | marco de lectura abierto 48 del cromosoma 19               | NM_199249  | 59                       |

## ES 2 663 069 T3

|          |                                                                     |           |     |
|----------|---------------------------------------------------------------------|-----------|-----|
| CDC2     | ciclo 2 de división celular, G1 a S y G2 a M                        | NM_033379 | 109 |
| CDC20    | Homólogo del ciclo 20 de división celular ( <i>S. cerevisiae</i> )  | NM_001255 | 108 |
| CGREF1   | regulador de crecimiento celular con dominio mano EF                | NM_006569 | 58  |
| CKS2     | subunidad 2 reguladora de proteína cinasa CDC28                     | NM_001827 | 73  |
| COMP     | proteína de matriz oligomérica del cartílago                        | NM_000095 | 101 |
| CRISP3   | proteína 3 secretora rica en cisteína                               | NM_006061 | 111 |
| DLX1     | homeosecuencia 1 menos distal                                       | NM_178120 | 95  |
| DPT      | Dermatopontina                                                      | NM_001937 | 67  |
| DUSP1    | fosfatasa 1 de doble especificidad                                  | NM_004417 | 63  |
| ERG      | homólogo de oncogén del virus E26 de la eritroblastosis v-ets       | NM_004449 | 104 |
| FAM110B  | miembro B de la familia con similitud de secuencia 110              | NM_147189 | 74  |
| FAM111B  | miembro B de la familia con similitud de secuencia 111              | NM_198947 | 68  |
| FASN     | sintasa de ácido graso                                              | NM_004104 | 62  |
| FOLH1    | folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de la próstata) 1 | NM_004476 | 110 |
| GLYATL-1 | seudoglicina-N-aciltransferasa 1                                    | NM_080661 | 83  |
| GRPR     | receptor del péptido liberador de gastrina                          | NM_005314 | 68  |
| HPRT1    | Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1                               | NM_000194 | 72  |
| HSPB8    | proteína 8 del choque térmico de 22 kDa                             | NM_014365 | 66  |
| KIF20A   | miembro 20A de la familia de cinesina                               | NM_005733 | 71  |
| KIF4A    | miembro 4A de la familia de cinesina                                | NM_012310 | 88  |
| MKI67    | antígeno identificado por anticuerpo monoclonal Ki-67               | NM_002417 | 66  |
| MS4A8B   | miembro 8B de la subfamilia A de 4 dominios que cubren la membrana  | NM_031457 | 62  |
| MSMB     | microseminoproteína, beta-                                          | NM_138634 | 149 |
| MT1M     | metalotioneína 1M                                                   | NM_176870 | 144 |
| NETO2    | neurofilina (NRP) y pseudotoloid (TLL) 2                            | NM_018092 | 66  |
| NKAIN1   | ATPasa interactuante 1 transportadora de $Na^+/K^+$                 | NM_024522 | 96  |
| NR4A1    | miembro 1, grupo A, subfamilia 4 del receptor nuclear               | NM_002135 | 79  |
| PCA3     | antígeno 3 del cáncer de próstata                                   | AF103907  | 52  |
| PGM5     | fosfoglucomutasa 5                                                  | NM_021965 | 121 |
| PPFIA2   | proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido f           | NM_003625 | 66  |
| PTPRT    | proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo T                        | NM_133170 | 62  |
| PTTG1    | transformante 1 del tumor de pituitaria                             | NM_004219 | 86  |
| TDRD1    | dominio tudor que contiene 1                                        | NM_198795 | 67  |
| TLCD1    | dominio TLC que contiene 1                                          | NM_138463 | 63  |
| TMEM45B  | proteína transmembrana 45B                                          | NM_138788 | 70  |
| TOP2A    | topoisomerasa (ADN) II alfa 170 kDa                                 | NM_001067 | 125 |
| TPX2     | TPX2, homólogo, asociado a microtúbulos                             | NM_012112 | 89  |

|         |                                                                |           |     |
|---------|----------------------------------------------------------------|-----------|-----|
| TIN     | Titina                                                         | NM_133378 | 85  |
| UGT2B15 | polipéptido B15 de la familia de UDP glucuronosiltransferasa 2 | NM_001076 | 148 |

Se usaron muestras de próstata en las siguientes categorías:

- Próstata normal (NPr) (n = 6)
- Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (n = 6)
- 5 - Cáncer de próstata de bajo grado (LG PrCa) (n = 14): muestras de tejido de tumores primarios con una puntuación de Gleason  $\leq 6$  obtenidas después de prostatectomía radical. Este grupo representa pacientes con un buen pronóstico.
- Cáncer de próstata de alto grado (HG PrCa) (n = 14): muestras de tejido de tumores primarios con una puntuación de Gleason  $\geq 7$  obtenido después de la prostatectomía radical. Este grupo representa pacientes con mal pronóstico.
- 10 - Cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) (n = 14): las muestras de tejido se obtienen de pacientes que son progresivos bajo terapia endocrina y que se sometieron a una resección transuretral de la próstata (RTUP).
- Metástasis del cáncer de próstata (Met PrCa) (n = 8): las muestras de tejido se obtienen de linfomas positivos después de la LND o después de la autopsia. Este grupo representa a pacientes con mal pronóstico.
- 15

Todas las muestras de tejido se congelaron rápidamente y las secciones de criostato se tiñeron con hematoxilina y eosina (H.E.). Estas secciones teñidas con H.E. fueron clasificadas por un patólogo.

- 20 Se disecaron áreas de tumor y sin tumor. El ARN se extrajo de secciones en serie de 10  $\mu\text{m}$  de espesor que se recogieron de cada muestra de tejido en varios niveles. El tejido se evaluó mediante tinción con HE de secciones en cada nivel y se verificó al microscopio. El ARN total se extrajo con TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA., EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

La cantidad y calidad de ARN se evaluaron en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE., EE. UU.) y en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA., EE. UU.).

- 25 Se transcribieron de forma inversa 2  $\mu\text{g}$  de ARN completo tratado con desoxirribonucleasa usando transcriptasa inversa SuperScript™ II (Invitrogen) en una reacción de 37, 5  $\mu\text{l}$  según el protocolo del fabricante. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C. Al ADNc, se añadieron 62, 5  $\mu\text{l}$  de milliQ.

- 30 Para la validación, no solo se usaron muestras de tejido de próstata. Para investigar si los marcadores seleccionados podrían detectarse con éxito en fluidos corporales, también se incluyeron muestras normales de tejido de vejiga, de linfocitos de sangre periférica (PBL) y muestras de sedimento urinario en la etapa de validación del marcador. La señal de fondo de los marcadores en la vejiga normal y los sedimentos urinarios de pacientes sin cáncer de próstata debe ser baja.

- 35 Estas muestras de sedimento urinario se recogieron en tres hospitales una vez que todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento aprobado por la junta de revisión institucional. Las primeras muestras de orina evacuada se recogieron después del examen rectal digital (ERD) de hombres para los que se prevé cáncer de próstata. Después de la recogida de muestras de orina, el urólogo realizó biopsias de próstata según un protocolo normalizado. Se evaluaron las biopsias de próstata y, en caso de que hubiera cáncer de próstata, se determinó la puntuación de Gleason.

- 40 En primer lugar se recogió la orina evacuada después del ERD (20-30 ml) en un tubo codificado que contenía 2 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0. Todas las muestras se enfriaron inmediatamente a 4°C y se enviaron en lotes con paquetes congelados al laboratorio de NovioGendix. Las muestras se procesaron en las 48 h posteriores a la adquisición de las muestras para garantizar una buena calidad de muestra. Tras la centrifugación a 4°C y 1.800 x g durante 10 minutos, se obtuvieron sedimentos urinarios. Estos sedimentos urinarios se lavaron dos veces con solución de cloruro de sodio tamponada enfriada con hielo (a 4°C y 1.800 x g durante 10 minutos), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.
- 45

Se extrajo todo el ARN de estos sedimentos urinarios, utilizando el reactivo de aislamiento TriPure (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos) según el protocolo de los fabricantes.

Se añadieron dos pasos adicionales. En primer lugar se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de glucógeno (15 mg/ml) como vehículo

(Ambion, Austin (TX), EE.UU.) antes de la precipitación con isopropanol. En segundo lugar, se realizó una segunda etapa de precipitación con acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 100% de etanol para descartar restos de reactivo de aislamiento TriPure.

- 5 El ARN se disolvió en agua sin ribonucleasa y se incubó durante 10 minutos a 55-60°C. El ARN se trató con desoxirribonucleasa utilizando DNase de calidad amplificación (Invitrogen™, Breda, Holanda) según el protocolo del fabricante. De nuevo se añadió glucógeno como vehículo y el ARN se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 5,2 y etanol al 100% durante 2 horas a -20°C.

- 10 Después de eliminar los últimos restos de etanol, el sedimento de ARN se disolvió en 16,5 µl de agua exenta de ribonucleasa. La concentración de ARN se determinó mediante medición de D.O. (Nanodrop) y se usó 1 µg de ARN completo para la amplificación de ARN utilizando el kit de expresión Ambion®WT (Ambion, Austin (TX), EE. UU.) según el protocolo del fabricante.

Para determinar los niveles de expresiones génicas, el ADNc generado a partir del ARN extraído tanto de las muestras de tejido como de los sedimentos urinarios se utilizó como plantilla en los chips de baja densidad TaqMan® (TLDA; Applied Biosystems).

- 15 En la Tabla 2 se proporciona una lista de los ensayos utilizados en este estudio. De cada uno de los ADNc, se añaden 5 µl a 50 µl de Taqman® Universal Probe Maxter Mix (Applied Biosystems) y 50 µl de milliQ. Se cargaron 100 µl de cada muestra en 1 depósito de muestra de una TaqMan® Array (tarjeta de micro-fluido de 384 pocillos) (Applied Biosystems). La TaqMan® Array se centrifugó dos veces durante 1 minuto a 280 g y se selló para evitar la contaminación de pozo a pozo. Las tarjetas se colocaron en el bloque de muestra de tarjeta de micro-fluido de un sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 94,5°C, seguido de 40 ciclos durante 30 segundos a 97°C y 1 minuto a 59,7°C.

- 20 Los datos brutos se registraron con el programa informático Sequence detection System (SDS) de los instrumentos. Las Micro Fluidic Cards se analizaron con documentos RQ y el RQ Manager Software para el análisis automático de datos. Los valores del umbral del ciclo delta (Ct) se determinaron como la diferencia entre el Ct de cada gen de prueba y el Ct de hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT) (gen de referencia endógeno).

- 25 Además, los valores de expresión génica se calcularon en base al método del ciclo de umbral comparativo (Ct), en el que una muestra de ARN de próstata normal se designó como un calibrador al que se compararon las demás muestras.

- 30 Para la validación de los genes expresados de forma diferencial encontrados mediante chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, se usaron 60 muestras de tejido de próstata en los chips de baja densidad TaqMan® (TLDA). Para investigar si los marcadores podrían usarse en fluidos corporales, también se incluyeron 2 muestras de tejido vesical normal, 2 muestras de linfocitos de sangre periférica y 16 sedimentos urinarios (de los cuales 9 tenían PrCa en sus biopsias y 7 no).

- 35 En los TLDA, se determinaron los niveles de expresión para los 47 genes de interés. Las muestras de cáncer de próstata se ordenaron a partir de próstata normal, BPH, puntuaciones bajas de Gleason, puntuaciones altas de Gleason, CPRC y por último metástasis de cáncer de próstata. Tanto el chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® como los datos TLDA se analizaron usando diagramas de dispersión y de caja.

Después del análisis de los diagramas de caja y de dispersión, se obtuvo una lista de genes indicativos de cáncer de próstata y su pronóstico (Tabla 3, Figuras 14 t/m 26).

- 40 **Tabla 3: Lista de genes identificados**

| Símbolo del gen | Descripción del gen                                        | Aumento/disminución en grupo  | Fila | ID del gen |
|-----------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------|------|------------|
| ACSM1           | miembro 1 de la familia de cadena media acil-CoA sintetasa | Aumento en LG/HG frente a NPr | 7    | NM_052956  |
| ALDH3B2         | familia de aldehído deshidrogenasa 3, miembro B2           | Aumento en LG/HG frente a NPr | 13   | NM_000695  |
| CGREF1          | regulador de crecimiento celular con dominio mano EF       | Aumento en LG/HG frente a NP  | 66   | NM_006569  |
| COMP            | Proteína de matriz oligomérica del cartilago               | Aumento en pT3 frente a pT2   | 6    | NM_000095  |
| C19orf48        | marco de lectura abierto 48 del cromosoma 19               | Aumento en LG/HG frente a NPr | 12   | NM_199249  |
| DLX1            | homeosecuencia 1 menos distal                              | Aumento en LG/HG frente a NPr | 52   | NM_178120  |
| GLYATL1         | seudoglicina-N-aciltransferasa 1                           | Aumento en LG/HG frente a NPr | 1    | NM_080661  |

|         |                                                                    |                                |    |           |
|---------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----|-----------|
| MS4A8B  | miembro 8B de la subfamilia A de 4 dominios que cubren la membrana | Aumento en LG/HG frente a NPr  | 18 | NM_031457 |
| NKAIN1  | ATPasa interactuante 1 transportadora de NA+/K+                    | Aumento en LG/HG frente a NPr  | 40 | NM_024522 |
| PPFIA2  | proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, polipéptido f (PTPRF)  | Aumento en Meta frente a LG/HG | 3  | NM_003625 |
|         |                                                                    | Aumento en pT3 frente a pT2    | 4  |           |
| PTPRT   | proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo T                       | Aumento en LG/HG frente a NPr  | 29 | NM_133170 |
| TDRD1   | dominio tudor que contiene 1                                       | Aumento en LG/HG frente a NPr  | 8  | NM_198795 |
| UGT2B15 | polipéptido B15 de la familia de UDP glucuronosiltransferasa 2     | Aumento en CPRC frente a LG/HG | 2  | NM_001076 |

ACSM1 (Figura 14): Los presentes datos del chip ST del exón 1.0 humano GeneChip® demostraron que ACSM1 aumentó en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron este aumento positivo en PrCa. Por lo tanto, ACSM1 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de ACSM1 en vejiga normal y PBL es muy baja. Además, la expresión de ACSM1 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, ACSM1 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

ALDH3B2 (Figura 15): Los presentes datos del chip ST del exón 1.0 humano GeneChip® demostraron que ALDH3B2 aumentó en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron el aumento en estos grupos con excepción de PrCa Met. Por lo tanto, ALDH3B2 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de ALDH3B2 en vejiga normal y PBL es muy baja. Además, la expresión de ALDH3B2 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, ALDH3B2 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

CGREF1 (Figura 16): los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que CGREF1 aumentó en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron este aumento. Por lo tanto, CGREF1 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de CGREF1 en vejiga normal y PBL es muy baja. Además, la expresión de CGREF1 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor (casi dos grupos independientes) en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, CGREF1 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

COMP (Figura 17): Los datos del presente chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que COMP aumentó (hasta 3,5 veces) en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación usando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y mostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido de NPr (hasta 32,5 veces). Por lo tanto, concluimos que COMP tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de COMP en vejiga normal y PBL es muy baja a niveles indetectables. Además, la expresión de COMP en los sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, COMP tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para cáncer de próstata.

La expresión de COMP en PrCa localmente avanzado (pT3) es mayor que en PrCa confinada en un órgano (pT2). Por lo tanto, COMP se puede utilizar como marcador de pronóstico para el cáncer de próstata (datos de GeneChip®).

C19orf48 (Figura 18): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que C19orf48 aumentó en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron este aumento. Por lo tanto, C19orf48 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de C19orf48 en la vejiga normal y PBL es muy baja. La expresión media de C19orf48 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa no es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Sin embargo, en dos de cada nueve sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa, la expresión es sumamente más alta (estrellas en el gráfico de caja) y en estos dos pacientes no se detectaría por la mayoría de los otros biomarcadores. Por lo tanto, C19orf48 tiene potencial de diagnóstico complementario como marcador urinario para cáncer de próstata.

DLX1 (Figura 19): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que DLX1 aumentó (hasta 5,6 veces) en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH.

Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y demostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido de NPr (hasta 183,4 veces). Por lo tanto, DLX1 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de DLX1 en vejiga normal y PBL es indetectable a muy baja. Además, la expresión de DLX1 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mucho mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, DLX1 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

GLYATL1 (Figura 20): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que GLYATL1 aumentó en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto. Por lo tanto, GLYATL1 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de GLYATL1 en vejiga normal y PBL es indetectable a muy baja. Además, la expresión de GLYATL1 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, GLYATL1 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

MS4A8B (Figura 21): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que MS4A8B aumentó en LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met (hasta 8,3 veces) en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación usando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y demostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido de NPr (hasta 119,8 veces). Por lo tanto, MS4A8B tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de MS4A8B en vejiga normal y PBL es indetectable. Además, la expresión de MS4A8B en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, MS4A8B tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

NKAIN1 (figura 22): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que NKAIN1 aumentó en LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met (hasta 4,6 veces) en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación usando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y mostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido NPr (hasta 61,4 veces). Por lo tanto, NKAIN1 tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de NKAIN1 en vejiga normal y PBL es indetectable. Además, la expresión de NKAIN1 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mayor (casi dos grupos independientes en el gráfico de caja) en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, NKAIN1 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

PPFIA2 (Figura 23): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que PPFIA2 aumentó en LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Este aumento fue mayor en PrCa Met.

Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron el aumento en estos grupos. Por lo tanto, PPFIA2 tiene potencial de diagnóstico

La expresión de PPFIA2 en vejiga normal y PBL es baja a indetectable. Además, la expresión de PPFIA2 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mucho más alta (casi dos grupos independientes en el gráfico de caja) en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, PPFIA2 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

PTPRT (Figura 24): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que PTPRT aumentó (hasta 11,1 veces) en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y mostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido de NPr (hasta 55,1 veces). Por lo tanto, PTPRT tiene potencial de diagnóstico.

La expresión de PTPRT en vejiga normal y PBL es muy baja a indetectable. Además, la expresión de PTPRT en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mucho más alta (casi dos grupos independientes en el gráfico de caja) en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, PTPRT tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

5 TDRD1 (Figura 25): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que TDRD1 se aumentó (hasta 12,6 veces) en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y mostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido de NPr (hasta 184,1 veces), especialmente en el grupo de LG PrCa. Por lo tanto, TDRD1 tiene potencial de diagnóstico.

10 La expresión de TDRD1 en la vejiga normal es muy baja. Además, la expresión de TDRD1 en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes con PrCa es mucho más alta (dos grupos independientes en el gráfico de caja) en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, TDRD1 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

15 UGT2B15 (Figura 26): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que UGT2B15 aumentó (hasta 5,2 veces) en los grupos LG PrCa, HG PrCa, CPRC y PrCa Met en comparación con NPr y BPH. Los experimentos de validación usando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esto y mostraron un aumento incluso mayor en tejido de PrCa frente a tejido de NPr (hasta 224,4 veces). La expresión de UGT2B15 en la vejiga normal es muy baja. Además, la expresión de UGT2B15 en sedimentos obtenidos de pacientes con PrCa es mayor en comparación con su expresión en sedimentos urinarios obtenidos de pacientes sin PrCa. Por lo tanto, UGT2B15 tiene potencial de diagnóstico como marcador urinario para el cáncer de próstata.

Dado que UGT2B15 aumenta mucho en pacientes con CPRC, es un marcador adecuado para controlar a los pacientes sometidos a terapia hormonal para su cáncer de próstata localmente avanzado. Por lo tanto, UGT2B15 también tiene valor pronóstico.

#### Ejemplo 2

25 Para identificar marcadores de cáncer de próstata agresivo, se utilizó el perfil de expresión génica (chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, Affymetrix) de muestras de pacientes con cáncer de próstata en las siguientes categorías:

- LG: PrCa de bajo grado (puntuación de Gleason igual o inferior a 6). Este grupo representa pacientes con buen pronóstico;
- 30 - HG: PrCa de alto grado (puntuación de Gleason de 7 o más). Este grupo representa pacientes con mal pronóstico; tipo de muestra, ARNm de tumor primario;
- PrCa Met. Este grupo representa pacientes con mal pronóstico; tipo de muestra; ARNm de metástasis de PrCa;
- 35 - CPRC: cáncer de próstata resistente a la castración; ARNm de material de tumor primario de pacientes que son progresivos bajo terapia endocrina. Este grupo representa pacientes con enfermedad localizada agresiva.

40 El análisis de expresión se realiza según protocolos habituales. Brevemente, en pacientes con cáncer de próstata (que pertenecen a una de las cuatro categorías mencionadas anteriormente) se obtuvo tejido tras una prostatectomía radical o RTUP. Los tejidos se congelaron rápidamente y las secciones de criostato se tiñeron con H.E. para su clasificación por un patólogo.

Se disecaron las áreas tumorales y se extrajo el ARN completo con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA., EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN completo se purificó con el mini kit RNeasy de Qiagen (Qiagen, Valencia, CA., EE.UU.). La totalidad del ARN se comprobó por electroforesis usando el Agilent 2100 Bioanalyzer.

45 Del ARN total purificado, se usó 1 µg para el GeneChip WholeTranscript (WT) Sense Target Labeling Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA., EE. UU.). Según el protocolo de este ensayo, la mayoría del ARN ribosómico se eliminó usando un RiboMinus Human/Mouse Transcriptome Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA., EE. UU.). Utilizando un hexámero aleatorio que incorpora un activador T7, se sintetizó ADNc bicatenario. A continuación, se generó ARNc a partir de la plantilla de ADNc bicatenario mediante una reacción de transcripción *in vitro* y se purificó usando el módulo de limpieza de muestras Affymetrix. El ADNc monocatenario se regeneró a través de una transcripción inversa cebada aleatoriamente usando una mezcla de dNTP que contenía dUTP. El ARN se hidrolizó con ribonucleasa H y el ADNc se purificó. El ADNc se fragmentó a continuación mediante incubación con una mezcla de endonucleasas de restricción UDG (uracil ADN glucosilasa) y APE1 (endonucleasa 1 apurínica/apirimidinica) y, por último, se marcó en el extremo mediante una reacción de transferasa terminal que incorpora un didesoxinucleótido biotinilado.

Se añadieron 5,5 µg del ADNc biotinilado fragmentado a una mezcla de hibridación, se cargaron en un GeneChip ST del exón 1.0 humano y se hibridaron durante 16 horas a 45°C y 60 rpm.

- 5 Usando el chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® (Affymetrix), los genes se miden indirectamente mediante el análisis de exones cuyas mediciones se pueden combinar en mediciones de grupos de transcripción. Hay más de 300.000 grupos de transcripción en el chip, de los cuales 90.000 contienen más de un exón. De estos 90.000, hay más de 17.000 genes de alta confianza (CORE) que se usan en el análisis predeterminado. En total, hay más de 5,5 millones de funciones por chip.

Después de la hibridación, el chip se lavó y se tiñó según el protocolo de Affymetrix. El chip teñido se escaneó a 532 nm utilizando un Affymetrix GeneChip Scanner 3000, generando archivos CEL para cada chip.

- 10 Los valores de expresión en el exón procedían de las intensidades de hibridación en la sonda de archivo CEL utilizando el algoritmo RMA basado en modelo tal como se ejecutó en el programa informático Affymetrix Expression Console™. RMA (Robust Multiarray Average) realiza la normalización, la corrección de fondo y el resumen de datos. Los genes expresados de forma diferencial entre las condiciones se calculan utilizando Anova (ANALYSIS OF Variance), una prueba de la T para más de dos grupos.
- 15 La identificación de la diana es parcial ya que se analizaron grupos de riesgo clínicamente bien definidos. Los marcadores se clasifican según su función en la biología del cáncer. Para la identificación de marcadores, el grupo PrCa Met se compara con 'HG' y 'LG'.

En base al análisis de expresión obtenido, se identificaron biomarcadores basados en 30 tumores; los perfiles de expresión de los biomarcadores se proporcionan en la tabla 4.

- 20 **Tabla 4: Características de la expresión de 7 dianas que caracterizan el fenotipo metastásico agresivo del cáncer de próstata basado en el análisis de 30 muestras muy conocidas**

| Nombre del gen | Asignación del gen | Expresión en PrCa Met | Met-LG | Fila | Met-HG | Fila | Met-CPRC |
|----------------|--------------------|-----------------------|--------|------|--------|------|----------|
| PTPR           | NM_003625          | Aumento               | 15,89  | 4    | 8,28   | 4    | 11,63    |
| EPHA6          | NM_001080448       | Aumento               | 15,35  | 5    | 9,25   | 2    | 8,00     |
| Placofilina 1  | NM_000299          | Aumento               | 5,28   | 28   | 4,92   | 8    | 5,46     |
| HOXC6          | NM_004503          | Aumento               | 5,35   | 27   | 3,34   | 43   | 3,51     |
| HOXD3          | NM_006898          | Aumento               | 1,97   | 620  | 2,16   | 238  | 1,40     |
| sFPR2          | NM_003013          | Disminución           | -6,06  | 102  | -13,93 | 15   | -3,53    |
| HOXD10         | NM_002148          | Disminución           | -3,71  | 276  | -3,89  | 238  | -5,28    |

Ejemplo 3

- 25 El protocolo del ejemplo 1 se repitió en un grupo de 70 muestras. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5: Características de expresión de 7 dianas validadas en el grupo de 70 tumores**

| Nombre del gen | Asignación del gen | Expresión en PrCa Met | Met-LG | Fila | Met-HG | Fila | Met-CPRC | Fila |
|----------------|--------------------|-----------------------|--------|------|--------|------|----------|------|
| PTPR           | NM_003625          | Aumento               | 6,92   | 1    | 2,97   | 11   | 3,66     | 2    |
| EPHA6          | NM_001080448       | Aumento               | 4,35   | 4    | 3,97   | 3    | 3,18     | 3    |
| Placofilina 1  | NM_000299          | Aumento               | 3,18   | 12   | 4,00   | 2    | 4,11     | 5    |
| HOXC6          | NM_004503          | Aumento               | 1,77   | 271  | 1,75   | 208  | 1,44     | 6    |
| HOXD3          | NM_006898          | Aumento               | 1,62   | 502  | 1,66   | 292  | 1,24     | 7    |
| sFPR2          | NM_003013          | Disminución           | -6,28  | 46   | -10,20 | 10   | -5,86    | 1    |
| HOXD10         | NM_002148          | Disminución           | -2,48  | 364  | -2,55  | 327  | -2,46    | 4    |

Como puede verse claramente en las tablas 4 y 5, un aumento de la expresión de PTPR, EPHA6, Placofilina 1, HOXC6 (Figura 27) y HOXD3 se asoció al cáncer de próstata. Además, como puede verse claramente en las tablas 4 y 5, una disminución de la expresión de sFRP2 (Figura 28) y HOXD10 (Figura 29) se asoció al cáncer de próstata.

- 5 Teniendo en cuenta los resultados anteriores obtenidos en 70 muestras tumorales, los datos de expresión demuestran claramente la idoneidad de estos genes como marcador biológico o molecular para el diagnóstico de cáncer de próstata.

#### Ejemplo 4

- 10 Usando el perfil de expresión génica (chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, Affymetrix) en 70 cánceres de próstata, se descubrió que varios genes se expresaban de forma diferencial en cáncer de próstata de bajo grado y alto en comparación con la metástasis de cáncer de próstata y cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). Junto con varios otros en los genes expresados de forma diferencial chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, los niveles de expresión de estos genes se validaron usando los chips TaqMan® de baja densidad (TLDA, Applied Biosystems). En la tabla 6 se muestra una visión general de los genes validados.

Tabla 6: *Ensayos de expresión génica utilizados para el análisis TLDA*

| Símbolo | Descripción del gen                                         | Número de ingreso | Tamaño del amplicón |
|---------|-------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| AMACR   | alfa-metilacil-CoA racemasa                                 | NM_014324         | 97-141              |
| B2M     | beta-2-microglobulina                                       | NM_004048         | 64-81               |
| CYP4F8  | citocromo P450, familia 4, subfamilia F                     | NM_007253         | 107                 |
| CDH1    | E-Cadherina                                                 | NM_004360         | 61-80               |
| EPHA6   | receptor A6 de efrina                                       | NM_001080448      | 95                  |
| ERG     | homólogo del oncogén del virus E26 de eritroblastosis v-ets | NM_004449         | 60-63               |
| ETV1    | variante 1 de ets                                           | NM_004956         | 74-75               |
| ETV4    | variante 4 de ets                                           | NM_001986         | 95                  |
| ETV5    | variante 5 de ets                                           | NM_004454         | 70                  |
| FASN    | ácido graso sintasa                                         | NM_004104         | 144                 |
| FOXD1   | forkhead box D1                                             | NM_004472         | 59                  |
| HOXC6   | homeosecuencia C6                                           | NM_004503         | 87                  |
| HOXD3   | homeosecuencia D3                                           | NM_006898         | 70                  |
| HOXD10  | homeosecuencia D10                                          | NM_002148         | 61                  |
| HPRT    | hipoxantina fosforribosiltransferasa 1                      | NM_000194         | 72-100              |
| HSD17B6 | homólogo 6 de hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa      | NM_003725         | 84                  |
| CDH2    | N-cadherina (neuronal)                                      | NM_001792         | 78-96               |
| CDH11   | OB-cadherina (osteoblasto)                                  | NM_001797         | 63-96               |
| PCA3    | gen 3 del cáncer de próstata                                | AF103907          | 80-103              |
| PKP1    | Placofilina 1                                               | NM_000299         | 71-86               |
| KLK3    | antígeno específico de la próstata                          | NM_001030047      | 64-83               |
| PTPR    | proteína tirosina fosfatasa. Tipo receptor, polipéptido f   | NM_003625         | 66                  |
| RET     | proto-oncogén ret                                           | NM_020975         | 90-97               |

|         |                                                                                    |           |       |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|
| RORB    | receptor B sin interés comercial relacionado con RAR                               | NM_006914 | 66    |
| RRM2    | ribonucleótido reductasa M2                                                        | NM_001034 | 79    |
| SFRP2   | proteína 2 relacionada con la rizada segregada                                     | NM_003013 | 129   |
| SGP28   | proteína granular específica (28 kDa)/proteína 3 secretora rica en cisteína CRISP3 | NM_006061 | 111   |
| SNAI2   | homólogo 2 de caracol SNAI2                                                        | NM_003068 | 79-86 |
| SNAI1   | homólogo 1 de caracol SNAI1                                                        | NM_005985 | 66    |
| SPINK1  | inhibidor de serina peptidasa, Kazal tipo 1                                        | NM_003122 | 85    |
| TGM4    | transglutaminasa 4 (próstata)                                                      | NM_003241 | 87-97 |
| TMPRSS2 | serina proteasa 2 de transmembrana                                                 | NM_005656 | 112   |
| TWIST   | homólogo 1 de twist                                                                | NM_000474 | 115   |

Se usaron muestras de cáncer de próstata en las siguientes categorías:

- 5 - Cáncer de próstata de bajo grado (LG): muestras de tejido de tumores primarios con una puntuación de Gleason  $\leq 6$  obtenidas después de una prostatectomía radical. Este grupo representa pacientes con un buen pronóstico.
- Cáncer de próstata de alto grado (HG): muestras de tejido de tumores primarios con una puntuación de Gleason  $\geq 7$  obtenida después de una prostatectomía radical. Este grupo representa pacientes con mal pronóstico.
- 10 - Metástasis del cáncer de próstata: las muestras de tejido se obtienen a partir de linfonodos positivos después de LND o después de autopsia. Este grupo representa a pacientes con mal pronóstico
- Cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC): las muestras de tejido se obtienen de pacientes que son progresivos bajo terapia endocrina y que se sometieron a una resección transuretral de la próstata (RTUP).

15 Todas las muestras de tejido se congelaron rápidamente y las secciones de criostato se tiñeron con hematoxilina y eosina (H.E.). Estas secciones teñidas con H.E. fueron clasificadas por un patólogo.

20 Se disecaron las áreas tumorales. Se extrajo ARN de secciones en serie de 10  $\mu\text{m}$  de espesor que se recogieron de cada muestra de tejido en varios niveles. El tejido se evaluó por tinción con HE de secciones en cada nivel y se verificó al microscopio. El ARN completo se extrajo con TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA., EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El ARN total se purificó usando el RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA., EE.UU.). La cantidad y calidad de ARN se evaluaron en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE., EE. UU.) y en un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA., EE. UU.).

25 Se transcribieron de forma inversa 2  $\mu\text{g}$  de ARN completo tratado con desoxirribonucleasa usando transcriptasa inversa SuperScript™ II (Invitrogen) en una reacción de 37, 5  $\mu\text{l}$  según el protocolo del fabricante. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C. Se añadieron 62,5  $\mu\text{l}$  de milliQ al ADNc.

30 Se midieron los niveles de expresión génica usando los chips de baja densidad TaqMan® (TLDA; Applied Biosystems). En la Tabla 5 se proporciona una lista de los ensayos utilizados en este estudio. Se añaden 3  $\mu\text{l}$  de cada uno de los ADNc a 50  $\mu\text{l}$  de Taqman® Universal Probe Master Mix (Applied Biosystems) y 47  $\mu\text{l}$  de milliQ. Se cargaron 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra en un depósito de muestra de un TaqMan® Array (tarjeta microfluida de 384 pocillos) (Applied Biosystems). El TaqMan® Array se centrifugó dos veces durante 1 minuto a 280 g y se selló para evitar la contaminación pozo a pozo. Las tarjetas se colocaron en el bloque de muestra de tarjeta de microfluído de un PCR 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 94,5°C, seguido de 40 ciclos durante 30 segundos a 97°C y 1 minuto a 59,7°C.

35 Los datos brutos se registraron con el programa informático Sequence detection System (SDS) de los instrumentos. Las Micro Fluidic Cards se analizaron con documentos RQ y el RQ Manager Software para el análisis automático de datos. Los valores del umbral del ciclo delta (Ct) se determinaron como la diferencia entre el Ct de cada gen de

prueba y el Ct de la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT) (gen de referencia endógeno). Además, los valores de expresión génica se calcularon en base al método del ciclo de umbral comparativo (Ct), en el que una muestra de ARN de próstata normal se designó como calibrador con el que se compararon las demás muestras.

- 5 Para la validación de los genes expresados diferencialmente encontrados por chip 1.0 ST de exón humano GeneChip®, se utilizaron 70 muestras de cáncer de próstata en los chips de baja densidad TaqMan® (TLDA). En estos TLDA, se determinaron los niveles de expresión para los 33 genes de interés. Las muestras de cáncer de próstata se ordenaron a partir de las bajas puntuaciones de Gleason, altas puntuaciones de Gleason, CPCR y por último la metástasis de cáncer de próstata. Tanto el chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® como los datos TLDA se analizaron usando diagramas de dispersión y de caja.
- 10 En una primera aproximación, se realizaron diagramas de dispersión en los que las muestras se ordenaron a partir de bajas puntuaciones de Gleason, altas puntuaciones de Gleason, CPCR y por último metástasis de cáncer de próstata. En una segunda aproximación, se incluyeron los datos de seguimiento clínico. Las muestras se clasificaron en seis grupos: pacientes con cáncer de próstata con tratamiento curativo, pacientes con recaída bioquímica lenta (después de 5 años o más), pacientes con recaída bioquímica rápida (dentro de 3 años), pacientes que evolucionaron, pacientes con CPCR y por último pacientes con metástasis de cáncer de próstata. Después del análisis de los diagramas de dispersión y de caja utilizando ambas aproximaciones, se obtuvo una lista de genes
- 15 indicativos para cáncer de próstata y el pronóstico de los mismos (tabla 7, figuras 34-40).

Tabla 7: Lista de genes identificados

| Símbolo | Descripción del gen                                  | Número de ingreso | Tamaño del amplicón |
|---------|------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| HOXC6   | homeosecuencia C6                                    | NM_004503         | 87                  |
| SFRP2   | proteína 2 relacionada con la rizada segregada       | NM_003013         | 129                 |
| HOXD10  | homeosecuencia D10                                   | NM_002148         | 61                  |
| RORB    | receptor B sin interés comercial relacionado con RAR | NM_006914         | 66                  |
| RRM2    | ribonucleótido reductasa M2                          | NM_001034         | 79                  |
| TGM4    | transglutaminasa 4 (próstata)                        | NM_003241         | 87-97               |
| SNAI2   | homólogo 2 de caracol SNAI2                          | NM_003068         | 79-86               |

- 20 HOXC6 (Figura 34): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® mostraron que HOXC6 aumentó en las metástasis de cáncer de próstata en comparación con los cánceres de próstata primarios de alto y bajo grado. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron este aumento. Además, se encontró que HOXC6 había aumentado en los cuatro grupos de cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Por lo tanto, HOXC6 tiene potencial de diagnóstico.

- 25 Utilizando datos de seguimiento clínico, se observó que todos los pacientes con enfermedad progresiva y 50% de pacientes con recurrencia bioquímica dentro de los 3 años posteriores al tratamiento inicial tenían un aumento mayor de la expresión de HOXC6 en comparación con los pacientes con recidiva bioquímica después de 5 años y pacientes con tratamiento curativo. Los pacientes con recidiva bioquímica dentro de los 3 años posteriores al tratamiento inicial que tenían una expresión de HOXC6 mayor también tenían un peor pronóstico en comparación
- 30 con los pacientes con una expresión de HOXC6 más baja. Por lo tanto, la expresión de HOXC6 se correlaciona con la evolución del cáncer de próstata.

- SFRP2 (figura 35): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que SFRP2 aumentaba en las metástasis de cáncer de próstata en comparación con los cánceres de próstata primarios de alto y bajo grado. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron disminución.
- 35 Además, se encontró que SFRP2 disminuye en los cuatro grupos de cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Por lo tanto, SFRP2 tiene potencial de diagnóstico.

- Utilizando datos de seguimiento clínico, se observaron diferencias en la expresión de SFRP2 entre los pacientes con tratamiento curativo, recaída bioquímica después del tratamiento inicial y enfermedad progresiva. Más del 50% de las metástasis mostraron una gran disminución de SFRP2. Además, también unos pocos pacientes con CRPC mostraron una expresión de SFRP2 muy baja. Por lo tanto, SFRP2 puede usarse para la detección de pacientes con progresión bajo terapia endocrina (CRPC) y pacientes con metástasis de cáncer de próstata. Por lo tanto se sugiere que, en combinación con un marcador que aumenta en metástasis, se podría utilizar una relación de ese marcador y SFRP2 para la detección de células tumorales circulantes.
- 40

HOXD10 (figura 36): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que HOXD10 disminuía en metástasis de cáncer de próstata en comparación con los cánceres de próstata primarios de alto y bajo grado. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron esta disminución. Además, se encontró que HOXD10 disminuía en los cuatro grupos de cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Por lo tanto, HOXD10 tiene potencial de diagnóstico.

Utilizando datos de seguimiento clínico, se observaron diferencias en la expresión de HOXD10 entre los pacientes con tratamiento curativo, recaída bioquímica después del tratamiento inicial y enfermedad progresiva. Todas las metástasis mostraron una gran disminución de HOXD10. Además, también algunos pacientes con CRPC presentaban una baja expresión de HOXD10. Por lo tanto, HOXD10 puede utilizarse para la detección de pacientes con evolución bajo terapia endocrina (CRPC) y pacientes con metástasis de cáncer de próstata.

RORB (Figura 37): Los datos actuales del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que RORB había aumentado en metástasis de cáncer de próstata y CRPC en comparación con cánceres de próstata primarios de alto y bajo grado. Los experimentos de validación utilizando chips de baja densidad TaqMan® confirmaron este aumento. Además, se encontró que RORB disminuye en todos los cánceres de próstata de bajo y alto grado en comparación con la próstata normal. En CRPC y metástasis, RORB se reexpresa en próstata normal. Por lo tanto, RORB tiene potencial de diagnóstico.

Utilizando datos de seguimiento clínico, se observaron diferencias en la expresión de RORB entre los pacientes con tratamiento curativo, recaída bioquímica después del tratamiento inicial y enfermedad progresiva. Sin embargo, en una serie de casos en el CRPC y metástasis, el aumento de RORB coincide con una disminución de SFRP2. Utilizando una proporción de RORB sobre SFRP2 podría detectarse el 75% de las metástasis del cáncer de próstata. Además, varios pacientes con CRPC tenían una alta relación RORB/SFRP2. Por lo tanto, esta relación se puede usar en la detección de pacientes con células tumorales circulantes y pacientes progresivos con CRPC.

RRM2 (figura 38): los experimentos utilizando chips de baja densidad TaqMan® presentaban un aumento de RRM2 en los cuatro grupos de cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Por lo tanto, RRM2 tiene potencial de diagnóstico. Además, la expresión de RRM2 es mayor en CRPC y metástasis demostrando que puede estar involucrado en el potencial invasivo y metastásico de las células de cáncer de próstata. Por lo tanto, RRM2 se puede usar para la detección de células tumorales de próstata circulantes.

Utilizando datos de seguimiento clínico, se observaron diferencias en la expresión de RRM2 entre los pacientes con tratamiento curativo, recaída bioquímica después del tratamiento inicial y enfermedad progresiva.

TGM4 (figura 39): Los presentes datos de chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que TGM4 había disminuido en metástasis de cáncer de próstata en comparación con los cánceres de próstata primarios de alto y bajo grado. Los experimentos de validación utilizando matrices de baja densidad TaqMan® confirmaron esta disminución. Además, se encontró que TGM4 había disminuido mucho en los cuatro grupos de cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Por lo tanto, TGM4 tiene potencial de diagnóstico.

Utilizando datos de seguimiento clínico, se observó que los pacientes con enfermedad progresiva presentaban una disminución mayor de TGM4 (subgrupo de pacientes) en comparación con los pacientes con tratamiento curativo y recaída bioquímica después del tratamiento inicial. En metástasis, la expresión de TGM4 ha disminuido completamente. Por lo tanto, TGM4 tiene potencial de pronóstico.

SNAI2 (figura 40): Los presentes datos del chip 1.0 ST de exón humano GeneChip® demostraron que SNAI2 había disminuido en metástasis de cáncer de próstata en comparación con cánceres de próstata primarios de alto y bajo grado. Los experimentos de validación utilizando matrices de baja densidad TaqMan® confirmaron esta disminución. Además, se encontró que SNAI2 disminuye en los cuatro grupos de cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Por lo tanto, SNAI2 tiene potencial de diagnóstico.

Utilizando datos de seguimiento clínico, se observaron diferencias en la expresión de SNAI2 entre los pacientes con tratamiento curativo, recaída bioquímica después del tratamiento inicial y enfermedad progresiva.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata PrCa de alto grado (HG PrCa), PrCa Met y CPRC en un individuo humano que comprende:
  - determinar la expresión de DLX1; y
- 5       - establecer el aumento o la disminución de la expresión de DLX1 en comparación con la expresión de DLX1 en una muestra de un individuo sin cáncer de próstata;  
proporcionando de ese modo dicho diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata PrCa de alto grado (HG PrCa), PrCa Met y CPRC.
- 10   2. Método según la reivindicación 1, en donde la determinación de dicha expresión comprende determinar la expresión del ARNm.
3. Utilización de la expresión de DLX1 para el diagnóstico *in vitro* del cáncer de próstata PrCa de alto grado (HG PrCa), PrCa Met y CPRC, preferiblemente CPRC.

FIGURA 1

**ACSM1** NM\_052956.2 → NP\_443188.2 acil-coenzima A sintetasa ACSM1. mitocondrial

```

1 agccatctct tcccaaggca ggtggtgact tgagaactct gtgcctgggt tctgaggact
61 gtttcacccat gcagtggcta atgaggttcc ggacctctg gggcatccac aaatccttcc
121 acaacatcca cctgcccct tcacagctgc gctgccggtc tttatcagaa tttggagccc
181 caagatggaa tgactatgaa gtaccggagg aatttaactt tgcaagttat gtactggact
241 actgggctca aaaggagaag gagggcaaga gaggtccaaa tccagctttt tgggtgggtga
301 atggccaagg ggatgaagta aagtggagct tcagagagat gggagaccta acccgccgtg
361 tagccaacgt cttcacacag acctgtggcc tacaacaggg agaccatctg gccttgatgc
421 tgccctcgagt tcttgagtgg tggctgggtg ctgtgggctg catgcgaaca gggatcatct
481 tcattcctgc gaccatcctg ttgaaggcca aagacattct ctatcgacta cagttgtcta
541 aagccaaggg cattgtgacc atagatgcc ttgcctcaga ggtggactcc atagcttctc
601 agtggcccctc tctgaaaacc aagctcctgg tgtctgatca cagccgtgaa ggggtggctgg
661 acttccgata gctggttaaa tcagcatccc cagaacacac ctgtgttaag tcaaagacct
721 tggacccaat ggtcatcttc ttcaccagtg ggaccacagg cttccccaag atggcaaaac
781 actcccatgg gttggcctta caaccctcct tcccaggaag taggaaatta cggagcctga
841 agacatctga tgtctcctgg tgccctgctg actcaggatg gattgtggct accatttggg
901 ccctggtaga accatggaca gcgggttgta cagtctttat ccaccatctg ccacagtttg
961 acaccaaggt catcatacag acattgttga aatacccat taaccacttt tgggggggtat
1021 catctatata tcgaatgatt ctgcagcagg atttcaccag catcaggttc cctgccctgg
1081 agcactgcta tactggcggg gaggtcgtgt tgccaagga tcaggaggag tggaaaagac
1141 ggacgggctc tctgctctac gagaactatg ggcagtcgga aacgggacta atttgtgcca
1201 cctactgggg aatgaagatc aagccgggtt tcatggggaa ggccactcca ccctacgacg
1261 tccaggtcat tgatgacaag ggcagcatcc tgccacctaa cacagaagga aacattggca
1321 tcagaatcaa acctgtcagg cctgtgagcc tcttcattgt ctatgagggt gaccagaga
1381 agacagctaa agtggaatgt ggggacttct acaacactgg ggacagaggt aagatggatg
1441 aagagggcta catttggttc ctggggagga gtgatgacat cattaatgcc tctgggtatc
1501 gcatcgggcc tgcagagggt gaaagcgctt tgggtggagca cccagcggtg gcggagtcag
1561 ccgtgggtgg cagcccagac ccgattcgag gggagggtgt gaaggccttt attgtcctga
1621 cccacagtt cctgtcccat gacaaggatc agctgaccaa ggaactgcag cagcatgtca
1681 agtcagtgac agcccatac aagtaccaa ggaaggtgga gtttgtctca gagctgccaa
1741 aaaccatcac tggcaagatt gaacggaag aacttcgga aaaggagact ggtcagatgt
1801 aatcggcagt gaactcagaa cgcactgcac acctaaaggca aatccctggc cactttagtc
1861 tccccactat ggtgaggacg aggggtggggc attgagagtg ttgatttggg aaagtatcag
1921 gagtgccatg attccaatgt tttccttctt ttaaattaaa ttcagttgct ctgcttctc
1981 caagtcctct gtatctttag aatttcccag gtgagcactc ataacgcaag taataaaata
2041 ctgatatcaa c

```

```

MQWLMRFRTLWGIHKSFHNIHPAPSQLRCRSLSEFGAPRWNDYEVPEEFNFASYVLDYWAQKEKEGKRGPN
PAFWVNGQGDEVKWSFREMGLTRRVANVFTQTCLGQQGDHLALMLPRVPEWWLVAVGCMRTGIIIFIPAT
ILLKAKDILYRLQLSKAKGIVTIDALASEVDSIASQCPSLTKLLVSDHSREGWLDFRSLVKSASPEHTCV
KSKTLDPMVIFFTSGTTGFPKMAKSHGLALQPSFPGSRKLRSLKTSVSWCLSDSGWIVATIWTLVPEWWT
AGCTVFIHHLPPQFDTKVIIQTLLKYPINHFVGWSSIIYRMILQQDFTSIRFPALHCHYTGGEVVLPKQDEEW
KRRTGLLLYENYQSETGLICATYWGMIKPGFMGKATPPYDVQVIDDKGSILPPNTEGNIGIRIKPVRPV
SLFMCYEGDPEKTAKVECGDFYNTGDRGKMDEEGYICFLGRSDDIINASGYRIGPAEVESALVEHPAVALS
AVVGSPDPIRGEVVKAFIVLTPQFLSHDKDQLTKELQQHVKSVTAPYKYPRKVEFVSELPKTIITGKIERKE
LRKKETGQM

```

FIGURA 2

**ALDH3B2** NM\_000695.3 → NP\_000686.2 miembro B2 de la familia 3 de aldehído deshidrogenasa

```

1  accccattga ttaccccatt gccaggcgtg ggcaecgggag ttgggtttggg agctgccagt
61  ctctctgggag gatcgagtc agcagagcag ggctgaggcc tgggggtagg agcagagcct
121 ggcacatctgg aggcagcatg tccaagaaag ggagtggagg tgcagcgaag gacccagggg
181 cagagcccac gctgggatgg accccttcga ggacacgctg cggcggtgc gtgaggcctt
241 caactgaggg cgcacgcggc cggccgagtt ccgggctgcg cagctccagg gcctgggcca
301 ctctcttcaa gaaaacaagc agcttctgcg cgacgtgctg gccaggacc tgcataagcc
361 agcttttcgag gcagacatat ctgagctcat cctttgccag aacgaggtt actacgctct
421 caagaacctg caggcctgga tgaaggatga ascacggtcc acgaacctgt tcatgaagct
481 ggactcggtc ttcatctgga aggaacctt tggcctggtc ctcatcatcg caccctggaa
541 ctacccactg aacctgacce tgggtgctct ggtggggcgc ctgcgcgag ggagtgtcgt
601 ggtgctgaag ccgtcagaaa tcagccaggg cacagagaag gtcttggtg aggtgctgcc
661 ccagtacctg gaccagagct gctttgcgt ggtgctgggc ggacccagg agacagggca
721 gctgctagag cacaagttgg actacatctt cttcacaggg agccctcgtg tgggcaagat
781 tgtcatgact gctgccacca agcacctgac gcctgtcacc ctggagctgg ggggcaagaa
841 cccctgctac gtggacgaca actgcgaccc ccagaccgtg gccaacgcg tggcctggtt
901 ctgctacttc aatgccggcc agacctgcgt ggccctgac tacgtcctgt gcagccccga
961 gatgcaggag aggtgctgc ccgcctgca gagcaccat acccgtttct atggcgacga
1021 cccccagagc tccccaaacc tgggcgcgt catcaaccag aaacagttcc agcggtgcg
1081 ggcattgctg ggctgcggcc gcgtggccat tgggggcccag agcaacgaga gcgatcgcta
1141 catgcccccc acggtgctgg tggacgtgca ggagacggag cctgtgatgc aggaggagat
1201 ctctggggccc atcctgccc tctgtaacgt gcagagcgtg gacgaggcca tcaagttcat
1261 caaccggcag gagaagcccc tggccctgta cgccttctcc aacagcagcc aggttgtgaa
1321 ccagatgctg gagcggacca gcagcggcag ctttgagggc aatgagggt tcaactacat
1381 atctctgctg tccgtgccat tccggggagt cggccacagt gggatgggccc ggtaccacgg
1441 caagttcacc ttgcacacct tctcccacca ccgcacctgc ctgctgcgcc cctccggcct
1501 ggagaaatta aaggagatcc actaccacc ctataccgac tggaaaccagc agctgttacg
1561 ctggggcatg ggctcccaga gctgcacct cctgtgagcg tcccaccgc ctccaacggg
1621 tcacacagag aaacctgagt ctagccatga ggggcttatg ctcccactc acattgttcc
1681 tccagaccgc aggttcccc agcctcaggt tgctggagct gtcacatgac tgcactctgc
1741 ctgccagggc tgcaaagcaa ggtcttgct ctatctgggg gacgtgctc gagagaggcc
1801 aagaggccgc agaactgcc aggtgtctc actacccca cctcccca ttccagccct
1861 ttgccctctc ggtcagggtt ggccaggccc agtcacaggg gcagtgtcac cctggaaaat
1921 acagtgcct gccttcttag gggcatcagc cctgaacggt tgagagcgtg gagccctcca
1981 ggcctttgct ctcccctcta ggcacacgc cacttccatc tctgccccat cccaactgca
2041 ccagcactgc ctccccagg gatcctctca catcccacac tggctctctgc accaccctc
2101 tggttcacac cgcacctgc actcaccac agcagctcca tccactggga aaactgggt
2161 ttgcatcact ccaactgcac gtgttagtgg gacctgggg caagtccctt gacttctctg
2221 agcctcagtt tccttatgtg aaagttgctg gaacccaaat ggagtcactt atgccaaact
2281 ctaataaaat ggagtcgggg ggccacatag aagccctcac acacacatgc ccgtaacagg
2341 atttatcaca agacacgcct gcatgtagac cagacacagg gcgtatggaa agcacgtcct
2401 caagactgta gtattccaga tgagctgcag atgcttacct accacggccg tctccaccag
2461 aaaaccatcg ccaactcctg cgatcagctt gtgacttaca aacctgtttt aaaagctgct
2521 tacatggact tctgtccttt aaaagcttcc ccttggtgtg ggccctctgt gtatgctgtg
2581 gatccttcca agcactcata gccagatag gaatcctctg ctctcccaa ataaattcat
2641 ctgttctgga aaaaaaaaaa

```

MKDEPRSTNLFMKLDSVFIWKEPFGVLVLIAPWNYPLNLTLLVLLVGLAAGSCVVLKPSEISQGTKEVLAE  
 VLPQYLDQSCFAVVLGGPQETGQLEHKLDIFFTGSPRVGKIVMTAATKHLTPVTLELGGKNPCYVDDNC  
 DPQTVANRVAWFCYFNAGQTCVAPDYVLCSPQMQRLLPALQSTITRFYGDDPQSSPNLGRINQKQFQRL  
 RALLGCGRVAIGGQSNESDRYIAPTIVLDVQETEPVMQEEIFGPILPIVNVQSVDEAIKFINRQEKPLALY  
 AFSNSSQVNVQMLERTSSGSFGGNEGFTYISLLSVFPFGGVGHSGMGRYHGKFTFDTFSHRTCLLAPSGLE  
 KLKEIHYPPTYDWNQQLLRWGMGSQSCTLL

## FIGURA 3

**CGREF1** NM 006569.5 → NP 006560.3 regulador de crecimiento celular con isoforma a de proteína 1  
del dominio mano EF

```

1  cacacgcgca cactcacacg ggcgcgcgca gcccctccgg ccgcggggcg agcggggggcg
61  ctggtggagc tgcgaagggc caggtccggc gggcgggggc gcggctggca ctggctccgg
121 actctgcccg gccagggcg cggctccagc cgggagggcg acgtggagcg gccacgtgga
181 gcggcccggg ggaggctggc ggcgggaggg gaggcgcggg cggcgagca gccaggagcg
241 cccacggagc tggacccccca gagccgcgcg gcgcgcgagc agttccagga aggatgttac
301 ctttgacgat gacagtgtta atcctgctgc tgcctcccac gggtcaggct gcccacaaag
361 atggagtcac aaggccagac tctgaagtgc agcatcagct cctgcccac cccttcagc
421 caggccagga gcagctcgga cttctgcaga gctacctaaa gggactagga aggacagaag
481 tgcaactgga gcatctgagc cgggagcagg ttctcctcta cctctttgcc ctccatgact
541 atgaccagag tggacagctg gatggcctgg agctgctgtc catgttgaca gctgctctgg
601 cccctggagc tgccaactct cctaccacca acccgggtgat cttgatagtg gacaaagtgc
661 tcgagaccca ggacctgaat ggggatgggc tcatgacccc tgctgagctc atcaacttcc
721 cgggagtagc cctcaggcac gtggagcccg gagagcccct tgctccatct cctcaggagc
781 cacaagctgt tgggaaggcag tcctatttag ctaaaagccc attaagacaa gaaacacagg
841 aagcccctgg tcccagagaa gaagcaaagg gccaggtaga ggccagaagg gagtctttgg
901 atcctgtcca ggagcctggg ggccaggcag aggtgatgg agatgttcca gggcccagag
961 ggggaagctga gggccaggca gaggtctaaag gagatgcccc tgggcccaga ggggaagctg
1021 ggggccaggc agaggctgaa ggagatgccc ccgggcccag aggggaagct gggggccagg
1081 cagaggctga aggagatgcc cccgggcccga gaggggaagc tgggggccag gcagaggcca
1141 gggagaatgg agaggaggcc aaggaaactt caggggaac actggagtct aagaacaccc
1201 aaaatgactt tgaggtgcac attgttcaag tggagaatga tgagatctag atcttgaaga
1261 tacaggtacc ccacgaagtc tcagtgccag aacataagcc ctgaagtggg caggggaaat
1321 gtacgtggg acaaggacca tctctgtgcc cctgcctgg tcccagtagg tatcaggtct
1381 tctctgtcag ctcagggaga ccctaagtta aggggcagat taccaataaa gaactgaatg
1441 aattcatccc cccggccacc tctctaccgg tccagcctgc ccagaccctc tcagaggaac
1501 ggggttgggg accgaaagga cagggatgcc gctgcccag tgtttctggg cctcacggtg
1561 ctccggcagc agagcgcag gtgctagcca tggccggctg cagaggacc agtgaggaaa
1621 gctcagtcta tccctgggcc ccaaaccctc accggttccc cctcacctgg tgttcagaca
1681 ccccatgctc tctgcagct cagggcaggt gaccccatcc ccagtaatat taatcatcac
1741 tagaactttt tgagagcctt gtacacatca ggcacatgc tgggcatttt atatatgatt
1801 ttatcctcac aataattctg tagccaagca gaattggttc catttgacag atgaagaaat
1861 tgaggcagat tgcgttaagt gctgtaccct aaggatgat gcagctaatt aaatggcaga
1921 tttgaatcca aaaa

```

MLPLTMTVLILLPTGQAAPKDGVTTRPDSEVQHQLLPNPFQPGQEQLGLLQSYLKGLGRTEVQLEHLSRE  
QVLLYLFAHLDYDQSGQLDGLLELLSMLTAALAPGAANSPTTNPVILIVDKVLETQDLNGDGLMTPAELINF  
PGVALRHVEPGEPLAPSPQEPQAVGRQSLAKSPLRQETQEAPGPREEAKGQVEARRESLDPVQEPGGQAE  
ADGDVPGPRGEAEGQAEAKGDAPGPRGEAGGQAEAEAGDAPGPRGEAGGQAEAEAGDAPGPRGEAGGQAEARE  
NGEEAKELPGETLESKNTQNDFEVHIVQVENDEI

**FIGURA 4****COMP** NM 000095.2 → NP 000086.2 precursor de la proteína de matriz oligomérica del cartílago

```

1  agaaagcgag cagccaccca gctccccgcc accgccatgg tccccgacac cgcttgcgtt
61  cttctgctca ccctgggtgc ctcgggcgcg tccggacagg gccagagccc gttgggctca
121  gacctggggc cgcagatgct tcgggaactg caggaaacca acgcggcgct gcaggacgtg
181  cgggagctgc tgcggcagca ggtcagggag atcacgttcc tgaaaaacac ggtgatggag
241  tgtgacgcgt gcgggatgca gcagtcagta cgcaccggcc taccagcgct gcggccctg
301  ctccactgcg cgcccggctt ctgcttcccc ggctggcctt gcatccagac ggagagcggc
361  gcgcgctgcg gcccctgccc cgcgggcttc acgggcaacg gctcgactg caccgacgtc
421  aacgagtgca acgcccaccc ctgcttcccc cgagtcgctt gtatcaacac cagcccgggg
481  ttccgctgcg aggcttgccc gccgggggtac agcgggccca cccaccaggg cgtggggctg
541  gctttcgcca aggccaacaa gcaggtttgc acggacatca acgagtgtga gaccgggcaa
601  cataactgcg tccccaaact cgtgtgcata aacaccgggg gtccttcca gtgcggcccg
661  tgccagcccc gcttcgtggg cgaccaggcg tccggtgccc agcggcgcgc acagcgcttc
721  tgccccgacg gctcgcccag cgagtgcac gagcatgcag actgcgtcct agagcgcgat
781  ggctcgcggt cgtgcgtgtg tgccgttggc tgggcccggc acgggaccc tctgtgtcgc
841  gacactgacc tagacggctt cccggacgag aagctgcgtt gcccgagcgc ccagtgcctg
901  aaggacaact gcgtgactgt gcccaactca gggcaggagg atgtggaccg cgatggcatc
961  ggagacgcct gcgatccgga tgccgacggg gacgggggtc ccaatgaaaa ggacaactgc
1021  ccgctggtgc ggaaccacga ccagcgcaac acggacgagg acaagtgggg cgatgcgtgc
1081  gacaactgcc ggtcccagaa gaacgacgac caaaaggaca cagaccagga cggccggggc
1141  gatgcgtgcg acgacgacat cgacggcgac cggatccgca accaggccga caactgccct
1201  agggtagcca actcagacca gaaggacagt gatggcgatg gtatagggga tgctgtgac
1261  aactgtcccc agaagagcaa cccggatcag gcggatgtgg accacgactt tgtgggagat
1321  gcttgtgaca gcgatcaaga ccaggatgga gacggacatc aggactctcg ggacaactgt
1381  cccacggtgc ctaacagtgc ccaggaggac tcagaccacg atggccaggg tgatgcctgc
1441  gacgacgacg acgacaatga cggagtccct gacagtccgg acaactgccg cctggtgcct
1501  aaccccggcc aggaggacgc ggacagggac ggcgtggggc acgtgtgcca ggacgacttt
1561  gatgcagaca aggtggtaga caagatcgac gtgtgtccgg agaactgta agtcacgctc
1621  accgacttca gggccttcca gacagtctgt ctggaccggg aggggtgacg gcagattgac
1681  cccaactggg tgggtgtcaa ccagggaagg gagatcgtgc agacaatgaa cagcgaccca
1741  ggctggtgct tgggttacac tgcttcaat ggcgtggact tcgagggcac gttccatgtg
1801  aacacggtca cggatgacga ctatgcgggc ttcatctttg gctaccagga cagctccagc
1861  ttctacgtgg tcatgtggaa gcagatggag caaacgtatt ggcaggcgaa ccccttccgt
1921  gctgtggccg agcctggcat ccaactcaag gctgtgaagt cttccacagg ccccggggaa
1981  cagctgcgga acgctctgtg gcatacagga gacacagagt cccaggtgcg gctgctgtgg
2041  aaggacccgc gaaacgtggg ttggaaggac aagaagtcct atcgttggtt cctgcagcac
2101  cggccccaag tgggtacat cagggtgcga ttctatgagg gccctgagct ggtggccgac
2161  agcaacgtgg tcttgacac aacctgcgg ggtggccgcc tgggggtctt ctgcttctcc
2221  caggagaaca tcattctggc caacctgcgt taccgctgca atgacacat cccagaggac
2281  tatgagaccc atcagctgcg gcaagcctag ggaccagggt gaggacccgc cggatgacag
2341  ccaccctcac cgcggtgga tgggggtct gcacccagcc ccaaggggtg gccgtcctga
2401  gggggaagtg agaagggtc agagaggaca aaataaagtg tgtgtgcagg gaaaaaaaaa
2461  aaaaaaaaaa a

```

MVPDTACVLLLTALAALGASGQGQSPLGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVREITFLKNTVMECD  
ACGMQQSVRTGLPSVRPLLHCAPGFCFPGVACIQTESGARCGPCPAGFTGNGSHCTDVNECNHPCFPRVR  
CINTSPGFRCEACPPGYSGPTHQGVGLAFKANKQVCTDINECETGQHNCVPNSVCINTRGSFQCGPCQPG  
FVGDQASGCQRRARFCPDGSPSECHEHADCVLERDGSRSVCVAVGWAGNGLCGRDTDLGDFPDEKLRCF  
ERQCRKDNVCVTPNSGQEDVDRDGIGDACPDADGDGPVNEKDNCPVLRNPDQRNTDEDKWDGACDNCRSQ  
KNDDQKDTDDQDGRGDACDDDDIDGDRIRNQADNCPVPSDQKDSGDGIGDACDNCPSNPDQADVDHDF

VGDACDSQDQDGDGHQDSRDNCPTVPNSAQEDSDHDGQG DACDDDDNDGVPDSRDNCRLVPNPGQEDAD  
RDGVGDVCQDDFDADKVVDKIDVCPENAEVTLTDFRAFQTVVLDPEGDAQIDPNWVVLNQGREIVQTMNSD  
PGLAVGYTAFNGVDFEGTFHVNTVTDDDYAGFIFGYQDSSSFYVVMWKQMEQTYWQANPFRAVAEPIQLK  
AVKSSTGPGEQLRNALWHTGDTESQVRLWKP RNVGWKDKKSYRWFLQHRPQVGYIRVRFYEGPELVADS  
NVVLDTTMRGGRLGVFCFSQENIIWANLRYRCNDTIPEDYETHQLRQA

**FIGURA 5****C19orf48** NM\_199249.1 → NP\_954857.1 proteína multirresistente

```

1  tgaaatgggg tttcccaaac aggcgtgtgt attggacgcc tcggggcggag cgcggggctgg
61  cgccgaggac cggccttgcg agcggcgcg c actataaaat ggcgcgctgct gcaacccgcg
121 cccgcttcgg agagagaaat gctgggagac agggtttcac catattggcc aggcctggtct
181 cgaactcctg acttcgtgat ctgccacact cggcttccca aagtgtctgag gttgcaggcg
241 tgagccaccg tgcccggccg cgtttcctac tctttaagct ctgttagctt ggctctgtc
301 cctgaagggtg cagcttcaag cttaggacca cccaccatgc ctatccaggt gctgaagggc
361 ctgaccatca ctcattaaga acagaggagg ctgcctgtta ctctggtgtg tgcacccctc
421 cagacactct gctgtttcct gcctaggcgt ggctgcagcc atggctagga aagcgtgccc
481 acccaccac ctgggccaga gctgggtctg ctctgctgc agggacactg agctggctat
541 ctcggcgctt cgggcaagaa ctgcaacagg ctctcctggg tcctgcaggt gtacagccgg
601 gccctgcct tgtgcctcag ctctcgagag ctgctgctgc cgggtgacct gatccaaact
661 gataaggtgc catcttcagc taccactgca aggcctgag ggcaacagca gcacggcact
721 gccaccccg ctgctgatgg cctgggtgcc gctgggagtc ctccggcac ttcgaggcca
781 ctgagccacc cttccagccc cagcccacca tggacagggg tatccagctt cctcctcaac
841 ctcgctcctc gccctgagc cagtgcagcc caaggacatg cctgttacc aggtcctgta
901 ccagcactag ctgggtcaagg gcatgacagt gctggaggcc gtcttggaga tccaggccat
961 cactggcagc aggcctgctc ccatggtgcc agggcccgcc aggccaccag gctcatgctg
1021 ggacccaacc cagtgcacaa ggacttggtc gctgagccac acaccagga gaaggtggat
1081 aagtgggcta ccaagggtt cctgcaggct aggggaggag ccaccccgcc ttcctattg
1141 tgaccaggcc tatggggagg agctgtccat acgccaccgt gagacctggg cctggctctc
1201 aaggacagac accgctggc ctggtgctcc aggggtgaag caggccagaa tcctggggga
1261 gctgctcctg gtttgagctg cattcaggaa gtgcgggaca tggtagggga ggcaaaaagc
1321 cttgggcact accctccctg tggagctgtt cgggtgtccg cgagctagcc acaccctgac
1381 accatgttca agggtagcgg aagagaaggg tgtctgcccc caacctcccc tgtgggtgtc
1441 actggccaga tgtcatgagg gaagcaggcc ttgtgagtgg aactgacca tgagtccttg
1501 gggggagtga tccccaggc atcgtgtgcc atgttgact tctgccagg cagcagggtg
1561 ggtgggtacc atgggtgcc accctccac cacatggggc cccaaagcac tgcaggccaa
1621 gcagggaac cccacaccct tgacataaaa gcatctgaa gcttttaaaa aaaaaaaaaa
1681 aaaaaaaaaa aa

```

MTVLEAVLEIQAITGSRLLSMVPGPAPPPGSCWDPTQCTRTWLLSHTPRRRWISGLPRASCRLGEEPPPLP  
YCDQAYGEELSIRHRETWAWLSRTDTAWPGAPGVKQARILGELLV

**FIGURA 6****DLX1** NM 178120.4 → NP 835221.2 isoforma 1 de la proteína homeosecuencia DLX-1

```

1 aagctttgaa ccgagtttgg ggagctcagc agcatcatgc ttagactttt caaagagaca
61 aactccattt tcttatgaat ggaaagttaa aaccctgtt ccgcttaaat tgggttcctt
121 cctgtcctga gaaacataga gacccccaaa agggaagcag aggagagaaa gtcccacacc
181 cagaccccg c gagaagagat gaccatgacc accatgccag aaagtctcaa cagccccgtg
241 tcgggcaagg cgggtgtttat ggagtttggg ccgccaacc agcaaagtgc tcttctccc
301 atgtccacg ggcactactc catgactgtt ttacactcgg cgggccattc gcagcccagc
361 ggcgcctaca gctcagcctc gtccttctcc cgaccgtgg gctaccctta cgtcaactcg
421 gtcagcagcc acgcattccg cccctacatc agtccgtgc agtccctacc gggcagcgcc
481 agcctcgccc agagccgccc ggaggacca ggggcggact cggagaagag cagcgtgtg
541 gaaggcggtg aagtgcgctt caatggcaag ggaaaaaaga tccgtaaacc caggacgatt
601 tattccagtt tgcagttgca ggctttgaac cggaggttcc agcaaactca gtacctagct
661 ctgcgggaga gggcgaggct cgcggcctct ttgggactca cacagactca ggtcaagatc
721 tggttccaaa acaagcgatc caagttcaag aagctgatga agcaggggtg ggcggctctg
781 gagggtagtg cgttgccaa cggtcgggcc ctgtctgtg gctccccacc cgtgccgcc
841 ggctggaacc ctaactcttc atccgggaag ggctcaggag gaaacgcggg ctctatatc
901 cccagctaca catcgtggtt ccttcagcg caccaagaag ctatgcagca accccaactt
961 atgtgaggtt gccgcgccgt ctccttcttg tctccccggc ccaggtccct cccgcctcca
1021 ggtccatcca tcccgctccg aaaagaagga cccagaggga agaaggaaca gtggaggcgg
1081 gacgcctcc atctcctcgg agccccgcga ggtccggccc agcaacttcc cggcatccgc
1141 gctctagcct gaacctggc ctgggcccag cagtggcagc agagagtggc ctggaggga
1201 agccactgcc acctgagaca gcccaagcag caagataaac ccgctccacc cgaccgcgcg
1261 accttcagct ttgtgggact atcaggaaaa aacaaaaaca aaacaaaatg tagaaaaagc
1321 aaaagctctt ttctgtcctg tcagtctcct gtctcctttt gctctgtctg tgcgtggtt
1381 aagtccaggt cctcatccgt ccgctgtcct cattctgcgg cctcagcaaa aagccacaag
1441 gtctgagcgg ccgggtcct gccgggctga ccatctccgg atcctgggac actctgcctg
1501 accatctgtg tagctggtgt gggaaatctg gggcattgga gggaggggtt tttatttatt
1561 gagaaatgga cttcgcctga ggctgtttgc caattcaggg ttctgtcggg cgcaaggaa
1621 gcaactgttc aacgcactgt ttactttaag cgcacgggga gaaacgaata aggaggacgt
1681 ggtgattttt aattttataca gtaacttttg tacttctctg gtatggagag tttggagccg
1741 aatgattttg attttttaca tgtccgacat tatttaataa ataattttta aaagaaaaga
1801 acgataaatg aagccaacat gattttctca tttcgggagg aactctgttg cttcgcctgg
1861 acaagaagga aaatgctgat ttcctccttg ggtagaaaga gggagcgagg gcaaatgggg
1921 agtagagaga aaacaggcga gaacaagcac tctaattcca gtgggcttta aaataagaca
1981 aaatcagctt tacaacaatc cctagaggct cgaccacaga ataatgccag tcaccacctt
2041 gaacgcacaa tctccagtgc aggatctaata gactgtacat attattgtta ttattattat
2101 tgttattatt gttgttctgt aaacatgttg cacaagctta gcctttttgc gttctgttgt
2161 gtgtggctgt aaaaccccat gctttgtgaa atgagaatct tgacattttt cttgtgaaat
2221 ttggaatatg tgatcaattg aaatcaactg tgttttgtgt tctctatgtc aaagttagt
2281 ttatatattg gaatgttaac ttattgcttt gtatcttggg aaaaaaactt tgtaaataag
2341 ttataaagtt tctttgagac agtaaaatta tgatttcttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2401 aaa

```

MTMTTNPESLNSPVSGKAVFMEFGFPNQMSPPMSHGHYSMHCLHSAGHSQPDGAYSSASSFSRPLGYP  
YVNSVSSHASSPYISSVQSYPGSASLAQSRLEDPGADSEKSTVVEGGEVRFNGKGGKIRKPRTIYSSLQL  
QALNRRFQQTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNKRSKFKKLMKQGGAALEGSALANGRLSAGSP  
PVPPGWNPNSSSGKSGGNAGSYIPSYTSWYPSAHQEAMQQPQLM

**FIGURA 7****GLYATL1 NM\_080661.2 → NP\_542392.2** proteínaseudoglicina N-aciltransferasa 1

```

1 agtgttgccc aatcccagca gccatacttc aactactcat agactgctga atgttcaaac
61 tgtgttcaaa taagatggtg tcacaagaag gatctgaagt ggagcttcta gtatccccag
121 gagcgcgaag tgaacacgga aggtacctgc aggatccaat tgtgtccatt gatctctcag
181 agtggctgag gataatagag tttcttcttc aaggtctcaa ggtgtatggc tctgtgtatc
241 acatcaatca cgggaacccc ttcaacatgg aggtgctggt ggattcctgg cctgaatatc
301 agatgggttat tatccggcct caaaagcagg agatgactga tgacatggat tcatacacia
361 acgtatatcg tatgttctcc aaagagcctc aaaaatcaga agaagttttg aaaaattgtg
421 agatcgtaaa ctggaaacag agactccaaa tccaaggtct tcaagaaagt ttaggtgagg
481 ggataagagt ggctacattt tcaaagtcag tgaaagtaga gcattcgaga gcactcctct
541 tggttacgga agatattctg aagctcaatg cctccagtaa aagcaagctt ggaagctggg
601 ctgagacagg ccaccagat gatgaatttg aaagtgaaac tcccaacttt aagtatgccc
661 agctggatgt ctcttattct gggctggtaa atgacaactg gaagcgaggg aagaatgaga
721 ggagcctgca ttacatcaag cgtgcatag aagacctgcc agcagcctgt atgctcggcc
781 cagagggagt cccggtctca tgggtaacca tggacccttc ttgtgaagta ggaatggcct
841 acagcatgga aaaataccga aggcagggca acatggcacg agtgatggtg cgatacatga
901 aatatctgcg tcagaagaat attccatttt acatctctgt gttggaagaa aatgaagact
961 cccgcagatt tgtggggcag tttggtttct ttgaggcctc ctgtgagtgg caccaatgga
1021 cttgctaccc acagaatcta gttccatttt agacaatgaa gctgcttagt aatctctgcc
1081 aagccatctc ttaatatata agcagacacc acagaataga tttcttctact tacaatatga
1141 tattgggcac ttataatata gcaggaaactc ttctcacctg gagccttgat gttaaaagac
1201 acagccatgc tcttgaggag cttacaatcc tggctggagg caggggaggg tatattcttt
1261 aaatatgctt aagtgttata gggaaagacg gggttaccag taaacatgta actagaaaagc
1321 caggctcagt tcttacctct gggaaatcaga actctttatg caacttggtt aatagaatct
1381 actatctgga agataaatga aggattttaa taaaattttc aatagaataa acctaatctg
1441 tatggatact ttatcaaaaa tgaatgtccc tgctattttc ggatttatga ggcaatggta
1501 cactaaagaa tggaaatcagt tcagtgaagta gaaaggtatc caaggtgaag cctgagacga
1561 atggctttcc caggctacct tccatcactg ttgtacagaa aagaaatcca gagaatcaaa
1621 tggactggcc ttgggggtct ctgctatgga aatgccattt tttgtgtctc ctttctccta
1681 ctctttctca catcctcttc atgattgaag catggcacaa ggcaaggtgt tgccctgcag
1741 tctggttgta agttcagcct ttggtgtttg cactactgct atcataaggg gtcagggaca
1801 ttccggggag aagtgaccac taaggtgagg attagagagt gagtagaagt gagccagaca
1861 aaaaaagcag aaaatgcaga tgatggaaag gacatgtgcc atgcactatc ataagaactt
1921 cctaactgaa cactgatact acaattctga atccctgatc ttaaaaaata attatacttc
1981 accaacaaaa cttggcctct tttggttcca ctctgccacc ctgccattgg aacttggatt
2041 actgtgaaca ttgcagctat agcaaaat

```

```

MFKLCSNMVSQEGSEVELLVSPGARSEHGRYLQDPIVSIDLSEWLRIIEFLQLGLKVYGSVYHINHGPNF
NMEVLVDSWPEYQMVIIRPQKQEMTDDMSYTNVYRMFSKEPQKSEEVLNCEIVNWKQRLQIQGLQESLG
EGIRVATFSKSVKVEHSRALLLVTEIDILKLNASSKSKLSWAETGHPDDEFESETPNFKYAQLDVSYSGLV
NDNWKRGKNERSLHYIKRCIEDLPAACMLGPEGVPVSWVTMDPSCEVGMAYSMEKYRRTGNMARVMVRYMK
YLRQKNIPFYISVLEENEDSRRFVGQFGFFEASCEWHQWTCYPQNLVPF

```

**FIGURA 8****MS4A8B** NM\_031457.1 → NP\_113645.1 miembro 8B de la subfamilia A con 4 dominios

que cubre la membrana

```

1 aaacaggaaa taaatacgaa tgaaactgag ctctaagcag catgtaacct ggccctgcac
61 caggaaatag aggacttcgg atccttctaa ccctaccacc caactggccc cagtacattc
121 attctctcag gaaaaaaaaa aaggtcccca cagcaaagaa aaggaatagg atcaagagat
181 acgtggctgc tggcagagca agcatgaatt cgatgacttc agcagttccg gtggccaatt
241 ctgtgttggt ggtggcacc cacaatggtt atcctgtgac ccaggaatt atgtctcacg
301 tgccctgta tccaaacagc cagccgcaag tccacctagt tctgggaac ccacctagt
361 tgggtgctgaa tgtgaatggg cagcctgtgc agaaagctct gaaagaaggc aaaaccttgg
421 gggccatcca gatcatcatt ggccctggctc acatcgccct cggctccatc atggcgacgg
481 ttctcgtagg ggaataacct tctatttcat tctacggagg ctttcccttc tggggaggct
541 tgtggtttat catttcagga tctctctccg tggcagcaga aaatcagcca tattcttatt
601 gcctgctgtc tggcagtttg ggcttgaaca tcgtcagtgc aatctgctct gcagttggag
661 tcatactctt catcacagat ctaagtattc cccaccata tgcctacccc gactattatc
721 cttacgcctg ggggtgtgaac cctggaatgg cgatttctgg cgtgctgctg gtcttctgcc
781 tcttgaggtt tggcatcgca tgcgcattc cccactttgg ctgccagttg gtctgctgtc
841 aatcaagcaa tgtgagtgtc atctatccaa acatctatgc agcaaaccga gtgatcacc
901 cagaaccggg gacctacca ccaagttatt ccagtgaat ccaagcaaat aagtaaggct
961 acagattctg gaagcatctt tctctgggac caaaagaagt cctcctccct ttctgggctt
1021 ccataaccca ggtcgttctt gttctgacag ctgaggaaac gtctctccca ctggttgtag
1081 tctcaccttc attcttcaat tcagtctagg aaaccatgct gtttctctat caagaagaag
1141 acagagattt taaacagatg ttaaccaaga gggactccct agggcacatg catcagcaca
1201 tatgtgggca tccagcctct ggggccttgg cacacacaca ttcgtgtgct ctgctgcatg
1261 tgagcttgtg ggttagagga acaaatatct agacattcaa tcttactctt ttcaattgtg
1321 cattcattta ataaatagat actgagcatt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

```

MNSMTSAVPVANSVLVAPHNGYPVTPGIMSHVPLYPNSQPQVHLVPGNPPSLVSNVNGQPVQKALKEGKT
LGAIQIIIGLAHIGLSIMATVLVGEYLSISFYGGFPFWGGLWFIISGSLSVAAENQPYSYCLLSGSLGLN
IVSAICSAVGVLFITDLSIPHPYAYPDYYPYAWGVNPGMAISGVLLVFCLEFGIACASSHFGCQLVCCQ
SSNVSVIYPNIYAANPVITPEPVTSPPSYSSEIQANK

```

**FIGURA 9**

**NKAIN1** NM\_024522.2 → NP\_078798.2 proteína 1 interactuante con subunidad beta-1 de ATPasa transportadora de sodio/potasio

```

1  agtgcctgctc tgcgcctgcgc cgcgcctcggg gctcgcctctc cttgcctccgc gctccccgcc
61  agccgcgcccg gggcaggagg cgcgcctgac ggacggcccg ctagacaaag gaggcgcggc
121  tcggcggggc cagcgcgcggc acggacggac catggactcg gagcgcgggc ggccggcccc
181  agccttgggg accggacact cccgggcccc gccctaggcg cccggccccg ccgcccggcg
241  cggccagcgg ggaggacgtg gagcccgcg cgcgcgagca ggccggcgcc gcgagcaag
301  aagggcgccg cggcgtgcgg cccgcgcagc ccccgagacc atgggcaagt gcagcgggcg
361  ctgcacgtcg gtcgccttct gctgcctgca gctgggtggt ggcgtggagc ggcagatctt
421  tgacttctcg ggctaccagt gggtcccat cctagccaac ttcctgcaca tcatggcagt
481  catcctgggc atctttggca ccgtgcagta ccgtcccg taccctatcc tgtatgcagc
541  ctggctggtg ctctgggttg gctggaatgc atttatcatc tgcttctact tggaggttgg
601  acagctgtcc caggaccggg acttcatcat gaccttcaac acatccctgc accgctcctg
661  gtggatggag aatgggccag gctgcctggt gacacctgtt ctgaactccc gcctggctct
721  ggaggaccac catgtcatct ctgtcactgg ctgcctgctt gactaccctt acattgaagc
781  cctcagcagc gccctgcaga tcttccctgg actgttcggc ttcgtgttcg cctgctacgt
841  gagcaaagtg ttcctggagg aggaggacag ctttgacttc atcggcggct ttgaactcta
901  cggataccag gcgccccaga agacgtcgca ttacagctg cagcctctgt acacgtcggg
961  gtgcctctcg ccccgcgccc acccgggcgc ctgcctctgg gctgaccgca gctgcgcgca
1021  gctcgggcca aggcgcaggc gtgtccccc cgtggcccg cgcctcactg cagcctgtgc
1081  ccaaccccg cgtctgcatct ggagatgcgg acttgacgt ggacttgga cttggacttg
1141  atttgagctt ggctcttcgc agcccgga ctcggaggag gggcggggc gggggagggg
1201  caccacgggt tttttgttt ttgtttgttt gtttttaac tcagccttgg cgtgagctgg
1261  ggcttctctc tcttctccag cctctccct tcactcttca cccagcatcc tgccccctg
1321  tccaaaaaca gcaggacatc agaccatcc catcccacca cactcactca ccagctctgg
1381  ggaaagctac tgtgaactag gagcaggatt cctgggttct aatcgcaggt ccactactga
1441  ctgtgacgtc tagcaaagcc cttgcctct ctgagcctcg gtttccgcac ctcaagtaat
1501  taatccctta gcaaatggac tcttttagac ttctcattta actcaattcc ctgagctaga
1561  ctgggattaa aattctcatt ttgcagtaca ttaaaactga ggccagaga tgtgatttgc
1621  ttgaggccac acagctagat ttttggtgga agtgggcctt gaacacagt tactttctgc
1681  agtttctgac tgtaaaacc agtgtctgct ctctgagttc catttccaag cccccctcca
1741  tcttggaact atgtggtctc caccatattc acacaccacc accaccactt gccaatgcct
1801  ctcttaaagc aatataccca ttcgttctct tattgggaac tggatggatg aagcccaaaa
1861  ttcagcccca cccacagaga agccttctca cactcagcct ctgtccacc ttggcaaata
1921  tttcaagctc tctcctccag gaaagtgggg ccccaactca gtcactccac ccccttccag
1981  gtccctgagg ctggttctac tgtatcccca tcacctccac aactccact acccctgacg
2041  gctccatcca cctcaccagt tgggaaggct gtggtttcag agaggagcaa tgcgtggtcag
2101  cgctgcccag actccagtgt ttacagatca ccagcattta caaccaatcc aatggccaga
2161  agcctcctct aacaagccca gaaggagtct tgaaggggca gatgggggtg tgagttagtgc
2221  gggagtcggg attgccagca cctcaccct tccttggggg caagtagagg tgagaacact
2281  tccccacct cctccacag acactcctga ggacgtgca tcccacgcac tgccctggtg
2341  gtccatagag agaggatcag gtctcagcat ttcactctgt aaagaggcat ggccctgggt
2401  tagaaaggag ggcaggagac atggaggaa cttgggggac ccagatggtg cagatggttt
2461  gcacacctga gcctgtctgt ggtgaccatt ccgtcctct cccactacc tccaatctat
2521  cattccctac tctctaaggc caaaatatcc tgagcaaggc tggcaacccc accccacct
2581  cccaaatgca agcagccagg cccaggagtt cctctggccc ccacaggcat ggagctccca
2641  gctggtgggt acagcttgag aggggggcag ctccctcagg ctaagctact gcccttact
2701  gggccagccc tgctccagc cctcacctct ctcaccccaa ctctccccc agccccctt
2761  tactcaacgg gtgtagccac tgggtgcttg aagccttttg tttttataag atgggttttg
2821  caaggggacc aggttctctt ttcactggga ccttgcaagg aggggagtg cctcctggtt
2881  tctgtgcagg cgggttgatt aaagatggtg ttttcttctc taaaaaaaaa

```

MGKCSGRCTLVAFCCCLQLVAALERQIFDFLGYQWAPILANFLHIMAVILGIFGTQYRSRYLILYAAWLVL  
WVGWNAFIICFYLEVQLSQDRDFIMTFNTSLHRSWWMENGPCLVTPVLNSRLALEDHHVISVTGCLLDY  
PYIEALSSALQIFLALFGFVFACYVSKVFLEEEDSFDFIGGFDSYGYQAPQKTSHLQLQPLYTSG

FIGURA 10

**PPFIA2 NM\_003625.2 → NP\_003616.2** proteína (liprin) alfa 2 interactuante con polipéptido receptor tipo f (PTPRF) de la proteína tirosina fosfatasa PPFIA2

```

1  gaggcaagtg aggagagaag atgctgtagc gtcctcaccg gctgccagca gggaaatggt
61  ccaggagtgc tgggtgtgag cctcccttct cctcaagccg gagactgcgg ttgtcattga
121 tcaattgaag aagcaaggac ccgaaatcac agacattagc aatgatgtgt gaagtgatgc
181 ccacgattaa tgaggacacc ccaatgagcc aaaggggggc ccaaagcagt ggctcggact
241 cagactccca ttttgagcag ctgatgggtga atatgctaga tgaaagggat cgtcttctag
301 acacccttcg ggagacccag gaaagcctct cacttgccca gcaaagactt caggatgtca
361 tctatgaccg agactcactc cagagacagc tcatttcagc cctgccacag gatatcgaat
421 ccctaacagg agggctggct gggtctaagg gggctgatcc accggaattt gctgcactga
481 caaaagaatt aaatgcctgc aggaacaac ttctagaaaa ggaagaagaa atctctgaac
541 ttaaagctga aagaacaac acaagactat tactggagca tttggagtgc cttgtgtcac
601 gacatgaaag atcactaaga atgacggtgg taaaacggca agcccagtct cctcaggag
661 tatccagtga agttgaagtt ctcaaggcac tgaaatcttt gtttgagcac cacaaggcct
721 tggatgaaaa ggtaaggagg cgactgaggg tttctttaga aagagtctct gcactggaag
781 aagaactagc tgctgcta atcaggagattg ttgccttgcg tgaacaaaat gttcatatac
841 aaagaaaaat ggcacaaagc gagggatcca cagagtcaga acatcttgaa gggatggaac
901 ctggacagaa agtccatgag aagcgtttgt ccaatgggtc tatagactca accgatgaaa
961 ctagtcaaat agttgaacta caagaattgc ttgaaaagca aaactatgaa atggcccaga
1021 tgaaagaacg tttagcagcc ctttcttccc gagtgggaga ggtggaacag gaagcagaga
1081 cagcaagaaa ggatctcatt aaaacagaag aaatgaacac caagtatcaa agggacatta
1141 gggaggccat ggcacaaaag gaagatatgg aagaaagaat tacaaccctt gaaaagcgtt
1201 acctcagtgc tcagagagaa tctacctcca tacatgacat gaatgataaa ctagaaaatg
1261 agtttagcaa taaagaagct atcctgcggc agatggaaga gaaaaacaga cagttacaag
1321 aacgtcttga gctagctgaa caaaagttgc agcagaccat gagaaaggct gaaaccttgc
1381 ctgaagtaga ggctgaactg gctcagagaa ttgcagccct aaccaaggct gaagagagac
1441 atggaaatat tgaagaacgt atgagacatt tagagggtca acttgaagag aagaatcaag
1501 aacttcaaag agctaggcaa agagagaaaa tgaatgagga gcataacaag agattatcgg
1561 atacggttga tagacttctg actgaatcca atgaacgcct acaactacac ttaaaggaaa
1621 gaatggctgc tctagaagaa aagaatgttt taattcaaga atcagaaact ttcagaaaga
1681 atcttgaaga atctttacat gataaggaaa gattagcaga agaaattgaa aagctgagat
1741 ctgaacttga ccaattgaaa atgagaactg gctctttaat tgaaccaca ataccaagaa
1801 ctcatctaga cacctcagct gagttgcggg actcagtggg atccctagtg gacagccagt
1861 ctgattacag acaactaaa gtaataagaa gaccaaggag aggcgcagtg ggtgtgcgaa
1921 gagatgagcc aaaggtgaaa tctcttgggg atcacgagtg gaatagaact caacagattg
1981 gagtactaag cagccaccct tttgaaagtg aactgaaat gtctgatatt gatgatgatg
2041 acagagaaac aatttttagc tcaatggatc ttctctctcc aagtggcat tccgatgccc
2101 agacgctagc catgatgctt caggaacaat tggatgccat caacaaagaa atcaggctaa
2161 ttcagggaaga aaaagaatct acagagttgc gtgctgaaga aattgaaaat agagtggcta
2221 gtgtgagcct cgaaggcctg aatttggcaa gggccacccc aggtacctcc attactgctt
2281 ctgttacagc ttcategctg gccagttcat cccccccag tggacactca actccaaagc
2341 tcacccctcg aagccctgcc agggaaatgg atcggatggg agtcatgaca ctgccaagtg
2401 atctgaggaa acatcggaga aagattgcag ttgtggaaga agatggctga gaggacaaag
2461 caacaattaa atgtgaaact tctctctctc ctacccctag agccctcaga atgactcaca
2521 ctctcccttc ttctaccac aatgatgctc gaagtagttt atctgtctct cttgagccag
2581 aaagcctcgg gcttggtagt gccaacagca gccaaagact tcttcacaaa gcccccaaga
2641 agaaaggaat caagtcttca ataggacgtt tgtttggtaa aaaagaaaaa gctcgacttg
2701 ggcagctccg aggccttatg gagactgaag ctgcagctca ggagtccttg gggttaggca
2761 aactcggaac tcaagctgag aaggatcgaa gactaaagaa aaagcatgaa cttcttgaag
2821 aagctcggag aaagggatta ctttttgccc agtgggatgg gccaaactgtg gtcgcatggc

```

2881 tagagctttg gttgggaatg cctgcgtggt acgtggcagc ctgccgagcc aacgtgaaga  
 2941 gtggtgccat catgtctgct ttatctgaca ctgagatcca gagagaaatt ggaatcagca  
 3001 atccactgca tcgcttaaaa cttcgattag caatccagga gatggtttcc ctaacaagtc  
 3061 cttcagctcc tccaacatct cgaactcctt caggcaacgt ttgggtgact catgaagaaa  
 3121 tggaaaatct tgcagctcca gcaaaaacga aagaatctga ggaaggaagc tgggccagct  
 3181 gtccggtttt tctacagacc ctggcttatg gagatatgaa tcatgagtgg attggaaatg  
 3241 aatggcttcc cagcttgggg ttacctcagt acagaagtta ctttatggaa tgcttggtag  
 3301 atgcaagaat gttagatcac ctaacaaaaa aagatctccg tgtccattta aaaatggtgg  
 3361 atagtttcca tcgaacaagt ttacaatatg gaattatgtg cttaaagagg ttgaattatg  
 3421 acagaaaaga actagaaaga agacgggaag caagccaaca tgaaataaaa gacgtgttgg  
 3481 tgtggagcaa tgaccgagtt attcgtgga tacaagcaat tggacttcga gaatatgcaa  
 3541 ataataact tgagagcggg gtgcatggct cacttatagc cctggatgaa aactttgact  
 3601 acagcagctt agctttatta ttacagattc caacacagaa caccagga aggagattc  
 3661 ttgaaagaga atacaataac ctcttgccc tgggaactga aaggcgactg gatgaaagtg  
 3721 atgacaagaa cttcagacgt ggatcaacct ggagaaggca gtttctcct cgtgaagtac  
 3781 atggaatcag catgatgcct gggctctcag aaacattacc agctggattt aggttaacca  
 3841 caacctctgg gcagtcaaga aaaatgacaa cagatgttgc ttcacaaaga ctgcagaggt  
 3901 tagacaactc cactgttcgc acatactcat gttgaccagc cactcaaagg aggcagcact  
 3961 gacctgctat ggcgtctttt cagtctactc tacctaaagt gcactaccat ctaagaagac  
 4021 gagcagtga aacctttgtg aaaactgaat tc

MMCEVMPTINEDTPMSQRGSQSSGSDSDSHFEQLMVNMLDERDRLLDTLRETQESLSLAQQRQDVIYDR  
 DSLQRQLNSALPQDIESLTGGLAGSKGADPPEFAALTKELNACREQLLEKEEEEISELKAERNNTRLLEH  
 LECLVSRHERSLRMTVVKRQAQSPSGVSSEVEVLKALKSLFEHHKALDEKVRERLRVSLERVSAL EEELA  
 AANQEIVALREQNVHIQRKMASSEGSTESEHLEGMEPGQKVHEKRLSNGSIDSTDETSQIVELQELLEKQ  
 NYEMAQMKERLAALSSRVGEVEQEAETARKDLIKTEEMNTKYQORDIREAMAQKEDMEERITTTLEKRYLSA  
 QRESTSIHDMNDKLENELANKEAILRQMEENRQLQERLELAEQKLQQTMRKAETLPEVEAEQAQRIAL  
 TKAERHGNIEERMRLHLEGQLEEKQELQRARQREKMNEEHNKRLSDTVDRLLTESNERLQLHLKERMAA  
 LEEKNVLIQESSETFRKNLEESLHDKERLAEIEKLRLSELDQLKMRTGSLIEPTIPRTHLDTSALRYSVG  
 SLVDSQSDYRTTKVIRRRPRGRMGVRRDEPKVKS LGDHEWNRTQQIGVLSSHFPFESDTEMSDIDDDRET  
 IFSSMDLLSPSGHSDAQTLAMMLQEQLDAINKEIRLIQEEKESTELRAEEIENRVASVSLEGLNLARVHP  
 GTSITASVTASSLASSPPSGHSTPKLTPRSPAREMDRMGMTLP SDLRKHRRKIAVVEEDGREDKATIK  
 CETSPPTPRALRMTHTL PSSYHNDARSSLVSLEPESLGLGSANSSQDSLHKAPKKKGKIKSSIGRLFGK  
 KEKARLGQLRGFMETEAAAQESLGLGKLGTQAEKDRRLKKKHELLEEARRKGLPFAQWDGPTVVAWLELW  
 LGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSDTEIQREIGISNPLHRLKLRLAIQEMVSLTSPSAPPTSRTPSGNV  
 WVTHEEMENLAAPAKTKESEEGSWAQCPVFLQTLAYGDMNHEWIGNEWLPSLGLPQYRSYFMECLVDARM  
 LDHLTKKDLRVHLKMVDSFHRTSLQYIGIMCLKRLNYDRKELERRREASQHEIKDVLVWSNDRVIRWIQAI  
 GLREYANNILESGVHGSLIALDENFDYSSLALLLQIPTQNTQARQILEREYNNLLALGTERRLDESDDKN  
 FRRGSTWRRQFPREVHGISMMPGSSETLPAGFRLTTTSGQSRKMTTDVASSRLQRLDNSTVRTYSC

FIGURA 11

**PTPRT** NM\_133170.3 → NP\_573400.3 precursor de isoforma 1 receptor-tipo proteína tirosina

fosfatasa T

```

1 cctccccgct cagttcgcgc cgcgcctcgg cttggaacgc aggagcgccg gctccgggag
61 cccgagcgga gccagccgcg cgcacagcca gcggccgcgc cggcgatgcg gggccacccc
121 gcgcccgcgc cagtcccggc cccggccccc gcgggaaggg gctgagctgc ccgccgcgc
181 ccggatggcg agcctcgccg cgctcgccct cagcctgctc ctgaggctgc agctgccgcc
241 actgcccggc gcccgggctc agagcgccgc aggtggctgt tcctttgatg agcactacag
301 caactgtggt tatagtgtgg ctctagggac caatgggttc acctgggagc agattaacac
361 atgggagaaa ccaatgtctg accaggcagt gccacagga tctttcatga tgggtaacag
421 ctctgggaga gcctctggcc agaaggccca ccttctcctg ccaaccctga aggagaatga
481 caccactgac atcgacttcc attactactt ctccagccgt gacaggctca gccaggggc
541 cttgaacgtc tacgtgaagg tgaatgggtg cccccaaggg aaccctgtgt ggaatgtgtc
601 cggggtcgct actgagggtc ggggtgaagg agagctcgcc atcagcactt tctggccaca
661 tttctatcag gtgatatctg aatccgtctc attgaagggg catcctggct acatcgccgt
721 ggacgaggtc cgggtccttg ctcatccatg cagaaaagca cctcattttc tgcgactcca
781 aaacgtggag gtgaatgtgg ggcagaatgc cacatttcag tgcattgctg gtgggaagtg
841 gtctcagcat gacaagcttt ggctccagca atggaatggc agggacacgg ccctgatggg
901 caccctgtgt gtcaaccaca ggcgcttctc agccacagtc agtgtggcag acactgccc
961 gcggagcgct agcaagtacc gctgtgtgat ccgctctgat ggtgggtctg gtgtgtccaa
1021 ctacgcggag ctgatectga aagagcctcc cagccccatt gctccccag agctgctggc
1081 tgtggggggc acatacctgt ggatcaagcc aaatgccaac tccatcatcg gggatggccc
1141 catcatcctg aaggaagtgg aatatcgcac caccacaggg acgtgggcag agaccacat
1201 agtcgactct cccaactata agctgtggca tctggacccc gatgttgagt atgagatccg
1261 agtgctcctc acacgaccag gtgagggggg tacgggaccg ccagggcctc ccctcaccac
1321 caggaccaag tgtgcagatc cgttacatgg ccacagaaac gtggaaatcg tagacatcag
1381 agcccggcag ctgaccctgc agtgggagcc cttcggctac gcggtgaccg gctgccatag
1441 ctacaacctc accgtgcagt accagtatgt gttcaaccag cagcagtagc aggccgagga
1501 ggtcatccag acctcctccc actacacctt gcgaggcctg cgcgccctca tgaccatccg
1561 gctgcgactc ttgctgtcta accccgaggg ccgaatggag agcgaggagc tgggtggtgca
1621 gactgaggaa gacgttccag gagctgttcc tctagaatcc atccaagggg ggccctttga
1681 ggagaagatc tacatccagt ggaaacctcc caatgagacc aatggggctc tcacgtcta
1741 cgagatcaac tacaaggtcg tcggctcgct ggaccaagt gctgacctct cgagccagag
1801 ggggaaagtg ttcaagctcc ggaatgaaac ccaccacctc tttgtgggtc tgtaccagg
1861 gaccacctat tccttcacca tcaaggccag cacagcaaag ggctttgggc ccctgtcac
1921 cactcggaat gccacaaaaa tttcagctcc atccatgcct gactacgaca cagacacccc
1981 attgaatgag acagacacga ccatcacagt gatgtgaaa cccgctcagt cccggggagc
2041 tcctgtcagt gtttatcagc tgggtgtcaa ggaggagcga cttcagaagt caggagggc
2101 agctgacatt attgagtgtc tttcgggtgc cgtgagctat cggaatgcct ccagcctcga
2161 ttctctacac tactttgctg ctgagttgaa gcctgccaac ctgctgttca ccagccatt
2221 tacagtgggt gacaataaga catacaatgg ctactggaac cctcctctct cccccctgaa
2281 aagctacagc atctacttcc aggcactcag caaagccaat ggagagacca aaatcaactg
2341 tgttcgtctg gctacaaaag caccaatggg cagcgcccag gtgaccccg ggactccact
2401 ctgcctcctc accacaggtg cctccaccca gaattctaac actgtggagc cagagaagca
2461 ggtggacaac accgtgaaga tggctggcgt gatcgctggc ctctcatgt tcacatcat
2521 tctcctgggc gtgatgttca ccatcaaaag gagaagaaat gcttattcct actcctatta
2581 cttgaagctg gccagaagc agaaggagac ccagagtggg gccagaggg agatggggcc
2641 tgtggcctct gccgacaaac ccaccaccaa gctcagcgcc agccgcaatg atgaaggctt
2701 ctcttctagt tctcaggacg tcaacggatt cacagatggc agccgcgggg agctttccca
2761 gccaccctc acgatccaga ctcatcccta ccgcacctgt gacctgtgg agatgagcta
2821 ccccgggac cagttccaac ccgcatccg ggtggctgac ttgctgcagc acatcacgca

```

2881 gatgaagaga ggccagggtt acgggttcaa ggaggaatac gaggccttac cagaggggca  
 2941 gacagcttcg tgggacacag ccaaggagga tgaaaaccgc aataagaatc gatatgggaa  
 3001 catcatatcc tacgaccatt cccgggtgag gctgctgggt ctggatggag acccgcactc  
 3061 tgactacatc aatgccaaact acattgacgg ataccatcga cctcggaact acattgcgac  
 3121 tcaagggtccg atgcaggaga ctgtaaagga cttttggaga atgatctggc aggagaactc  
 3181 cgccagcatc gtcattggtca caaacctggt ggaagtgggc aggggtgaaat gtgtgcgata  
 3241 ctggccagat gacacggagg tctacggaga catataagtc accctgattg aaacagagcc  
 3301 cctggcagaa tacgtcatac gcaccttcac agtccagaag aaaggctacc atgagatccg  
 3361 ggagctccgc ctcttccact tcaccagctg gcctgaccac ggcgttccct gctatgccac  
 3421 tggccttctg ggcttcgtcc gccaggtcaa gtctctcaac ccccggaag ctggggccat  
 3481 agtgggtccac tgcagtgtcg gggctgggcg gactggctgc ttcattgcca ttgacaccat  
 3541 gcttgacatg gccgagaatg aaggggtggt ggacatcttc aactgcgtgc gtgagctccg  
 3601 ggcccaaagg gtcaacctgg tacagacaga ggagcaatat gtgtttgtgc acgatgccat  
 3661 cctggaagcg tgctctgtg gcaacactgc catccctgtg tgtgagttcc gttctctcta  
 3721 ctacaatatc agcaggctgg acccccagac aaactccagc caaatcaaag atgaatttca  
 3781 gacctcaac attgtgacac cccgtgtgcg gcccgaggac tgcagcattg ggctcctgcc  
 3841 ccggaaccat gataagaatc gaagtatgga cgtgctgcct ctggaccgct gctgcctt  
 3901 ccttatctca gtggacggag aatccagcaa ttacatcaac gcagcactga tggatagcca  
 3961 caagcagcct gccgccttcg tggtcaccca gcacctcta cccaacaccg tggcagactt  
 4021 ctggaggctg gtgttcgatt acaactgtct ctctgtggtg atgctgaatg agatggacac  
 4081 tgcccagttc tgtatgcagt actggcctga gaagacctcc ggtgtctatg ggcccatcca  
 4141 ggtggagttc gtctccgcag acatcgacga ggacatcctc cacagaatat tccgcactcg  
 4201 taacatggcc cggccacagg atggttatcg tatagtccag cacctccagt acattggctg  
 4261 gcctgcctac cgggacacgc cccctccaa gcgctctctg ctcaaagtgg tccgacgact  
 4321 ggagaagtgg caggagcagt atgacgggag ggagggacgt actgtggtcc actgcctaaa  
 4381 tgggggaggc cgtagtggaa ccttctgtgc catctgcagt gtgtgtgaga tgatccagca  
 4441 gcaaaacatc attgacgtgt tccacatcgt gaaaacactg cgtaacaaca aatccaacat  
 4501 ggtggagacc ctggaacagt ataaatttgt atacgagggt gcaactggaat atttaagctc  
 4561 ctttttagctc aatgggatgg ggaacctgcc ggagtccaga ggtgtgtgtg accaagcccc  
 4621 cttttgtgtg aatggcagta actgggtcca ggagctctga ggtggcacc tgcctgactc  
 4681 caaggagaag actggtggcc ctgtgttcca cggggggctc tgcaccttct gaggggtctc  
 4741 ctgttgccgt gggagatgct gctccaaaag gcccaggctt ctttttcaac ctaaccagcc  
 4801 acagccaagg gcccaagcag aagtacaccc acaagcaagg ccttggattt ctggctccca  
 4861 gaccacctgc ttttgttctg agtttgtgga tctcttggca agccaactgt gcaggtgctg  
 4921 gggagtggga ggctccctcg cctccttct ccttaggagt ggaggagatg tgtgttctgc  
 4981 tcctctacgt catggaaaag attgaggctc ttgggggtca ctgctctgct gcccctgca  
 5041 acctccttca ggggcctctg gcaccagaca tttgcagtct ggaccagtgt gaccttacga  
 5101 tgttccctag gccacaagag agggccccc tctcacacc taacctgcat ggggtctcgc  
 5161 ccacaaccat tctgtacccc ttcccagcc tgggccttga ccgtccagca ttcactggcc  
 5221 ggccagctgt gtccacagca gtttttgata aaggtgttct ttgctttttt gtgtgggtcag  
 5281 tgggaggggg tggaactgca gggaacttct ctgctcctcc ttgtctttgt aaaaagggac  
 5341 cacctcctcg gggcagggtt tgggtgacc tgtaggatgt aacctctgtg tttctttggt  
 5401 ggtagctttc tttggaagag acaacaaga taagatttga ttattttcca aagtgtatgt  
 5461 gaaaagaaac tttcttttgg aggggtgtaa atcttagtct cttatgtcaa aaagaagggg  
 5521 gcgggggagt ttgagtatgt acctctaaga caaatctctc gggcctttta ttttttctg  
 5581 gcaatgtcct taaaagctcc caccctggga cagcatgcca ctgagcaagg agagatgggt  
 5641 gagcctgaag atggtccctt tggtttctgg ggcaaataga gcaccagctt tgtgcataat  
 5701 ttggatgtcc aaatttgaac tcttctctaa agaaacccag cagccacctt gaaaaaggcc  
 5761 attgtggagc ccattatact ttgattttaa ataggccaag agaatacagg ctggagatct  
 5821 agggctctgt ccaaagtgtg agtgagtcaa tgagagggaa ccaacatttg ctaagtctct  
 5881 actgtatgcc agggatcatg cttggcactt tccataggac atttcacaca gtccttagaa  
 5941 ccccaggag agagctactg acttgttatc atctccattt gatcatctcc tccaatgagg  
 6001 aaaccacgc accttctta gtaatgaaat cctgggttcc aaaggggcag gtaatggcaa

6061 tgagacttct cegtgtctgtt ttcttcatct tctctaagcc aagcaattat tttatggagg  
 6121 gaaaataagg ccagaaactt ctgagcagat aactccacaa atggaaattt agtactttct  
 6181 tcctgatgcc agttcttctg ggaagcgag aatttcagat atattttagt aacacattcc  
 6241 cagctcccca ggaaagccag tctcatctaa tttcttagtc agtaaaaaca attccctgtt  
 6301 ccttcaggct atgaatggac cagccaggga aactctcgac cttgatctct agccagtgtc  
 6361 taggccaat atctgacagc ctcagggtgg ctgggacctt ggaagctcca tcttgaaggc  
 6421 tggctctagc ccagacaggg catgaggggc agagaattca agaaggtaca gctttggccc  
 6481 tcaagagccc actgtatgct ggggaaatgg aaccatgggt cagtagtgtg gagtggatga  
 6541 gtgttccatg agcctaggag caagaaagtc tcttcggcct cgggcttccct ggagaagggg  
 6601 acgtccattc ctgtctgggtc ttaacaagca taaaaaggaa aaaaaggaaa ctcaggcaaa  
 6661 gggatccata tgtgcaatgg caaagaaatg tgaaaaggca ttgggagaag cagtctgggg  
 6721 gaggccagcc cagtgcgggc acagcacac acggggagca gcaagagatg agccagggtc  
 6781 caggagacag atgcccacg cgagtacaga ctttgtccta ttggcaacaa ggagtccatg  
 6841 gagctttaga gagatgcact cagcttcgtg ttggccaaga ctccttctgg gccaatgggg  
 6901 ctgcctcttt tcctttctac agacactgtg aaaacattcc cttaagcgtg cactttttaa  
 6961 tatcacatct atttgtctgt ctgtcattg ttttgttgtt ggaactaaat atgcaatgga  
 7021 tcatgagact cagattctat gagaaaccca gggctctctg tttaccacgg agcagggtca  
 7081 ccaaccaga tctccaggcc catgaggatg gaacatgaaa ggagccgaca aaagtgtgct  
 7141 ccattggcat gggctctgga gctgtccaga agtccaggga caccagactt gatcaaggaa  
 7201 gggctgtcac tttagagggt caaaaggaa tgccctcaaag caaaggcaag caaaggaaac  
 7261 ccacgatgaa cttgtctctt tcctttgatg agcctctccc caggtgtatt tcagcagacc  
 7321 ccggggaccc acccccactg ggctgtctgg cctccctcgg ctccagccca atgccccagc  
 7381 tggccttccc cagcctgcaa ggagcctgta gcatggcaaa tctgctgtct gtatgctatt  
 7441 ttcttagatc ttggtacatc cagacaggat gagggtggag ggagagctat ttaacacaaa  
 7501 tcctaagatt tttttctgct caggaaaggg tgaaatagct ggcagataca aaagacagtg  
 7561 gcttttatca ttttaaattg taggaattta aggtgtgact tcaggggagaa acaaacttgc  
 7621 aaaaaaaaaa aatctcaggc catgttgggg taaccagca agggccagtg atgatttccc  
 7681 ccagctcacc cccttatttt ccacacacc aaccattctc taaagcagga cagtgaatag  
 7741 gtcttaggac agtgacacaca ggaagaaatt gaggcttatg gatggggatg acttccctaa  
 7801 gatcccatgg gacaaggatg tggcaaggct tggatgagat ggggcaccag tgcccaggaa  
 7861 tttgaacatt ttcccttacc caggaaatct ccggagccaa caccaccacc cccagggggg  
 7921 ctccccaccc caccctattt acaggggtgag ctacgcctgt catgagcaga ggaaaatatt  
 7981 attaatgctc tctgagtctt tacaacagga gctcttacct catagatgtg ggctctgttt  
 8041 ggggaagatg caaggaagta atgagaagcc caggaaattt ctccacctgt gtttatggcc  
 8101 taaatagctt caggatgtat cttagctgca ctccaacatt gcatccttct tggggtgaa  
 8161 aatctgggac aaccaggggt ccttgggcct ctagaaggcc acagtaggac tctcttctgt  
 8221 ggaatggaag gggacagttt gcttttagtg ctggccctct ctgtgggtgt ggctgcaaa  
 8281 ggaaccaaca gacctatgc tggggactct aacatgtgag ctcatataat tcttccagca  
 8341 ttctaaagga gggtttgtga ttgtcaccat ttactgatga ggaaactaag gctcctaggg  
 8401 gagaaatcac ttgccacag ttccacagct agtgagtga tgaaccagga tttaaaccgg  
 8461 ttttttctca ctacagagac aatatttttc caccattgta tctcacattt ttccaggag  
 8521 gttaccata acagaagaga cttagagtga acagatacgt cagtggataa agctcaaagc  
 8581 aaacaacagt aagcttaaaa ttccctcata gtctcatgtt ttacgttcac aattcatgca  
 8641 aaatttgcac tccactttct gatttagcct tgttgggttt aatatgactc tatgaatatt  
 8701 tcaaaaaaaaa atgtgctctg ttctctcatg tgttctgttc tgttcacccc gctatgacgg  
 8761 accctaggtc agctgggtct cagcttgacc ctagaattga ctctaggagc agtgaccctg  
 8821 ctgcctccca gagccagtta taggctcaag atcaagacca actgaccttc tcttaggcag  
 8881 ctcccttggg gtgtgggtgc tctgacctca ctgttcatga ggggacctca actaaggcat  
 8941 cttccagttg ggtgtctgga ggaacccatt aactcacact agaattgatga ggatttgcct  
 9001 atctggcgtg gagaaggatg agcccacaaa accctaaagg gaaaagagaa gctggacaca  
 9061 gctgtactca gcagattcct gaatgctagg ctggaaagtg gtgcctgttg tccaagtgga  
 9121 gtcacatggt tgctaattgt ggcaagtctg aggacacact tcatgagcag ctggggctgt  
 9181 gaaggctcct cactttaccc tagccacaca taattactgg gtgcctacag cacctagcac  
 9241 cttggagggg gcactattag gaaatcgaga ttactatggc acaattaatt cctgggtaag  
 9301 gcatgggggt gtgggtggaca gagctcagtc tttagtttga acgaaaacat acatacatga

9361 aaaacataca tgaaaaaagg accctcatca acattagaag gggtagattt ggagcacttt  
 9421 aggcaggaaa acaggaacgc aaggccagga aactggaacc cagtgaatac tcagaaccga  
 9481 ggatgcagat gacttattta gcaaaatggt cacttctgtg acatagctgg agaaaggatg  
 9541 ggtaacagct tgccagagcc acttggaaca agggcaaatc tcagtgtctg gggcaaaaga  
 9601 tgatgcattt ccctctgacc catcatgttt attcatctc cactcccat tgccacacta  
 9661 gctcttgctg taagtctca ccaggatcta catttctctg tcgctgggtg gaaccctta  
 9721 gagtacatag aggtatcagt ccagtaagac tgctctacac aacagaagtg agggccaggg  
 9781 agtagcagcc aggcccttat cctgttacct ctgcaggagt gactgcccc aacagatcca  
 9841 gagacattga aggaaatgat aattccttgg tacctcactg ccttgggaca aaatgaagaa  
 9901 agccaccctt ccttaggctg cagcttgcca ctctgggct gggtaaacag gtcactagca  
 9961 ccaagctcaa ccaggagtaa cactctggaa gacatgggtg agcccaagag gaagcatgaa  
 10021 caggacgctg ttcttaagtc atgtcaacag gttgtgctgg gccaggatcc ccagggaaaa  
 10081 aaatgggtcaa cccaactgga gggtaggtta gāagaaaaaa aacataaacg tggatagtca  
 10141 tgtcatctca aatccctgac ttggcttccc cactacttaa cagtctgagc tcttcttag  
 10201 cctgtgacca gcttcaaatc acagccaagt aaaacaagga aataggaaaa gtaaatccaa  
 10261 ctagaagaga caagctgaga ttcatagttg ttactctct ccatgcaaaag ttccctgtt  
 10321 ggaggttttc catgtatata tgtctagaag tgatagaatg caaggccttg gctttgtctt  
 10381 gcagggatct gcctttgagg tcatagactg aacagcaggg agagaggtta gtggtggagt  
 10441 gtgggggggag ctgttctagc tccagtttct tctgacacat ttttcaggat catggatctg  
 10501 atctccgaa gcacagcaga gatattctaa ccatatttgt gcacatgagc agactcttct  
 10561 agtttttttag taaccaggga tgggcttttg catggcactg actatagaga tgtctgtag  
 10621 agatcaagcc agtcttttgc atccacctg cccacctcca gaagagatgg gaaaaggcca  
 10681 tcaaagggca ttcaccaact gaaatccact catgaatgtt aggtctctaa aaggaggcat  
 10741 caacactcac aatggtagcc tccaaacct gcatccacc tatctaagag ctgagggtg  
 10801 gtccactggg gcagatacaa gggaagtga agggctcagg atgaaagaaa atctattggg  
 10861 aagagtttta ggggcttgat cattatgggg ctctcttcta tatctgagaa ctgctctggg  
 10921 tgggtgagatg tggactctga tcttaattg gaatgttcgg agaatgagtg tctggtggcc  
 10981 ttgaagtgtt ggacagaaaa gtatcagtat aaaagcctgg agctcagggt aattaatgta  
 11041 gttcatggtt ccttagtgag caggactctt ggatgtggag gagaaagggt cataggaagt  
 11101 aaaccacca aattacaaaa ttgagtctct gtacaattac ttcagtgect ttgggcttat  
 11161 gaatacaaat cagtgggctt tctctatgat ggtccaacaa actctcagtg tccacctgt  
 11221 ccctgtatct cccatggaag atgaataatg tcagggtgtc tttgggtcaa agggcccagg  
 11281 gcagtctgga ggcttagagg gcagagtggg gtcattccat gtaaagttag gcttctgagg  
 11341 ggtcaggcag aatatggtgt ccatatcttc catagctctg cagattcttg gatgaagtca  
 11401 agcacagttt gctagacca ggtcactct ctgagtataa ctaggacca tgagtgaac  
 11461 ttaatagctg taaggagaa cctgctgtct gccagagagg ataagctgcc catctcagca  
 11521 gctgtctaaa agaaggcagg tgtctcttta aagggaagag aagcattggg gaaatggatt  
 11581 tcaggctcact tccattccag atgggtgaga tcttgtggag ctgggatcat gtttgaactc  
 11641 attcatacct gttaggcagc aatccaagta gattgtgtt ggtctgtaca ggctgaagcc  
 11701 ccctgctctc ccaccaagt gccccactg agcaggccaa catgctgttg tggccacata  
 11761 tactgggctg atccaggctg gttatcacca aacagcaaac catagggaac agctgctttg  
 11821 ccatagaccc aatacccatg tagatctctc atgagagcag ccataactca gaccactga  
 11881 ccaacagggc catgagtga agccagaacc agtgaaggtc caagtaggac acagagcagg  
 11941 gcttttctta ccatacacat tatctccaga ggttatttct accccactcc ctattcaagg  
 12001 cctgttgagg cacttgcaa aagcaaaagc acagtaactc aatttacaca tgattataat  
 12061 catttccagt gcacacattt catcaccagg tggatcctga gctagcccat gtaaattccg  
 12121 gtttaaccat attggtaatc atactcaaaa gcacttttca cctacattc tactagccaa  
 12181 tcaaagacaa agagtgtgg cctctaccat tgcttggct tctggacacc ctcaagct  
 12241 atcccaagg tcccgctcaa ctccagggag gctgacatct tcacatccac tgggcatata  
 12301 atattgcatg agaccaaagt ctccacactc tttgcagcct cctccatgaa tcccaatggc  
 12361 ctgcacttgt acagtttggg tgtttgatag ataaagcacg tatgagaaga gaaaacaaaa  
 12421 taaatcaact ttttaaaaaa gccagcactg tgctgtcaat gtttttttt tcttttcaat  
 12481 tctagctcag aaaagcagaa ggtaataaat gtcaggtcaa tgaatatcag atatattttt  
 12541 ttagtgtaca ttacagtga gtgtaattct ttacacctg caagtccatc ttattttatt  
 12601 ttgtaaatgt tccctgacaa tggttgta atggctgtgt taaaaaatct atacaataaa  
 12661 gctgtgaccc tgagattcat gttttcttaa gataaaaaaa a

MASLAALALSLLLRLQLPPLPGARAQSAAGGCSFDEHYSNCGYSVALGTNGFTWEQINTWEKPMLDQAVPTG  
 SFMMVNSSGRASGQKAHLLLPTLKENDTHCIDFHYYFSSRDRSSPGALNVYVKVNGGPQGNPVWNVSGVVTE  
 GWVKAELAISTFWPHFYQVIFESVSLKGHPGYIAVDEVRLAHPCRKAPHFLRLQNVEVNVGQNATFQCIAG  
 GKWSQHDKLWLQQWNGRDTALMVTRVNVHRRFSATVSVADTAQRSVSKYRCVIRSDGGSGVSNYAELIVKEP  
 PTPIAPPELLAVGATYLVWIKPNANSIIGDGPIILKEVEYRTTTGTWAETHIVDSPNYKLWHLDPDVEYEIRV  
 LLTRPGEGETGPPGPPLTTRTKCADPVHGPQNVEIVDIRARQLTLQWEPFGYAVTRCHSYNLTVOYQYVFNQ  
 QQYEAEEVIQTSSHYTLRGLRPFMTIRLRLLLSNPEGRMESEELVVQTEEDVPGAVPLESIQGGPFEEKIYI  
 QWKPPNETNGVITLYEINYKAVGSLDPSADLSSQRGKVFKLRNETHHLFVGLYPGTTYSFTIKASTAKGFGP  
 PVTTRIATKISAPSMPEYDTDTPNETDTTITVMLKPAQSRGAPVSVYQLVVKEERLQKSRRRAADIIECFV  
 PVSYRNASSLDSLHYFAAELKPANLPVTQPFTVGDNKTNGYWNPPSLPLKSYSIYFQALSKANGETKINCV  
 RLATKAPMGSAQVTPGTPLCLTTGASTQNSNTVEPEKQVDNTVKMAGVIAGLLMFIILLGVMLTIKRRRN  
 AYSYSYLLKLAKKQKETQSGAQREMGPVASADKPTTKLSASRNDEGEFSSSSQDVNGFTDGSRGELSQPTLTI  
 QTHPYRTCDPVEMSYPRDQFQPAIRVADLLQHITQMKRGQGYGFKEEYEALPEGQTASWDTAKEDENRNKNR  
 YGNIISYDHSRVRLVLVDGDPHSDYINANYIDGYHRPRHYIATQGPMQETVKDFWRMIWQENSASIVMTNL  
 VEVGRVKCVRYWPDDTEVYGDIVKTLIETEPLAEYVIRTFTVQKKGYHEIRELRLFHFTSWPDHGVPCYATG  
 LLGFVRQVKFLNPPEAGPIVVHCSAGAGRTGCFIAIDTMLDMAENEGVVDIFNCVRELRAQRVNLVQTEEQY  
 VVHDAILEACLCGNTAIPVCEFRSLYNNISRLDPQTNSSQIKDEFQTLNIVTPRVRPEDCSIGLLPRNHDK  
 NRSMDVLPLDRCLPFLISVDGESSNYINAALMDSHKQPAAFVVTQHPLPNTVADFWRLVFDYNCSSVVMLE  
 MDTAQFCMQYWPEKTS GCYGP IQVEFVSADIDEDIHRIFRICNMARPQDGYRIVQHLQYIGWPAYRDTPPS  
 KRSLLKVRRLEKWQEYDGREGRTVVHCLNGGGRSGTFCAICSVCEMIQQQNIIDVFHIVKTLRNNKSNMV  
 ETLEQYKFVYEVALEYLSSF

FIGURA 12

**TDRD1** NM\_198795.1 → NP\_942090.1 proteína 1 que contiene el dominio tudor

```

1  gctgaggcca ggagggcgca ctggggattg gaggcgaggg aagtgcaggg cgcattcccag
61  gcggcagggc tcccagcatc ggcagtcgcc atcaccgcca gaccgcagag acaggttcgg
121 atccgcggtc ctcttgccctc tttccaggcc tcgatgagtg ttaaatcgcc atttaatgtg
181 atgtcaagaa ataatttgga agcacctcct tgtaagatga cagagccatt taattttgag
241 aaaaatgaaa acaagcttcc accacatgag tctttaagaa gtcctggaac acttcctaac
301 caccctaatt tcaggctgaa aagctcagag aatggaaata aaaagaacaa ttttttgctt
361 tgtgagcaaa ccaaacaata tttggctagt caggaagaca attcagtttc ttcaaaccgg
421 aatggcatca acggagaagt agttggctcc aaaggagaca ggaaaaaatt gccagcagga
481 aactcagtgt caccaccaag tgctgaaagt aattcaccac ccaaagaagt gaatattaag
541 cctggaaata atgtacgtcc tgcaaaatca aaaaaactaa acaagttggg cgagaattcc
601 ttgtccataa gtaatccagg gctcttcacc tccttaggac ctctcttcg gtccacaact
661 tgccatcgct gtggcctatt tggatcgctg aggtgctctc agtgcaagca gacctactat
721 tgctccacag catgtcaaag aagagactgg tctgcacaca gcatcgtgtg caggcctgtt
781 cagccaaatt tccacaaact tgaaaataaa tcatctattg aaacaaagga tgtggaggta
841 aacaataaga gtgactgtcc acttgaggtt actaaggaaa tagccatttg ggctgagaga
901 ataatgtttt ctgatttgag aagtctacaa ctcaagaaaa ccatggaaat aaagggtagc
961 gttaccgaat tcaaacaccc aggggacttc tacgtgcagt tatattcttc agaagtttta
1021 gaatacatga accaactctc tgccagctta aaagaaacat atgcaaatgt gcatgaaaaa
1081 gactatatct ctgttaaggg ggaagtttgt attgccaaag acactgttga tcagacctgg
1141 aacagagcaa tcatacaaaa cgttgatgtg cagcaaaaaga aggcacatgt cttatatatt
1201 gattatggaa atgaagaaat aattccatta aacagaattt accacctcaa caggaacatt
1261 gacttgtttc ctcttctgtg cataaagtgc tttgtagcca atgttatccc agcagaaggg
1321 aattggagca gtgattgtat caaagctact aaaccactgt taatggagca gtactgctcc
1381 ataaagattg tcgacatctt ggaagaggaa gtggttacct ttgctgtaga agttgagctg
1441 ccaaatccag gaaaactttt agaccatgtg cttatagaaa tgggatattg cttgaaaccc
1501 agtggacaag attctaagaa ggaaaatgca gatcaaagtg atcctgaaga tgttgaaaaa
1561 atgacaactg aaaacaacat tgtcgtagac aaaagtgacc taatcccaaa agtggttaact
1621 ttgaatgtag gtgatgagtt ttgtggtgtg gttgcccaaa ttcaaacacc agaagacttc
1681 ttttgtcaac aactgcaaag tggccgaaag cttgctgaac ttcaggcatc ctttagcaag
1741 tactgtgatc agttgcctcc acgctctgat ttttatccag ccattgggtga tatatgttgt
1801 gctcagttct cagaggatga tcagtggtac cgtgcctctg ttttggctta cgcttctgaa
1861 gaatctgtac tggtcggata tgtagattat ggaaactttg aaatccttag tttgatgaga
1921 ctttgtccca taatcccaaa gttgttgga ttgccaatgc aagctataaa gtgtgtacta
1981 gcaggagtaa agccatcatt aggaatttgg actccagaag ctatttgtct catgaaaaaa
2041 cttgtacaga acaaaaataat cacagtgaag gtggtggaca agttggaaaa cagttccctg
2101 gtggagctta ttgataaatc cgagacgcct catgtcagtg ttagcaaagt tctcctagat
2161 gcaggccttg ctgtgggaga acagagtatg gtgacagata aaccagtgta cgtgaaagaa
2221 accagtgttc ccttgggtgt ggaaggaaaa gtaaattccat tggagtggac atgggttgaa
2281 cttggtgttg accaaacagt agatgttgtg gtctgtgtga tatatagtcc tggagaattt
2341 tattgccatg tgcttaaaga ggatgcttta aagaaactca atgatttgaa caagtcatta
2401 gcagaacact gccagcagaa gttacctaag ggtttcaagg cagagatagg acaaccttgt
2461 tgtgcttttt ttgcaggtga tggtagttgg tatcgtgctt tagtcaagga aatcttacca
2521 aatggacatg ttaaagtaca ttttgtggat tatggaaaca tcgaagaagt tactgcagat
2581 gaactccgaa tgatatcatc aacattttta aaccttcctt ttcagggaat acggtgccag
2641 ttagcagata tacagtctag aaacaaacat tggctctgaag aagccataac aagattccag
2701 atgtgtgttg ctgggataaa attgcaagcc agagtgggtg aagtcactga aaatgggata
2761 ggagttgaac tcaccgatct ctccacttgt tatccagaa taattagtga tgttctgatt
2821 gatgaacatc tggtttttaa atctgcttca ccacataaag acttaccaaa tgacagactt
2881 gttaataaac atgagcttca agttcatgta cagggacttc aagctacctc ttcagctgag
2941 caatggaaga cgatagaatt gccagtggat aaaactatac aagcaaatgt attagaaatc

```

3001 ataagcccaa acttggtttta tgctctacca aaagggatgc cagaaaatca ggaaaagctg  
 3061 tgcattgttg cagctgaatt attagaatac tgcaatgctc cgaaaagctg accaccctat  
 3121 agaccaagaa ttggagacgc atgctgtgcc aaatacacaa gtgatgattt ttggtatcgt  
 3181 gcagttgttc tggggacatc agacactgat gtggaagtgc tctatgcaga ctatggaaac  
 3241 attgaaaccc tgcctctttg cagagtgcac ccaatcacct ctagccacct ggcgcttcc  
 3301 ttccaaatta ttagatgttc acttgaagga ttaatggaat tgaatggaag ctcttctcaa  
 3361 ttaataataa tgctattaaa aaatttcattg ttgaatcaga atgtaatgct ttctgtgaaa  
 3421 ggaattacaa agaattgtcca tacagtgtca gttgagaaat gttctgagaa tgggactgtc  
 3481 gatgtagctg ataagctagt gacatttggg ctggcaaaaa acatcacacc tcaaaggcag  
 3541 agtgctttta atacagaaaa gatgtatagg atgaattgct gctgcacaga gttacagaaa  
 3601 caagttgaaa aacatgaaca tattcttctc ttcctcttaa acaattcaac caatcaaaat  
 3661 aaattttattg aaatgaaaaa actgttaaaa aaaacagcat ctcttgaggg taaaccctta  
 3721 tgagacagga aacagcaaag gctagcttta ggagagaaaag tacagcacct ggtgttttta  
 3781 tttatgagaa ccttttcttt gtccactttc tctgtaatga ccttctatcc ctccgttttt  
 3841 gcctgcctgc cattctccta ttaggttggg ggtttttatt ttcctctaag ttccttccac  
 3901 caaataaata ttacgtaaaa aattcatacc aaatcaatga gaatactggc aaggaatata  
 3961 tagggacttt ctgctatata tgtaactttt tattacttaa aggtaccgaa ggaaggccag  
 4021 gtgcagtggc tcacgcccag cactttggga ggctgagggt ggaggatccc ttgaggccag  
 4081 gagttcaagg ttacagttag ctatgatagt gccactgcac tccagcctgg gtgacagatt  
 4141 ttgtcttaaa aaaaaaaaaa aaaaagttga tatgagtttt attttctgtc cgtttgaaat  
 4201 attttgaat attccctgca ttctctgtcg tctgctctt ccacataatg tcccttgctt  
 4261 tcatgtttgt tatcttcttt ttctgttcac tcagagggtc tcaatttctt tctctccgtc  
 4321 cttaattgga ttatttttct tttggccttt gggcacagag tctgacctct ggaccactct  
 4381 aactggagaa ggaactttat gttccctctc ctgctgtgtc cacaacctta gaaatctgta  
 4441 gctagatttt tgttggtata gatagaattt actgtttctg aaacccaaat acagttatca  
 4501 gtttaaggtt

MSVKSPFNVMRSNNLEAPPCKMTEPFNFENKNNKLPHPHESLRSPGTLPNHPNFRLLKSSSENGNKKNNFLLCEQ  
 TKQYLASQEDNSVSSNPNGINGEVVGSKGDRKKLPAGNSVSPPSAESNSPPKEVNIKPGNNVRPAKSKKLNK  
 LVENSLISINPGLFTSLGPPLRSTTCHRCGLFGLRCSQCKQTYCSTACQRRDWSAHSIVCRPVQPNFHKL  
 ENKSSIETKDVEVNNKSDCPLGVTKETIAIWAERIMFSDLRSLQLKKTMEIKGTVTEFKHPGDFYVQLYSSEV  
 LEYMNQLSASLKETYANVHEKDYIPVKGEVCIKYTVDTWNRAIIQNVDVQKKAHVLYIDYGNEEIIPLN  
 RIYHLNRNIDLFPFCAIKCFVANVIPAEGNWSSDCIKATKPLLMEQYCSIKIVDILEEEVVTFAVEVELPNS  
 GKLLDHVLIEMGYGLKPSGQDSKKENADQSDPEDVGKMTTENNIVVDKSDLPKVLTLNVGDEFCEGVVAHIQ  
 TPEDFFCQQLQSGRKLAEQLASLSKYCDQLPPRSDFYPAIGDICCQFSEDDQWYRASVLAYASEESVLVGY  
 VDYGNFEILSLMRLCPIIPKLELPMQAIKCVLAGVKPSLGIWTPEAICLMKKLVQNKIITVKVVDKLENS  
 LVELIDKSETPHVS SVKVLDDAGFAVGEQSMVTDKPSDVKETSVPPLGVEGKVNPLEWTWVELGVDQTVDVVV  
 CVIYSPGEFYCHVLKEDALKKLNLDLNKSLAEHCQOKLPNGFKAIEIGQPCCAFFAGDGSWYRALVKEILPNGH  
 VKVHFVDYGNIEEVTADLRMISSTFLNLPFGQIRCLADIQSRNKHWSSEEAITRFQMCVAGIKLQARVVEV  
 TENGIGVELTDLSTCYPRIISDVLIDEHLVLKSASPHKDLPNDRLVNKHQLQVHVQGLQATSSAEQWKTIEL  
 PVDKTIQANVLEIISPFLFYALPKGMPENQEKLCMLTAELECYNAPKSRPPYRPRIGDACCAYTSDDFWY  
 RAVVLGTSDDTDEVLVYADYGNIEITLPLCRVQPIITSSHLALPFQIIRCSLEGLMELNGSSSQLIIMLLKNFML  
 NQNVMLSVKGITKNVHTVSVEKCSNGTVDVADKLVTFLAKNITPQRQSALNTEKMYRMNCCCTELQKQVE  
 KHEHILLFLLNNSTNQNKFIEMKKLLKKTASLGGKPL

FIGURA 13

**UGT2B15** NM\_001076.2 → NP\_001067.2 precursor 2B15 de UDP-glucuronosiltransferasa

```

1 aaacaacaac tggaaaagaa gcattgcata agaccaggat gtctctgaaa tggacgtcag
61 tctttctgct gatacagctc agttgttact ttagctctgg aagctgtgga aaggtgctag
121 tgtggcccac agaatacagc cattggataa atatgaagac aatcctggaa gagcttgctc
181 agaggggtca tgaggtgact gtgttgacat cttcggcttc tactcttgctc aatgccagta
241 aatcatctgc tattaataa gaagtttata ctacatcttt aactaaaaat tatttggaag
301 attctcttct gaaaattctc gatagatgga tatatgggtgt ttcaaaaaat acattttggt
361 catatttttc acaattacaa gaattgtgtt gggaatatta tgactacagt aacaagctct
421 gtaaagatgc agttttgaat aagaaactta tgatgaaact acaagagtca aagtttgatg
481 tcattctggc agatgccctt aatccctgtg gtgagctact ggctgaacta tttaacatac
541 cctttctgta cagtcttcga ttctctgttg gctacacatt tgagaagaat ggtggaggat
601 ttctgttccc tcttccctat gtacctgttg ttatgtcaga attaagtgat caaatgattt
661 tcatggagag gataaaaaat atgatacata tgctttattt tgacttttgg tttcaaat
721 atgatctgaa gaagtgggac cagttttata gtgaagttct aggaagacct actacattat
781 ttgagacaat ggggaaagct gaaatgtggc tcattcgaac ctattgggat tttgaatttc
841 ctgccccatt cttaccaa atgtgattttg ttggaggact tcactgtaaa ccagccaaac
901 ccctgcctaa ggaaatggaa gagtttgtgc agagctctgg agaaaatggt attgtggtgt
961 tttctctggg gtcgatgatc agtaacatgt cagaagaaag tgccaacatg attgcatcag
1021 cccttgccca gatcccacaa aagggttctat ggagatttga tggcaagaag ccaaatactt
1081 taggttccaa tactcgactg tacaagtggg taccacagaa tgaccttctt ggtcatccca
1141 aaaccaaagc ttttataact catggtggaa ccaatggcat ctatgaggcg atctaccatg
1201 ggatccctat ggtgggcatt cccttgtttg cggatcaaca tgataacatt gctcacatga
1261 aagccaaggg agcagccctc agtgtggaca tcaggacctat gtcaagtaga gatttgctca
1321 atgcattgaa gtcagtcatt aatgacctg tctataaaga gaatgtcatg aaattatcaa
1381 gaattcatca tgaccaacca atgaagcccc tggatcgagc agtcttctgg attgagtttg
1441 tcatgcgcca caaaggagcc aagcacctc gagtcgcagc tcacaacctc acctggatcc
1501 agtaccactc tttggatgtg atagcattcc tgctggcctg cgtggcaact gtgatattta
1561 tcatcacaaa attttgctg ttttgtttcc gaaagcttgc caaaaaagga aagaagaaga
1621 aaagagatta gttatatcaa aagcctgaag tggatgact gaaagatggg actcctcctt
1681 tatttcagca tggagggttt taaatggagg atttctttt tctgtgaca aaacatcttt
1741 tcacaactta ccttggttaag acaaaaattta ttttccaggg atttaatacg tactttagct
1801 gaattattct atgtcaatga tttttaagct atgaaaaata caatgggggg aaggatagca
1861 tttggagata tacctaagt taaatgacga gttactggat gcagcacgcc aacatggcac
1921 atgtatacat atgtagctaa cctgcacgtt gtgcacatgt accctaaaac ttaaagtata
1981 atttaaaaaa agcaaaaaaa aaaaatacaa ctcttttttt taaaccagga aggaaaatgt
2041 gaacatggaa acaacttcta gtattggatc tgaaaataaa gtgtcatcca agccataaaa
2101 aaaaaagaaa agaaaaataa aaataatata aaaccttaaa aaaa

```

```

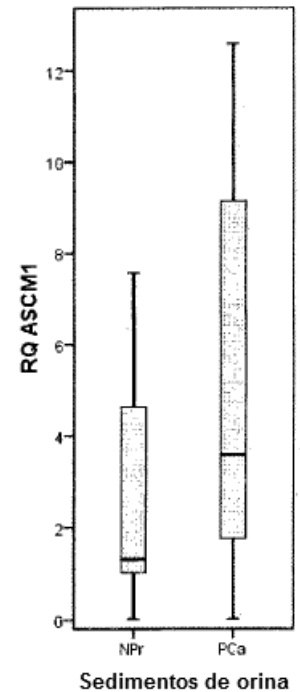
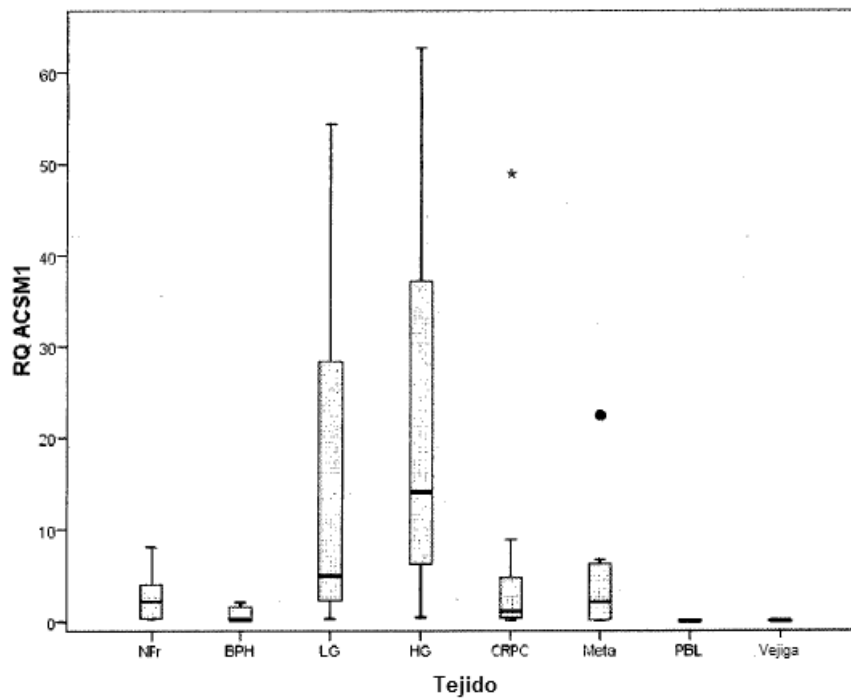
MSLKWTSVFLLIQLSCYFSSGSCGKVLVWPTEYSHWINMKTILEELVQRGHEVTVLTSASTLVNASKSS
AIKLEVYPTSLTKNYLEDSSLKILDRWIYGVSKNTFWSYFSQLQELCWEYYDYSNKLCKDAVLNKKLMMK
LQESKFDVILADALNPCGELLAELFNIPFLYSLRFSVGYTFEKNNGGFLFPPSYVPVVMSELSDQMI FME
RIKNMIHMLYFDFWFQIYDLKKWDQFYSEVLGRPTTLFETMGKAEMWLIRTYWDFEFPRPFLPNVDFVGG
LHCKPAKPLPKEMEEFVQSSGENGIVVFSLSMISNMSEESANMIASALAQIPQKVLWRFDGKKPNTLGS
NTRLYKWL PQNDLLGHPKTKAFITHGGTNGIYEAIYHGIPMVGIPLFADQHDNIAHMKAKGAALSVDIRT
MSSRDLLNALKSVINDPVYKENVMKLSRIHHDQPMKPLDRAVFWIEFVMRHKGAKHLRVAAHNLTWIQYH
SLDVIAFLLACVATVIFIITKFCFCFRKLAKKGKKKKRD

```

**FIGURA 14**

| <b>ACSM1</b>               | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media(RQ) |
|----------------------------|------------------------|--------------|-----------|
|                            | Genechip®              | TLDA         | TLDA      |
| NPr                        | 4,14                   | 2,17         | 2,85      |
| BPH                        | 3,69                   | 0,26         | 0,72      |
| LG                         | 7,21                   | 4,92         | 15,18     |
| HG                         | 7,22                   | 14,08        | 27,47     |
| CRPC                       | 5,65                   | 1,07         | 5,96      |
| Meta                       | 6,50                   | 2,04         | 4,91      |
| Vejiga normal              | -                      | 0,04         | 0,04      |
| PBL                        | -                      | 0,05         | 0,05      |
| Sedimento urinariosin PrCa | -                      | 1,31         | 2,88      |
| Sedimento urinario PrCa    | -                      | 3,58         | 8,03      |

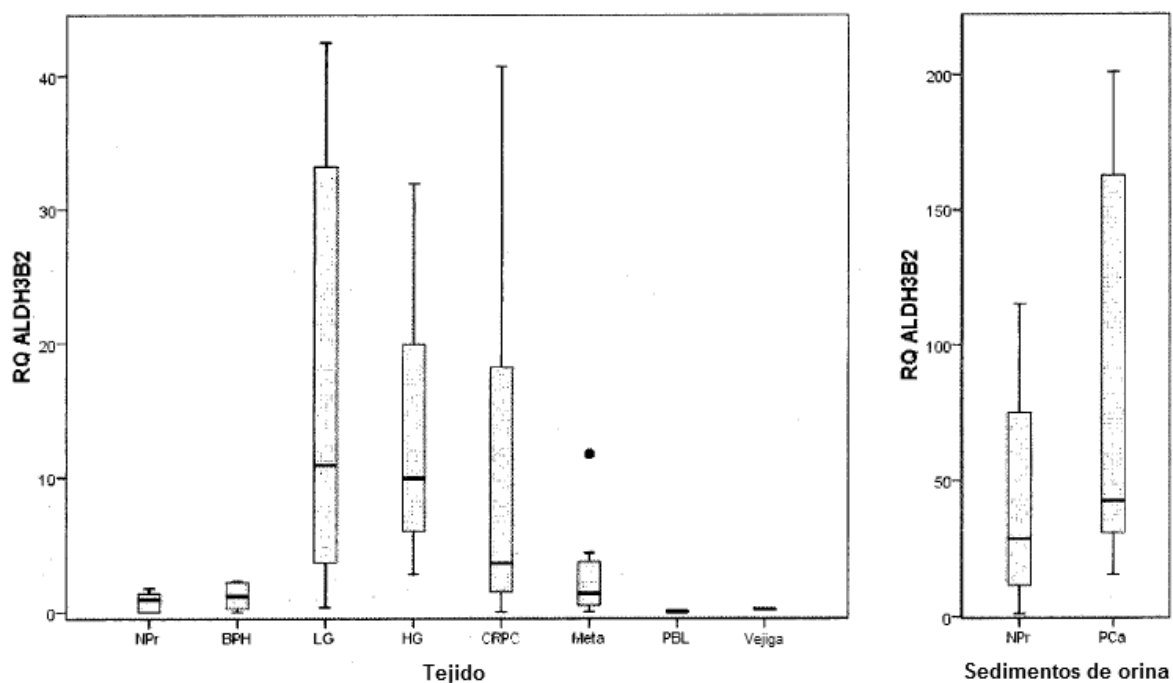
**Análisis de TLDA en diagramas de caja:**



**FIGURA 15**

| <b>ALDH3B2</b>              | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip <sup>®</sup>  | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 3,42                   | 0,93         | 0,84       |
| BPH                         | 3,60                   | 1,18         | 1,19       |
| LG                          | 6,05                   | 10,93        | 17,81      |
| HG                          | 5,78                   | 9,95         | 23,00      |
| CRPC                        | 4,64                   | 3,66         | 9,38       |
| Meta                        | 5,68                   | 1,38         | 2,90       |
| Vejiga normal               | -                      | 0,19         | 0,19       |
| PBL                         | -                      | 0,01         | 0,01       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 28,66        | 45,41      |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 42,61        | 118,89     |

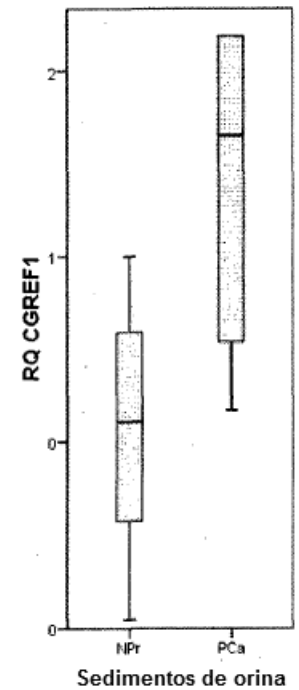
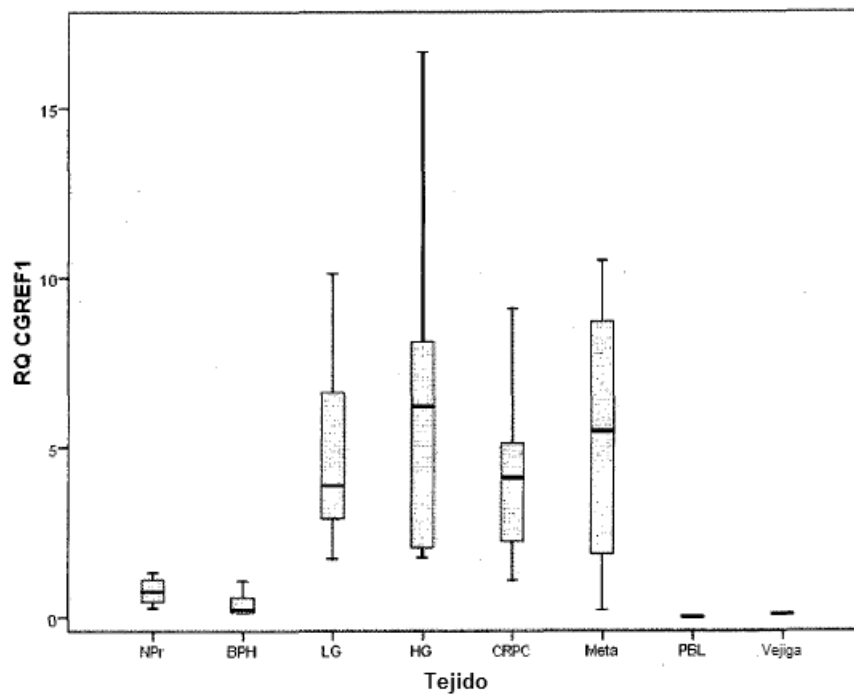
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 16**

| <b>CGREF1</b>               | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 4,32                   | 0,78         | 0,79       |
| BPH                         | 4,25                   | 0,24         | 0,41       |
| LG                          | 5,74                   | 3,87         | 4,79       |
| HG                          | 6,28                   | 6,21         | 6,38       |
| CRPC                        | 6,07                   | 4,10         | 4,25       |
| Meta                        | 7,19                   | 5,46         | 5,34       |
| Vejiga normal               | -                      | 0,08         | 0,08       |
| PBL                         | -                      | 0,01         | 0,01       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 0,55         | 0,53       |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 1,33         | 2,19       |

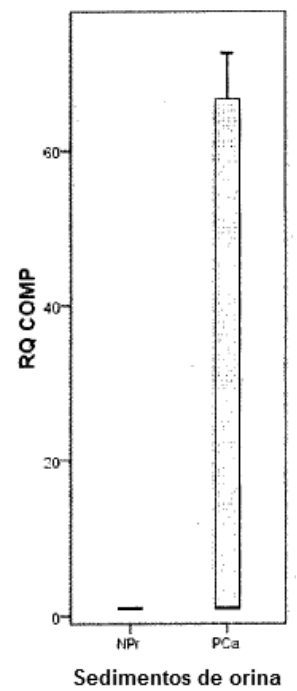
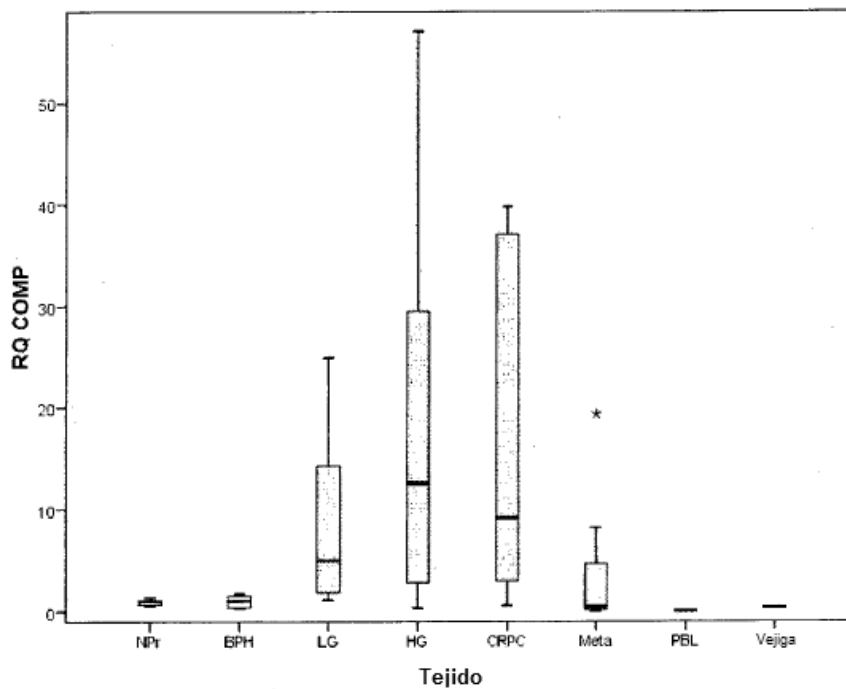
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 17**

| COMP                        | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media(RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|-----------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA      |
| NPr                         | 4,32                   | 1,02         | 0,96      |
| BPH                         | 4,75                   | 1,02         | 0,99      |
| LG                          | 5,48                   | 4,97         | 8,66      |
| HG                          | 6,33                   | 12,56        | 20,73     |
| CRPC                        | 6,12                   | 9,13         | 31,24     |
| Meta                        | 5,12                   | 0,39         | 3,71      |
| pT2                         | 5,38                   | -            | -         |
| pT3                         | 6,84                   | -            | -         |
| Vejiga normal               | -                      | 0,33         | 0,33      |
| PBL                         | -                      | 0,00         | 0,00      |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 1,00         | 1,00      |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 1,00         | 67,29     |

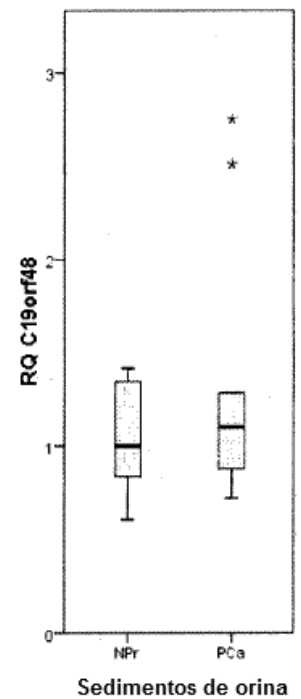
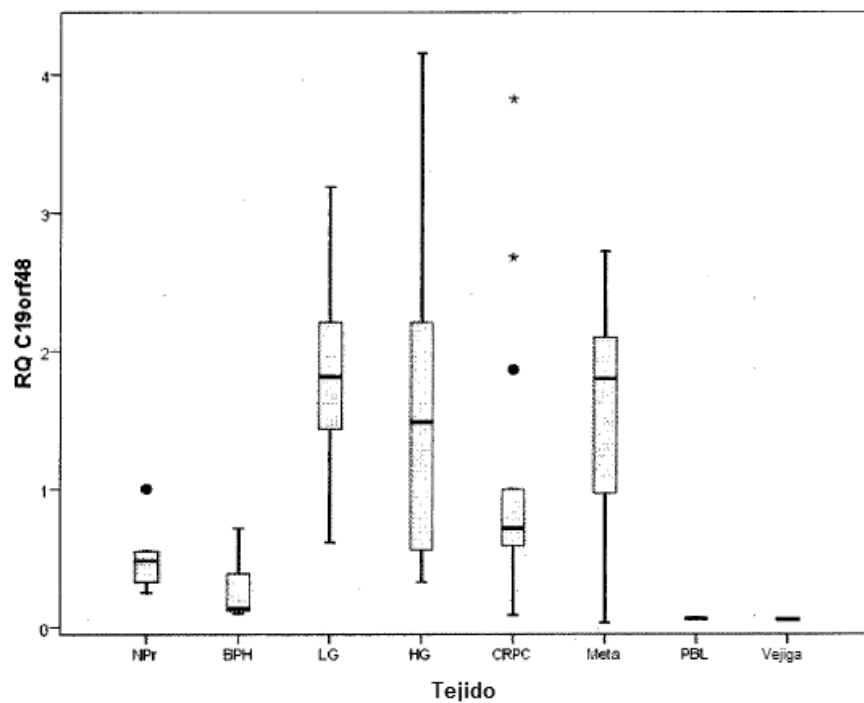
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 18**

| <b>C19orf48</b>             | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 6,07                   | 0,48         | 0,51       |
| BPH                         | 6,79                   | 0,13         | 0,27       |
| LG                          | 8,56                   | 1,81         | 2,07       |
| HG                          | 8,70                   | 1,48         | 1,76       |
| CRPC                        | 8,49                   | 0,72         | 1,12       |
| Meta                        | 9,53                   | 1,80         | 1,56       |
| Vejiga normal               | -                      | 0,05         | 0,05       |
| PBL                         | -                      | 0,06         | 0,06       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 1,00         | 1,05       |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 1,10         | 1,33       |

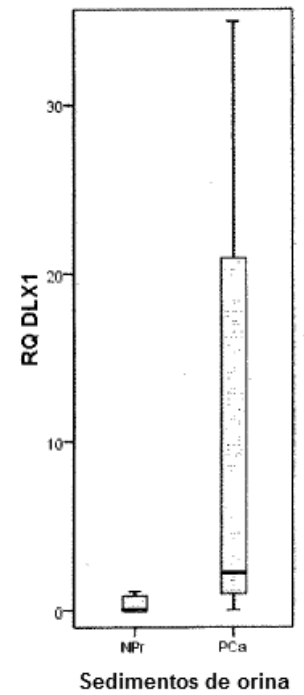
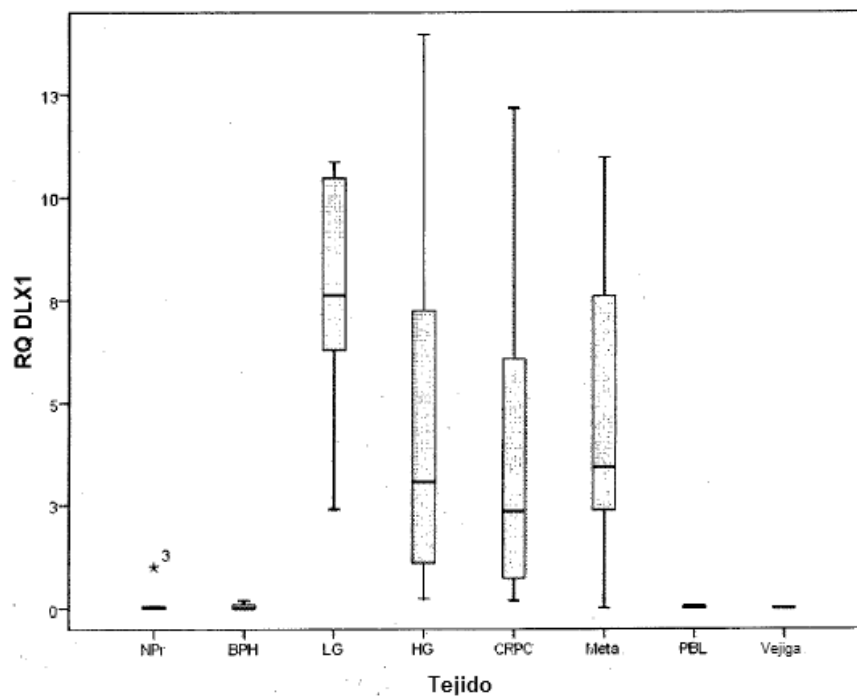
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 19**

| <b>DLX1</b>                 | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 4,03                   | 0,02         | 0,18       |
| BPH                         | 4,07                   | 0,00         | 0,05       |
| LG                          | 6,10                   | 7,62         | 9,17       |
| HG                          | 5,61                   | 3,06         | 4,82       |
| CRPC                        | 5,88                   | 2,35         | 4,03       |
| Meta                        | 6,51                   | 3,42         | 4,72       |
| Vejiga normal               | -                      | 0,00         | 0,00       |
| PBL                         | -                      | 0,02         | 0,02       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 0,01         | 0,40       |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 2,21         | 11,06      |

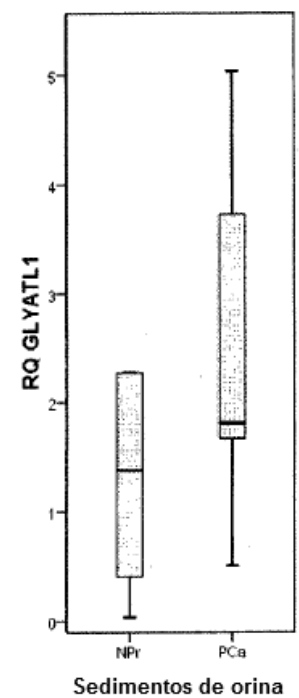
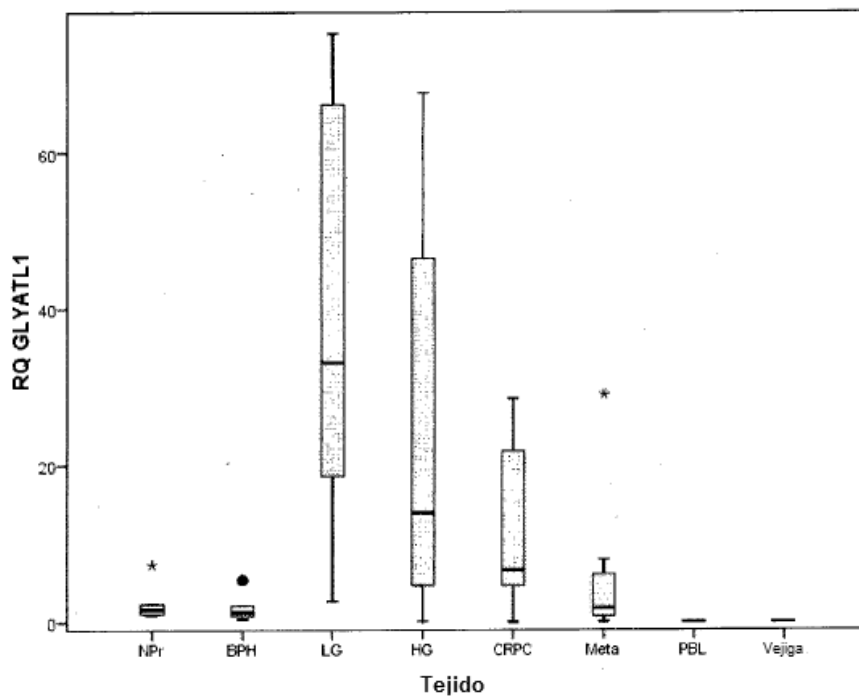
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 20**

| <b>GLYATL1</b>              | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 4,32                   | 1,62         | 2,45       |
| BPH                         | 4,68                   | 1,24         | 1,85       |
| LG                          | 7,79                   | 33,11        | 37,50      |
| HG                          | 7,55                   | 13,92        | 24,04      |
| CRPC                        | 6,65                   | 6,58         | 12,35      |
| Meta                        | 6,31                   | 1,70         | 5,74       |
| Vejiga normal               | -                      | 0,00         | 0,00       |
| PBL                         | -                      | 0,03         | 0,03       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 1,38         | 1,91       |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 1,81         | 3,54       |

Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 21**

| <b>MS4A8B</b>               | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 3,57                   | 1,92         | 2,52       |
| BPH                         | 3,21                   | 0,17         | 0,50       |
| LG                          | 5,63                   | 24,14        | 26,07      |
| HG                          | 6,17                   | 56,03        | 59,09      |
| CRPC                        | 4,89                   | 16,43        | 23,79      |
| Meta                        | 6,27                   | 16,10        | 29,12      |
| Vejiga normal               | -                      | 0,00         | 0,00       |
| PBL                         | -                      | 0,00         | 0,00       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 3,40         | 6,89       |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 9,39         | 28,46      |

Análisis de TLDA en diagramas de caja:

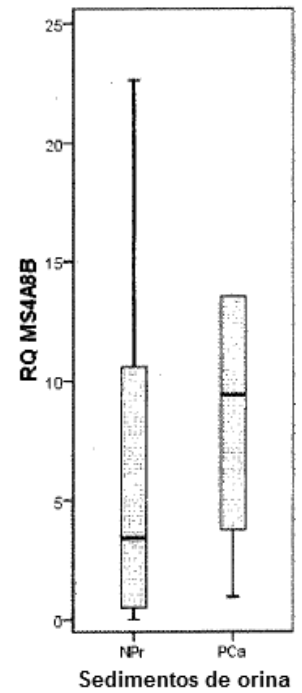
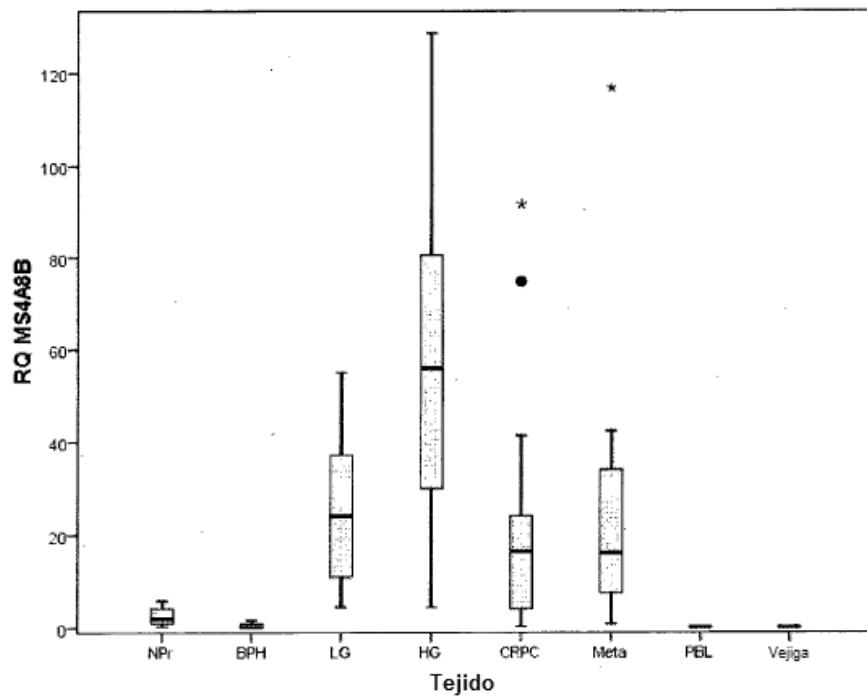
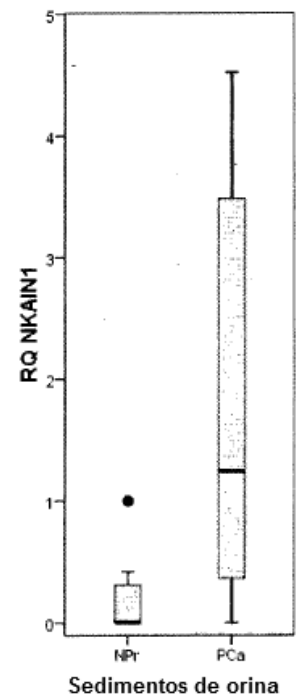
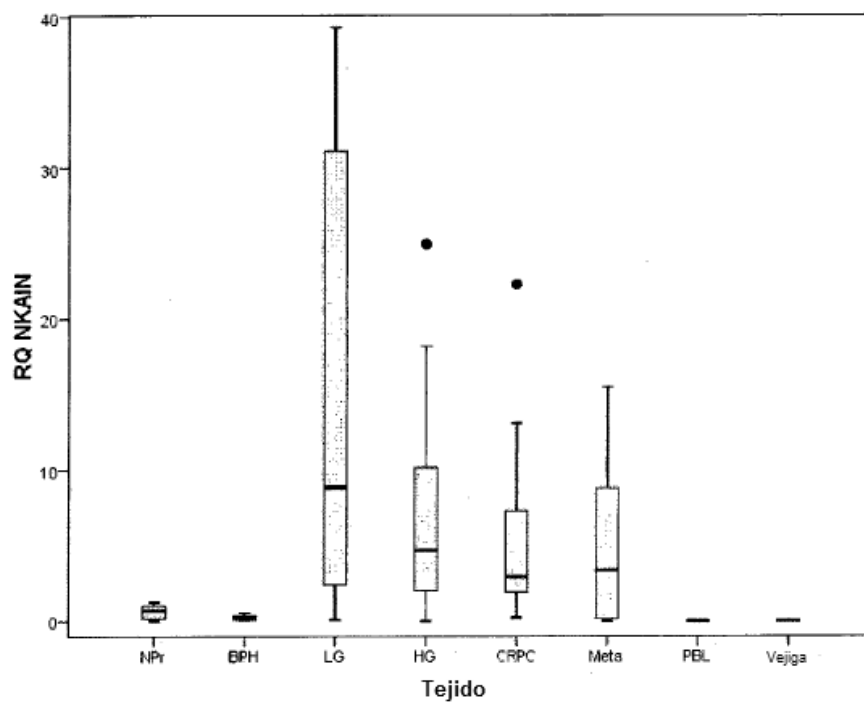


FIGURA 22

| NKAIN1                      | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 3,46                   | 0,70         | 0,65       |
| BPH                         | 3,39                   | 0,23         | 0,25       |
| LG                          | 5,48                   | 8,82         | 15,36      |
| HG                          | 5,27                   | 4,69         | 7,03       |
| CRPC                        | 5,12                   | 2,91         | 5,51       |
| Meta                        | 5,58                   | 3,34         | 5,00       |
| Vejiga normal               | -                      | 0,00         | 0,00       |
| PBL                         | -                      | 0,00         | 0,00       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 0,00         | 0,23       |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 1,24         | 1,79       |

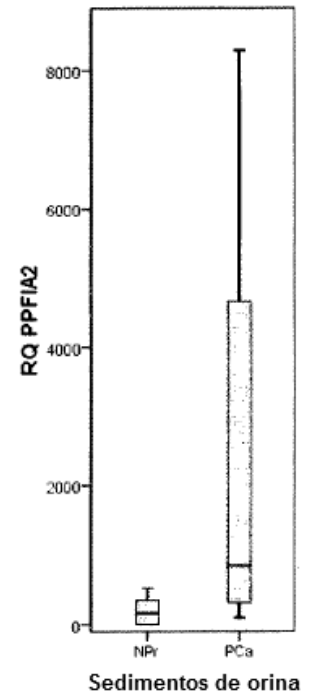
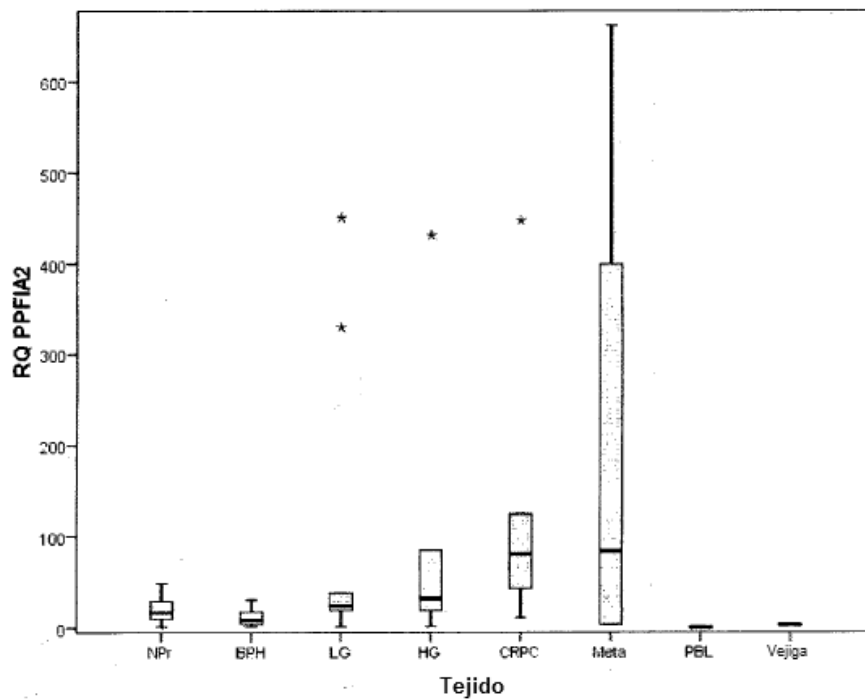
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 23**

| <b>PPFIA2</b>               | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media(RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|-----------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA      |
| NPr                         | 3,60                   | 16,37        | 20,07     |
| BPH                         | 3,18                   | 8,37         | 11,72     |
| LG                          | 4,48                   | 23,66        | 153,69    |
| HG                          | 5,92                   | 32,09        | 187,28    |
| CRPC                        | 5,71                   | 80,95        | 480,83    |
| Meta                        | 7,40                   | 84,10        | 222,19    |
| Vejiga normal               | -                      | 2,95         | 2,95      |
| PBL                         | -                      | 0,00         | 0,00      |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 158,13       | 197,22    |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 844,53       | 6002,15   |

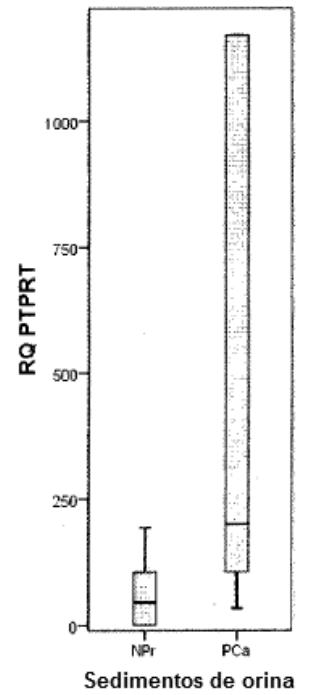
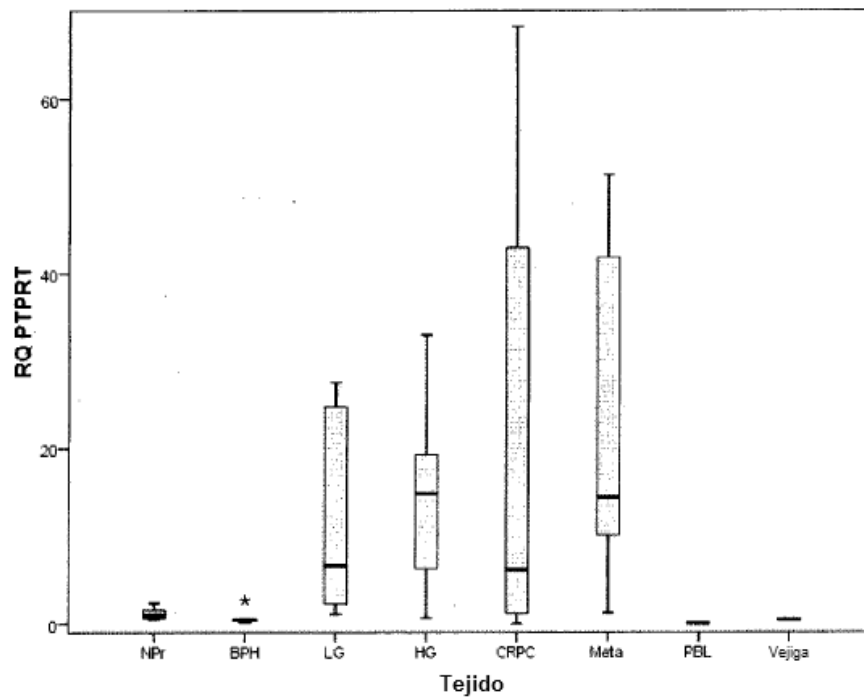
Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 24**

| <b>PTPRT</b>                | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 3,09                   | 0,96         | 1,16       |
| BPH                         | 3,11                   | 0,41         | 0,74       |
| LG                          | 5,08                   | 6,61         | 20,58      |
| HG                          | 5,25                   | 14,85        | 28,94      |
| CRPC                        | 6,17                   | 6,15         | 40,79      |
| Meta                        | 6,56                   | 14,41        | 38,11      |
| Vejiga normal               | -                      | 0,38         | 0,38       |
| PBL                         | -                      | 0,00         | 0,00       |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 44,63        | 64,48      |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 200,30       | 2472,46    |

Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 25**

| <b>TDRD1</b>                | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|-----------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA      |
| NPr                         | 3,59                   | 5,56         | 8,56      |
| BPH                         | 3,64                   | 3,41         | 13,20     |
| LG                          | 6,60                   | 1259,10      | 1575,97   |
| HG                          | 6,46                   | 405,62       | 781,12    |
| CRPC                        | 7,24                   | 669,06       | 917,54    |
| Meta                        | 6,85                   | 343,05       | 567,62    |
| Vejiga normal               | -                      | 0,02         | 0,02      |
| PBL                         | -                      | 8,20         | 8,20      |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 1,53         | 69,46     |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 36,08        | 103,11    |

Análisis de TLDA en diagramas de caja:

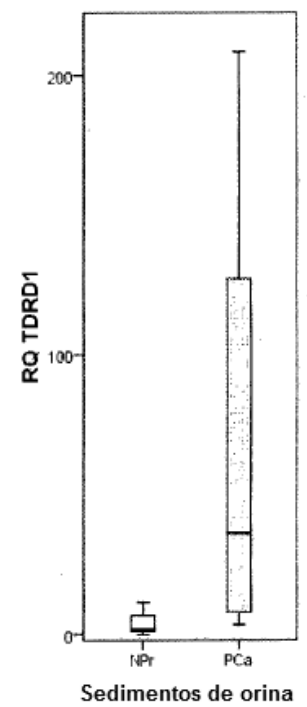
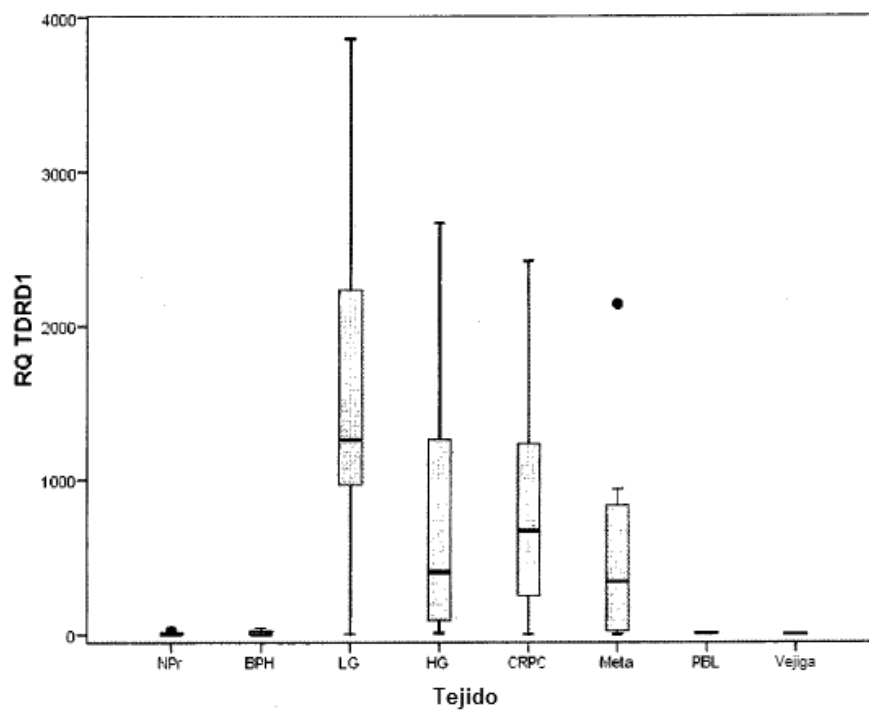
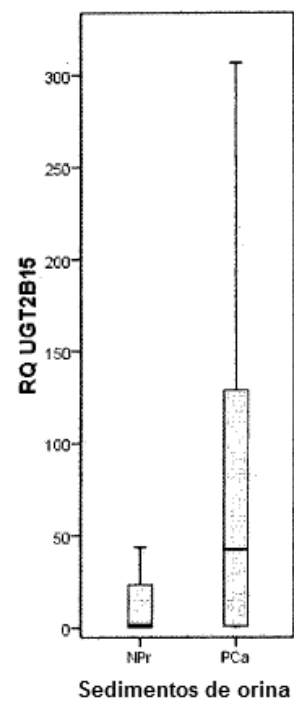
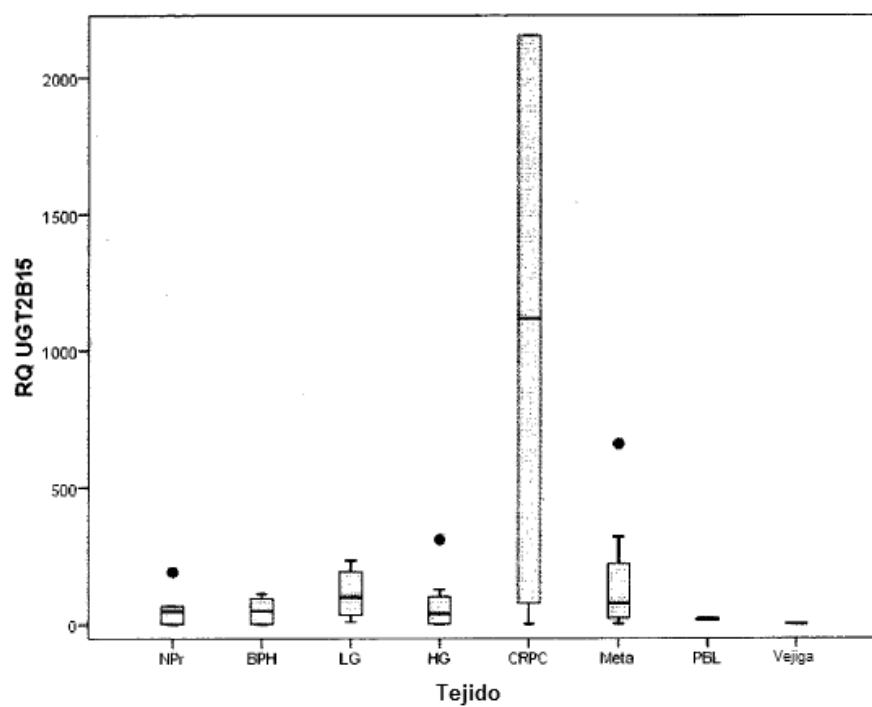


FIGURA 26

| UGT2B15                     | Media <sup>2</sup> log | Mediana (RQ) | Media (RQ) |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------|
|                             | Genechip®              | TLDA         | TLDA       |
| NPr                         | 3,51                   | 49,36        | 59,65      |
| BPH                         | 3,63                   | 49,18        | 51,20      |
| LG                          | 3,90                   | 98,95        | 259,68     |
| HG                          | 3,77                   | 39,29        | 1466,99    |
| CRPC                        | 5,90                   | 1117,45      | 11490,74   |
| Meta                        | 4,06                   | 76,94        | 162,62     |
| Vejiga normal               | -                      | 1,00         | 1,00       |
| PBL                         | -                      | 18,34        | 18,34      |
| Sedimento urinario sin PrCa | -                      | 1,00         | 13,52      |
| Sedimento urinario PrCa     | -                      | 42,52        | 84,53      |

Análisis de TLDA en diagramas de caja:



**FIGURA 27****Homeosecuencia C6 (HOXC6) de *Homo sapiens*, variante 1 de transcrito**

```

ttttgtctgt cctggattgg agccgtccct ataaccatct agttccgagt acaaactgga
gacagaaata aatattaaag aaatcataga ccgaccaggt aaaggcaaag ggatgaattc
ctacttcaact aacccttccct tatcctgccca cctcgccggg ggccaggacg tctctcccaa
cgtcgccctc aattccaccg cctatgatcc agtgaggcat ttctcgacct atggagcggc
cgttgccagc aaccggatct actcgactcc cttttattcg ccacaggaga atgtcgtggt
cagttccagc cggggggcgt atgactatgg atctaattcc ttttaccagg agaaagacat
gctctcaaac tgcagacaaa acaccttagg acataacaca cagacctcaa tcgctcagga
ttttagttct gagcagggca ggactgcgcc ccaggaccag aaagccagta tccagattta
cccctggatg cagcgaatga attcgcacag tggggtcggc tacggagcgg accggaggcg
cggccgccag atctactcgc ggtaccagac cctggaactg gagaaggaat ttcacttcaa
tcgctaccta acgcggcgcc ggcgcatcga gatcgccaac gcgctttgcc tgaccgagcg
acagatcaaa atctggttcc agaaccgccg gatgaagtgg aaaaaagaat ctaatctcac
atccactctc tcggggggcg gcggaggggc caccgccgac agcctgggcg gaaaagagga
aaagcgggaa gagacagaag aggagaagca gaaagagtga ccaggactgt ccctgccacc
cctctctccc tttctccctc gctccccacc aactctcccc taatcacaca ctctgtattt
atcactggca caattgatgt gttttgatcc cctaaaacaa aattagggag tcaaactgtg
acctgaaagt cagctctgga cccctccct caccgcacaa ctctctttca ccacgcgct
cctcctctc gtcctcttgc tagctcgttc tcggcttgtc tacaggccct tttccccgtc
caggccttgg gggctcggac cctgaactca gactctacag attgccctcc aagtgaggac
ttggctcccc cactccttcg acgccccac ccccgcccc cgtgcagaga gccggtcct
gggctgctg gggcctctgc tccagggcct cagggcccg cctggcagcc ggggagggcc
ggaggcccaa ggagggcgcg ccttggcccc acaccaaccc ccagggcctc ccgcagtc
ctgcctagcc cctctgcccc agcaaatgcc cagcccaggc aaattgtatt taaagaatcc
tgggggtcat tatggcattt tacaaactgt gaccgtttct gtgtgaagat ttttagctgt
atgtgtggtc tctgtattta tatttatggt tagcaccgtc agtgttccta tccaatttca
aaaaaggaaa aaaaagaggg aaaattacaa aaagagagaa aaaaagtga tgacgtttgt
ttagccagta ggagaaaata aataaataaa taaatccctt cgtgttacct tctgtataa
atccaacctc tgggtccgtt ctogaatatt taataaaact gatattattt ttaaaacttt

```

a

```

MNSYFTNP SLSCHLAGGQDVL PNVALNSTAYDPVRH FSTYGA AVAQNRIYSTPFYSPQEN VVFSSSRGPYDY
GSNSFYQE KDMLSNCRQNTLGHNTQT SIAQDFSSEQGR TAPQDQKASI QIYPWMQRMNSHSGVGYGADRRRG
RQIYSRYQTLELEKEFHFNRYL TRRRRIEIANALCLTERQIKIW FQNRRMKWKKESNLSTLSGGGGGATAD
SLGGKEEKREETEEKQKE

```

**FIGURA 28****Proteína 2 relacionada con la rizada segregada (SFRP2) de *Homo sapiens***

```

caacggctca ttctgtctcc ccgggtcgga gccccccgga gctgcgcgcg ggcttgacgc
gcctcgcccg cgctgtctcc ccgggtgtccc gcttctccgc gcccagccg ccggctgcca
gcttttcggg gcccagagtc gcaccagcg aagagagcgg gcccgggaca agctcgaact
ccggccgcct cgcccttccc cggtccgct cctctgccc cctcggggtc gcgcgccac
gatgctgcag ggccctggct cgctgtgtgt gctcttctc gcctcgact gctgcctggg
ctcggcgcgc gggctcttcc tctttggcca gccgacttc tctacaagc gcagcaattg
caagcccatc cctgccaaac tgcagctgtg ccacggcatc gaataccaga acatgcggct
gcccaacctg ctgggccacg agaccatgaa ggaggtgtgt gagcaggccg gcgcttgat
cccgtgtgtc atgaagcagt gccaccgga caccaagaag ttcctgtgtc cgctcttcgc
ccccgtctgc ctcgatgacc tagacgagac catccagcca tgccactcgc tctgcgtgca
ggtgaaggac cgctgcgccc cggtcatgtc cgccttcggc tccccctggc ccgacatgct
tgagtgcgac cgtttccccc aggacaacga cttttgcac cccctcgcta gcagcgacca
cctcctgcca gccaccgagg aagctccaaa ggtatgtgaa gcctgcaaaa ataaaaatga
tgatgacaac gacataatgg aaacgctttg taaaaatgat tttgcaactga aaataaaagt
gaaggagata acctacatca accgagatac caaatcatc ctggagacca agagcaagac
catttacaag ctgaacggtg tgccgaaaag ggacctgaag aaatcggtgc tgtggctcaa
agacagcttg cagtgcacct gtgaggagat gaacgacatc aacgcgcctt atctggctat
gggacagaaa caggggtggg agctggtgat cacctcggtg aagcggtggc agaaggggca
gagagagttc aagcgcactt ccgcagcat ccgcaagctg cagtgtagt cccggcatcc
tgatggctcc gacaggcctg ctccagagca cggctgacca tttctgtccc gggatctcag
ctcccgttcc ccaagcacac tctagctgc tccagtctca gcctgggcag cttccccctg
ccttttgac gtttgcatcc ccagcatttc ctgagttata aggccacagg agtgatagc
tgttttcacc taaaggaaaa gccaccgga atcttgtaga aatattcaaa ctaataaaat
catgaatatt tttatgaagt ttaaaaatag ctcactttaa agctagtttt gaataggtgc
aactgtgact tgggtctggt tgggtgtgtt ttgttgtttt gagtcagctg attttcactt
cccactgagg ttgtcataac atgcaaattg cttcaatttt ctctgtggcc caaacttgtg
ggtcacaaac cctgttgaga taaagctggc tggtatctca acatcttcat cagctccaga
ctgagactca gtgtctaagt cttacaacaa ttcactatct tataccttca atgggaactt
aaactgttac atgtatcaca ttccagctac aatacttcca tttattagaa gcacattaac
catttctata gcatgatttc ttcaagtaaa aggcaaaaga tataaatttt ataattgact
tgagtacttt aagccttggt taaaacattt cttacttaac ttttgcaaat taaaccatt
gtagcttacc tgtaatatata atagtagttt acctttaaaa gttgtaaaaa tattgcttta
accaacactg taaatatatt agataaacat tatattcttg tatataaact ttacatcctg
ttttacctat aaaaaaaaaa aaaaa

```

MLQPGSLLLLFLASHCCLGSARGFLFLGQPDFSYKRSNCKPIPANLQLCHGIEYQNMRLPNLLGHETMKE  
VLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDLDETIQPCHSLCVQVKDRCAPVMSAFGFPWPDMLEC  
DRFPQDNDLCIPLASSDHLHPATEEAPKVCEACKNKNDNDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKII  
LETKSKTIYKLVNSERDLKKSVLWLKDSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGELVITSVKRWQKGQREFK  
RISRSIRKLQC

**FIGURA 29****Homeosecuencia D10 (HOXD10) de *Homo sapiens***

```

cggggaatgt tttcctagag atgtcagcct acaaaggaca caatctctct tcttcaaatt
cttccccaaa atgtcctttc ccaacagctc tcttgctgct aatacttttt tagtagattc
cttgatcagt gcctgcagga gtgacagttt ttattccagc agcgccagca tgtacatgcc
accacctagc gcagacatgg ggacctatgg aatgcaaacc tgtggactgc tcccgctctc
ggccaaaaga gaagtgaacc accaaaatat gggatatgaat gtgcatcctt atatacctca
agtagacagt tggacagatc cgaacagatc ttgtcgaata gagcaacctg ttacacagca
agtccccact tgctccttca ccaccaacat taaggaagaa tccaattgct gcatgtattc
tgataagcgc aacaaactca tttcggccga ggtcccttcg taccagagggc tggtccttga
gtcttgctcc gttgagaacc ctgaggttcc cgtccctgga tatttttagac tgagtcagac
ctacgccacc gggaaaacc aagagtacaa taatagcccc gaaggcagct ccactgtcat
gctccagctc aaccctcgtg gcgcggccaa gccgcagctc tccgctgccc agctgcagat
ggaaaagaag atgaacgagc ccgtgagcgg ccaggagccc accaaagtct ccagggtgga
gagccccgag gccaaaggcg gccttcccga agagaggagc tgcctggctg aggtctccgt
gtccagtcct gaagtgcagg agaaggaaag caaagaggaa atcaagtctg atacaccaac
cagcaattgg ctactgcaa agagtggcag aaagaagagg tgcccttaca ctaagcacca
aacgctggaa ttagaaaaag agttcttggt caatatgtac ctcaccgcg agcgccgcct
agagatcagt aagagcgtta acctcaccga caggcaggtc aagatttggg ttcaaaaccg
ccgaatgaaa ctcaagaaga tgagccgaga gaaccggatc cgagaactga ccgccaacct
cacgttttct taggtctgag gccggtctga ggccggtcag aggccaggat tggagagggg
gcaccgcgtt ccaggggcca gtgctggagg actgggaaag cggaacaaa accttcaccg
ctctttgttt gttgttttgt tgtattttgt tttcctgcta gaatgtgact ttgggggtcat
tatgttcgtg ctgcaagtga tctgtaatcc ctatgagtat atatatatat atatatatat
atatataaaa acttagcacg tgtaatttat ttttttttca tcgtaatgca gggtaactat
tattgogcat tttcatttgg gtcttaactt attggaactg tagagcatcc atccatccat
ccatccagca atgtgacttt ttcattgtct tcttaacaca aaaggtctat gtgtgtggtt
agtccatgaa ctcatggcat tttgaataca tccagtactt taaaaatgac atatatattt
aaaaaaaaaa gattaagaaa acccacaagt tggaggaggagg gggacttaaa aagcacatta
caatgtatct tttcacaaat gaatttagca gttgtccttg gtgagatggg atattggcga
tttatgcctt gtagcctttc ccttggtgtg catctgtggt ttggtagaag tacaacagca
acctgtcctt tctgtgcatg ttctggtcgc atgtataatg caataaactc tggaaatgag
ttcaaaaaaa aaaa

```

```

MSFPNSSPAANTFLVDSLISACRSDSFYSSSASMYMPPPSADMGTYGMQTCGLLP SLAKREVNHQNMG
MNVHPYIPQVDSWTDPNRSCRIEQPVTQQVPTCSFTTNIKEESNCCMYSDKRNLISAEVPSYQRLVP
ESCPVENPEVPVPGYFRLSQTYATGKTQEYNNSEPGSSTVMLQLNPRGAAPQLSAAQLQMEKKMNEP
VSGQEPTKVSQVESPEAKGGLPEERSCLAESVSSPEVQEKESKEEIKSDTPTSNWLTAKSGRKKRCP
YTKHQTLLELEKEFLFNMYLTRERRLEISKSVNLTDQRQVKIWFQNRMRMLKKMSRENRIREL TANLTFS

```

**FIGURA 30****Receptor B sin interés comercial relacionado con RAR (RORB) de *Homo sapiens***

```

tctctccct  ctctttctct  ctcgtgctc  ctttctccc  tgtaactgaa  cagtgaaaat
tcacattgtg  gatccgctaa  caggcacaga  tgtcatgtga  aaacgcacat  gctctgccat
ccacaccgcc  tttctttctt  ttctttctgt  ttctttttt  ccccttgtt  ccttctccct
cttctttgta  actaacaaaa  ccaccacca  ctctctctcc  tgctgctgcc  ctctctctc
ctctcagtc  caagtgatca  caaaagaaat  cttctgagcc  ggaggcggtg  gcatttttta
aaaagcaagc  acattggaga  gaaagaaaaa  gaaaaacaaa  accaaaacaa  aaccaggca
ccagacagcc  agaacatttt  tttttcaccc  ttctgaaaa  caaacaaaca  aacaaacaat
catcaaaaca  gtcaccacca  acatcaaaac  tgtaaacata  gcggcgcgcg  cggcaaacgt
caccctgcag  ccacggcgtc  cgcctaaagg  gatggttttc  tcggcagagc  agctcttcgc
cgaccacctt  cttcactcgt  gctgagcggg  atttttgggc  tctccggggt  tcgggctggg
agcagcttca  tgactacgcg  gagcgggaga  gcggccacac  catgcgagca  caaattgaag
tgataccatg  caaaatttgt  ggcgataagt  cctctgggat  ccactacgga  gtcatcacat
gtgaaggctg  caagggatcc  tttaggagga  gccagcagaa  caatgcttct  tattcctgcc
caaggcagag  aaactgttta  attgacagaa  cgaacagaaa  ccgttgccaa  cactgccgac
tgcagaagtg  tcttgcccta  ggaatgtcaa  gagatgctgt  gaagtgtggg  aggatgtcca
agaagcaaag  ggacagcctg  tatgctgagg  tgcagaagca  ccagcagcgg  ctgcaggaac
agcggcagca  gcagagtggg  gaggcagaag  cccttgccag  ggtgtacagc  agcagcatta
gcaacggcct  gagcaacctg  aacaacgaga  ccagcggcac  ttatgccaac  gggcacgtca
ttgacctgcc  caagtctgag  ggttattaca  acgtcgattc  cggtcagccg  tccctgatc
agtcaggact  tgacatgact  ggaatcaaac  agataaagca  agaacctatc  tatgacctca
catccgtacc  caacttgttt  acctatagct  ctttcaacaa  tgggcagtta  gcaccaggga
taaccatgac  tgaaatcgac  cgaattgcac  agaacatcat  taagtcccat  ttggagacat
gtcaatacac  catggaagag  ctgcaccagc  tggcgtggca  gaccacacc  tatgaagaaa
ttaaagcata  tcaaagcaag  tccagggaag  cactgtggca  acaatgtgcc  atccagatca
ctcacgccat  ccaatacgtg  gtggagtgtt  caaagcggat  aacaggcttc  atggagctct
gtcaaaatga  tcaaattcta  cttctgaagt  caggttgctt  ggaagtgggt  ttagtgagaa
tgtgccgtgc  cttcaacca  ttaaacaaca  ctgttctgtt  tgaaggaaaa  tatggaggaa
tgcaaatgtt  caaagcctta  ggttctgatg  acctagttaa  tgaagcattt  gactttgcaa
agaatttgtg  ttcttgcag  ctgaccgagg  aggagatcgc  tttgttctca  tctgctgttc
tgatatctcc  agaccgagcc  tggcttatag  aaccaaggaa  agtcagaag  cttcaggaaa
aaatttattt  tgcacttcaa  catgtgatcc  agaagaatca  cctggatgat  gagaccttgg
caaagttaat  agccaagata  ccaaccatca  cggcagtttg  caacttgcac  ggggagaagc
tgcaggtatt  taagcaatct  catccagaga  tagtgaatac  actgtttcct  ccgttataca
aggagctctt  taatcctgac  tgtgccaccg  gctgcaaatg  aaggggacaa  gagaactgtc
tcatagtcat  ggaatgcac  accattaaga  caaaagcaat  gtgttcatga  agacttaaga
aaaatgtcac  tactgcaaca  ttaggaatgt  cctgcactta  atagaattat  ttttcaccgc
tacagtttga  agaattgaaa  tatgcacctg  agtggggctc  ttttatttgt  ttgtttgttt
ttgaaatgac  cataaatata  caaatatagg  aactgggtg  ttatcctttt  ttaattttta
ttcgggtatg  ttttgggaga  caactgttta  tagaatttta  ttgtagatat  atacaagaaa
agagcggtag  tttacatgat  tacttttctc  gttgattgtt  caaatataat  ttaagaaaat
tccacttaat  aggcttacct  atttctatgt  ttttaggtag  ttgatgcatg  tgtaaatgtg

```

tagctgtcctt ggaaagtact gtgcatgtat gtaataagta tataatatgt gagaatatta  
tatatgacta ttacttatac atgcacatgc actgtggcctt aaataccata cctactagca  
atggagggtc agtcaggctc tcttctatga tttaccttct gtgttatatg ttacctttat  
gttagacaat caggattttg ttttcccagc cagagttttc atctatagtc aatggcagga  
cggtagcaac tcagaggttaa gtctacaaag gaataaacat aatgtgtggc ctctatatac  
aaactctatt tctgtcaatg acatcaaagc cttgtcaaga tggttcatat tgggaaggag  
acagtatttt aagccatttt cctgtttcaa gaattaggcc acagataaca ttgcaaggtc  
caagactttt ttgaccaaac agtagatatt ttctattttt caccagaaca cataaaaaca  
ctttttttct tttggatttc tggttgtgaa acaagcttga tttcagtgtc tattgtgtct  
tcaactgaaa aatacaatct gtggattatg actaccagca atttttttct aggaaagtta  
aaagaataaa tcagaaccca gggcaacaat gccatttcat gtaaaccattt tctctctcac  
catgttttgg caagaaaagg tagaaagaga agaccagag tgaagaagta attctttata  
ttccttttct taatgtattt gttaggaaaa gtggcaataa agggggaggc atattataaa  
atgctataat ataaaaatgt agcaaaaact tgacagacta gaaaaaaaaa gatctgtgtt  
attctagggg actaatgtac cccaaagcca aaactaattc ctgtgaagtt tacagttaca  
tcatccattt accctagaat tattttttta gcaactttta gaaataaaga atacaactgt  
gacattagga tcagagattt tagacttcct tgtacaaatt ctcacttctc cacctgctca  
ccaatgaaat taatcataag aaaagcatat attccaagaa atttgttctg cctgtgtcct  
ggaggcctat acctctgtta ttttctgata caaataaaaa cttaaaaaaa agaaaacaag  
ctaa

MRAQIEVIPCKICGDKSSGIHYGVITCEGCKGFFRRSQONNASYSCPRQRNCLIDRTNRNRCQHCRLO  
KCLALGMSRDAVKFGRMSKKQRDSLYAEVQKHQQRLQEQRQQQSGEAEALARVYSSSISNGLSNLNNE  
TSGTYANGHVIDLPKSEGYYNVDSGQSPDQSGGLDMTGKQIKQEPIYDLTSVPNLFTYSSFNNQOLA  
PGITMTEIDRIAQNIKSHLETCQYTMEELHQLAWQTHTYEEIKAYQSKSREALWQQCAIQITHAIQY  
VVEFAKRITGFMELCQNDQILLKSGCLEVVLVRMCRAFNP LNNTVLFEGKYGGMQMFKALGSDDLNVN  
EAFDFAKNLCSLQLTEEEIALFSSAVLISPDRAWLIEPRKVQKLQEKIYFALQHVIQKNHLDDETLAK  
LIAKIPTITAVCNLHGEKLQVFKQSHPEIVNTLFPPLYKELFNPDCATGCK

**FIGURA 31****Ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) de *Homo sapiens***

```

aggcgcagcc aatgggaagg gtcggaggca tggcacagcc aatgggaagg gccggggcac
caaagccaat gggaagggcc gggagcgcgc ggcgcgggag atttaaaggc tgctggagtg
aggggtcgcc cgtgcaccct gtcccagccg tcctgtcctg gctgctcgct ctgcttcgct
gcgcctccac tatgtctctc ctccgtgtcc cgctcgcgcc catcacggac ccgcagcagc
tgcagctctc gccgctgaag gggctcagct tggctgacaa ggagaacacg ccgccggccc
tgagcgggac ccgcgtcctg gccagcaaga ccgcgaggag gatcttccag gagcccacgg
agccgaaaac taaagcagct gccccggcg tggaggatga gccgctgctg agagaaaacc
cccgccgctt tgtcatcttc cccatcgagt accatgatat ctggcagatg tataagaagg
cagaggcttc cttttggacc gccgaggagg tggacctctc caaggacatt cagcactggg
aatccctgaa acccgaggag agatatttta tatcccatgt tctggcttctc tttgcagcaa
gcgatggcat agtaaatgaa aacttgggtg agcgatttag ccaagaagtt cagattacag
aagcccgtg tttctatggc ttccaaattg ccatggaaaa catacattct gaaatgtata
gtcttcttat tgacacttac ataaaagatc ccaaagaaag ggaatttctc ttcaatgccaa
ttgaaacgat gccttgtgtc aagaagaagg cagactgggc cttgcgctgg attggggaca
aagaggctac ctatggtgaa cgtgtttag cctttgctgc agtggaaggc attttctttt
ccggttcttt tgcgtcgata ttctggctca agaaacgagg actgatgcct ggctcacat
tttctaata gaactattagc agagatgagg gtttacactg tgattttgct tgctgatgt
tcaaacacct ggtacacaaa ccatcgagg agagagtaag agaaataatt atcaatgctg
ttcgataga acaggagtcc ctactgagg ccttgccctg gaagctcatt gggatgaatt
gcactctaata gaagcaatac attgagtttg tggcagacag acttatgctg gaactgggtt
ttagcaaggt tttcagagta gagaacccat ttgactttat ggagaatatt tcaactggaag
gaaagactaa cttcttttag aagagagtag gcgagtatca gaggatggga gtgatgtcaa
gtccaacaga gaattctttt accttgtag ctgacttcta aatgaactga agatgtgccc
ttacttggct gatttttttt ttccatctca taagaaaaat cagctgaagt gttaccaact
agccacacca tgaattgtcc gtaatgttca ttaacagcat ctttaaaact gtgtagctac
ctcacaacca gtctgtctg tttatagtgc tggtagtata accttttgcc agaaggcctg
gctggctgtg acttaccata gcagtacaa tggcagctct ggctttaaag tgaggggtga
ccctttagt agcttagcac agcgggatta aacagtcctt taaccagcac agccagttaa
aagatgcagc ctactgctt caacgcagat tttaatgttt acttaaatat aaacctggca
ctttacaaac aaataaacat tgtttgtact cacaaggcga taatagcttg atttatttgg
tttctacacc aaatacatte tcctgaccac taatgggagc caattcacia ttactaagt
gactaaagta agttaaactt gtgtagacta agcatgtaat ttttaagttt tattttaatg
aattaaaata tttgttaacc aactttaaag tcagtccctg gtatacctag atattagtca
gttgggtgcca gatagaagac aggttgtgtt tttatcctgt ggcttgtgta gtgtcctggg
attctctgcc ccctctgagt agagtgttgt gggataaagg aatctctcag ggcaaggagc
ttcttaagtt aaatcactag aaatttaggg gtgatctggg ccttcatatg tgtgagaagc
cgtttcattt ttttctcac tgtattttcc tcaacgtctg gttgatgaga aaaaattctt
gaagagtttt catatgtggg agctaaggta gtattgtaaa atttcaagtc atccttaaac
aaaatgatcc acctaagatc ttgcccctgt taagtgggtga aatcaactag aggtggttcc
tacaagttgt tcattctagt tttgtttggg gtaagtaggt tgtgtgagtt aattcattta
tatttactat gtctgttaaa tcagaaattt tttattatct atgttcttct agattttacc
tgtagttcat acttcagtca cccagtgtct tattctggca ttgtctaaat ctgagcattg

```

tctaggggga tcttaaaactt tagtaggaaa ccatgagctg ttaatacagt ttccattcaa  
 atattaattt cagaatgaaa cataatTTTT tttttttttt ttgagatgga gtctcgctct  
 gttgcccgagg ctggagtgca gtggcgcgat tttggctcac tgtaacctcc atctcctggg  
 ttcaagcaat tctcctgtct cagcctccct agtagctggg actgcaggta tgtgctacca  
 cacctggcta atttttgtat ttttagtaga gatggagttt caccatattg gtcaggctgg  
 tcttgaactc ctgacctcag gtgatccacc cacctcggcc tcccaaagtg ctgggattgc  
 aggcgtgata aacaaatatt cttaataggg ctactttgaa ttaatctgcc tttatgtttg  
 ggagaagaaa gctgagacat tgcataaag atgatgagag ataaatgttg atcttttggc  
 ccattttgtt aattgtattc agtatttgaa cgtcgtcctg tttattgtta gttttcttca  
 tcatttattg tatagacaat ttttaaactc ctgtaatatg atacattttc ctatctttta  
 agttattgtt acctaaagt aatccagatt atatggctct tatatgtgta caacattaaa  
 atgaaaggct ttgtcttgca ttgtgaggta caggcggaag ttggaatcag gttttaggat  
 tctgtctctc attagctgaa taatgtgagg attaacttct gccagctcag accatttctc  
 aatcagttga aagggaaca agtatttcag tctcaaaatt gaataatgca caagtcttaa  
 gtgattaaaa taaaactgtt cttatgtcag tttcaaaaaa aaaaaaaaaa aa

MSLRVPLAPITDPQQLQLSPLKGLSLVDKENTPPALSGTRVLASKTARRIFQEPTPKTKAAAPGVED  
 EPLLRENPRRFVIFPIEYHDIWQMYKKAESFWTAEVDLSKDIQHWESLKPEERYFISHVLAFFAASD  
 GIVNENLVERFSQEVQITEARCFYGFQIAMENIHSEMYSLIDTYIKDPKEREFLNAIETMPCVKKKA  
 DWALRWIGDKEATYGERVVAFAAVEGIFSGSFASIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLM  
 FKHLVHKPSEERVREIIINAVRIEQEFLTEALPVKLIGMNCTLMKQYIEFVADRLMLELGFSGKVFVRVEN  
 PFDFMENISLEGKTNFFEKRVGEYQRMGMSSPTENSFTLDADF

**FIGURA 32****Transglutaminasa 4 (TGM4) (próstata) de *Homo sapiens***

```

ggaccgactg tgtggaagca ccaggcatca gagatagagt cttccctggc attgcaggag
agaatctgaa gggatgatgg atgcatcaaa agagctgcaa gttctccaca ttgacttctt
gaatcaggac aacgccgttt ctcaccacac atgggagttc caaacgagca gtcctgtgtt
ccggcgagga caggtgtttc acctgcggtt ggtgctgaac cagcccctac aatcctacca
ccaactgaaa ctggaattca gcacagggcc gaatcctagc atcgccaaac acaccctggt
ggtgctcgac ccgaggacgc cctcagacca ctacaactgg caggcaaccc ttcaaaatga
gtctggcaaa gaggtcacag tggctgtcac cagttccccc aatgccatcc tgggcaagta
ccaactaaac gtgaaaactg gaaaccacat ccttaagtct gaagaaaaca tcctatacct
tctcttcaac ccatggtgta aagaggacat ggttttcatg cctgatgagg acgagcgcaa
agagtacatc ctcaatgaca cgggctgcca ttacgtgggg gctgccagaa gtatcaaatg
caaaccctgg aactttggtc agtttgagaa aaatgtcctg gactgctgca tttccctgct
gactgagagc tccctcaagc ccacagatag gagggacccc gtgctgggtg gcagggccat
gtgtgctatg atgagctttg agaaaggcca gggcgtgctc attgggaatt ggactgggga
ctacgaaggt ggcacagccc catacaagtg gacaggcagt gccccgatcc tgcagcagta
ctacaacacg aagcaggctg tgtgcttttg ccagtgtgtg gtgtttgctg ggatcctgac
tacagtgtgt agagcgttgg gcatcccgac acgcagtgtg acaggcttctg attcagctca
cgacaçagaa aggaacctca cgggtggacac ctatgtgaat gagaatggcg agaaaatcac
cagtatgacc cagactctg tctggaattt ccatgtgtgg acggatgcct ggatgaagcg
accggtatctg cccaagggct acgacggctg gcaggctgtg gacgcaacgc cgcaggagcg
aagccagggg gtcttctgct gtggggccatc accactgacc gccatccgca aaggtgacat
ctttattgtc tatgacacca gattcgtctt ctcaagaagt aatgggtgaca ggctcatctg
gttggtgaag atgggtgaatg ggcaggagga gttacacgta atttcaatgg agaccacaag
catcgggaaa aacatcagca ccaaggcagt gggccaagac aggcggagag atatcaccta
tgagtacaag tatccagaag gctcctctga ggagaggcag gtcattggatc atgccttctt
ccttctcagt tctgagaggg agcacagacg acctgtaaaa gagaactttc ttcacatgtc
ggtacaatca gatgatgtgc tgcctgggaaa ctctgttaat ttcaccgtga ttcttaaaag
gaagaccgct gccctacaga atgtcaacat cttgggctcc tttgaactac agttgtacac
tggcaagaag atggcaaaac tgtgtgacct caataagacc tgcagatcc aaggtcaagt
atcagaagtg actctgacct tggactccaa gacctacatc aacagcctgg ctatattaga
tgatgagcca gttatcagag gtttcatcat tgcggaaatt gtggagtcta aggaaatcat
ggcctctgaa gtattcacgt ctttccagta cctgagttc tctatagagt tgcctaacac
aggcagaatt ggccagctac ttgtctgcaa ttgtatcttc aagaataccc tggccatccc
tttgactgac gtcaagttct ctttggaag cctgggcctc tctcactac agacctctga
ccatgggacg gtgcagcctg gtgagaccat ccaatcccaa ataaaatgca ccccaataaa
aactggaccc aagaaattta tegtcaagtt aagttccaaa caagtgaag agattaatgc
tcagaagatt gttctcatca ccaagtagcc ttgtctgatg ctgtggagcc ttagttgaga
tttcagcatt tctaccttg tgcttagctt tcagattatg gatgattaaa tttgatgact
tatatgaggg cagattcaag agccagcagg tcaaaaaggc caacacaacc ataagcagcc
agaccacaa ggccaggtcc tgtgctatca cagggtcacc tcttttacag ttagaaacac
cagccgaggc cacagaatcc catccctttc ctgagtcatg gcctcaaaaa tcaggggccac
cattgtctca attcaaatcc atagatttctg aagccacaga gtctctccct ggagcagcag

```

actatgggca gccagtgct gccacctgct gacgacctt gagaagctgc catatcttca  
ggccatgggt tcaccagccc tgaaggcacc tgtcaactgg agtgcctctc cagcactggg  
atgggcctga tagaagtgca ttctcctcct attgcctcca ttctcctctc tctatccctg  
aatccagga agtcctctc ctggtgctcc aagcagtttg aagcccaatc tgcaaggaca  
tttctcaagg gccatgtggt tttgcagaca accctgtcct caggcctgaa ctcaccatag  
agacctatgt cagcaaacgg tgaccagcaa atcctcttcc cttattctaa agctgcccct  
tgggagactc cagggagaag gcattgcttc ctccctgggtg tgaactcttt ctttggtatt  
ccatccacta tcctggcaac tcaaggctgc ttctgttaac tgaagcctgc tccttcttgt  
tctgcccctc agagatttgc tcaaatgatc aataagcttt aaattaaact ctacttcaaa  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

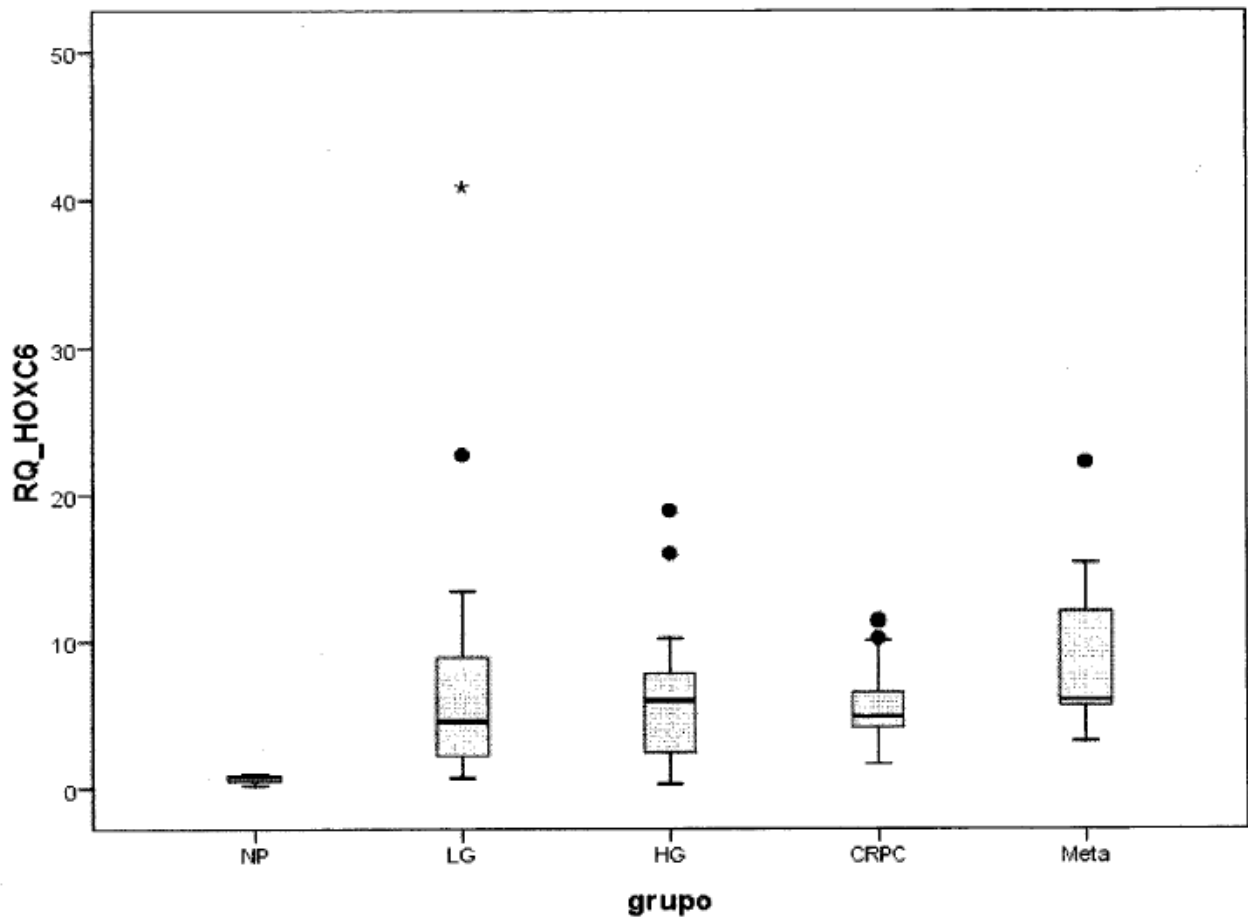
MMDASKELQVLHIDFLNQDNAVSHHTWEFQTSSPVFRRGQVFHLRLVLNQPLQSYHQLKLEFSTGPNP  
SIKHTLVVLDPRTPSDHYNWQATLQNESGKEVTVAVTSSPNAILGKYQLNVKTGNHILKSEENILYL  
LFNPWCKEDMVFMPDEDERKEYILNDTGCHYVGAARSIKCKPWNFGQFEKNVLDCCISLLTESSLKPT  
DRRDPVLVCRAMCAMMSFEKGQGV LIGNWTGDYEGGTAPYKWTGSAPILQQYYNTKQAVCFGQCWVFA  
GILTTVLRALGIPARSVTGFDSAHDTERNLTVDITYVNENGEKITSMTHDSVWNFHVWTD AWMKRPDLP  
KGYDGWQAVDATPQERSQGVFCCGPSPLTAIRKGDIFIVYDTRFVFSEVNGDRLIWLVKMVNGQEELH  
VISMETTSIGKNISTKAVGQDRRRDITYEYKYPEGSSEERQVMDHAFLLLSSEREHRRPVKENFLHMS  
VQSDDVLLGNSVNFTVILKRKTAALQNVNIGSFELQLYTGKKMAKLCDLNKTSQIQGQVSEVTLTLD  
SKTYINSLAILDDEPVIRGFIIAEIVESKEIMASEVFTSFQYPEFSIELPNTGRIGQLLVCNCIFKNT  
LAIPLT DVKFSLESLSLQTS DHGTVQPGETIQSQIKCTPIKTGPKKFIVKLSSKQVKEINAQKIV  
LITK

**FIGURA 33**

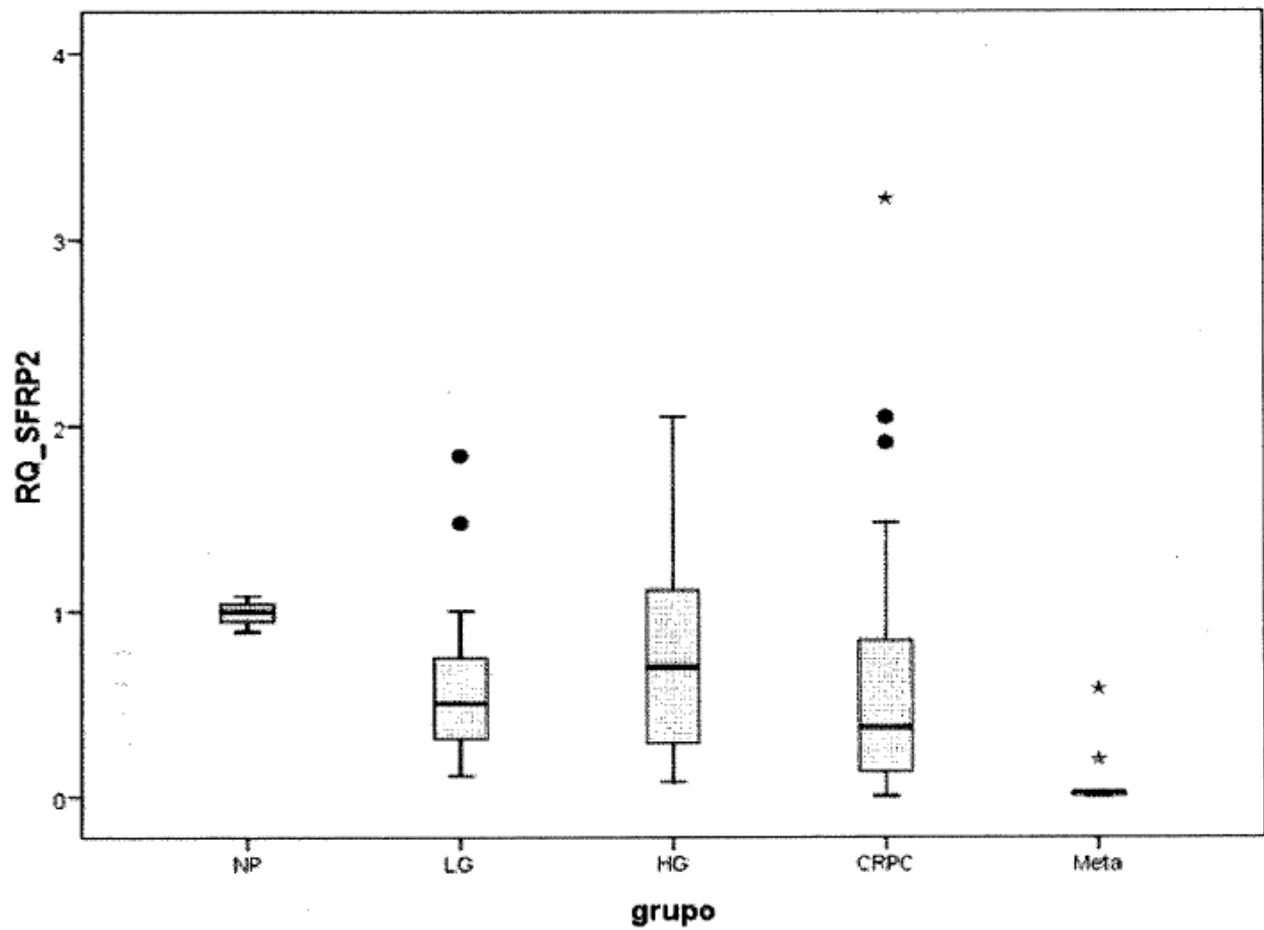
**Homólogo 2 de caracol de *Homo sapiens* (*Drosophila*) (SNAI2)**

agttcgtaaa ggagccgggt gacttcagag gcgcgggccc gtccgtctgc cgcacctgag  
cacggcccct gcccgagcct ggcccgccgc gatgctgtag ggaccgccgt gtccctccgc  
cggaccgtta tccgcgccgg gcgcgggcca gaccgctgg caagatgccg cgctccttcc  
tgggtcaagaa gcatttcaac gcctccaaaa agccaaacta cagcgaactg gacacacata  
cagtgattat ttccccgtat ctctatgaga gttactccat gcctgtcata ccacaaccag  
agatcctcag ctcaggagca tacagcccca tcaactgtgtg gactaccgct gctccattcc  
acgcccagct acccaatggc ctctctcctc tttccggata ctctcatct ttggggcgag  
tgagtcccc tctccatct gacacctct ccaaggacca cagtggctca gaaagcccca  
ttagtgatga agaggaaaga ctacagtcca agctttcaga ccccatgcc attgaagctg  
aaaagtttca gtgcaattta tgcaataaga cctattcaac tttttctggg ctggccaaac  
ataagcagct gcactgcgat gccagctta gaaaatcttt cagctgtaaa tactgtgaca  
aggaatatgt gagcctgggc gccctgaaga tgcataattcg gaccacaca ttacctgtg  
tttgcaagat ctgcggcaag gcgttttcca gaccctggtt gcttcaagga cacattagaa  
ctcacacggg ggagaagcct tttcttgcc ctactgcaa cagagcattt gcagacaggt  
caaactctgag ggctcatctg cagaccatt ctgatgtaaa gaaataccag tgcaaaaact  
gtccaaaaac cttctccaga atgtctctcc tgcacaaaca tgaggaatct ggctgtgtg  
tagcacactg agtgacgcaa tcaatgttta ctgaacaga atgcatttct tcaactcgaa  
gccaaatgac aaataaagtc caaaggcatt ttctcctgtg ctgaccaacc aaataatatg  
tatagacaca cacacatatg cacacacaca cacacacacc cacagagaga gagctgcaag  
agcatggaat tcatgtgttt aaagataatc ctttccatgt gaagtttaaa attactatat  
atgtgctgat ggctagattg agagaataaa agacagtaac ctttctcttc aaagataaaa  
tgaaaagcac attgcatctt ttcttcttaa aaaaatgcaa agatttacat tgctgccaaa  
tcatttcaac tgaaaagaac agtattgctt tgtaatatag tctgtaatat gatitcccat  
aggaagagat ctgccagacg cgaactcagg tgccctaaaa agtattccaa gtttactcca  
ttacatgtcg gttgtctggg tgccattggt gaactaaagc ctttttttga ttacctgtag  
tgctttaaag tatattttta aaaggaggga aaaaaataac aagaacaaaa cacaggagaa  
tgtattaaaa gtatttttgt tttgttttgt ttttgccaat taacagtatg tgccctgggg  
gaggaggga agattagctt tgaacattcc tggcgcatgc tccattgtct tactatttta  
aaacatttta ataatttttg aaaattaatt aaagatggga ataagtgcaa aagaggattc  
ttacaaattc attaatgtac ttaaactatt tcaaatgcat accacaaatg caataatata  
ataccccttc caagtgcctt tttaaattgt atagttgatg agtcaatgta aatttgtgtt  
tatttttata tgattgaatg agttctgtat gaaactgaga tgttgtctat agctatgtct  
ataaacaacc tgaagacttg tgaaatcaat gtttcttttt taaaaaaca ttttcaagtt  
ttttttacaa taaacagttt tgatttaaaa tctcgtttgt atactatttt cagagacttt  
acttgcttca tgattagtac caaaccactg taaaaagaat tgtttggtta caagaaaaaa  
a

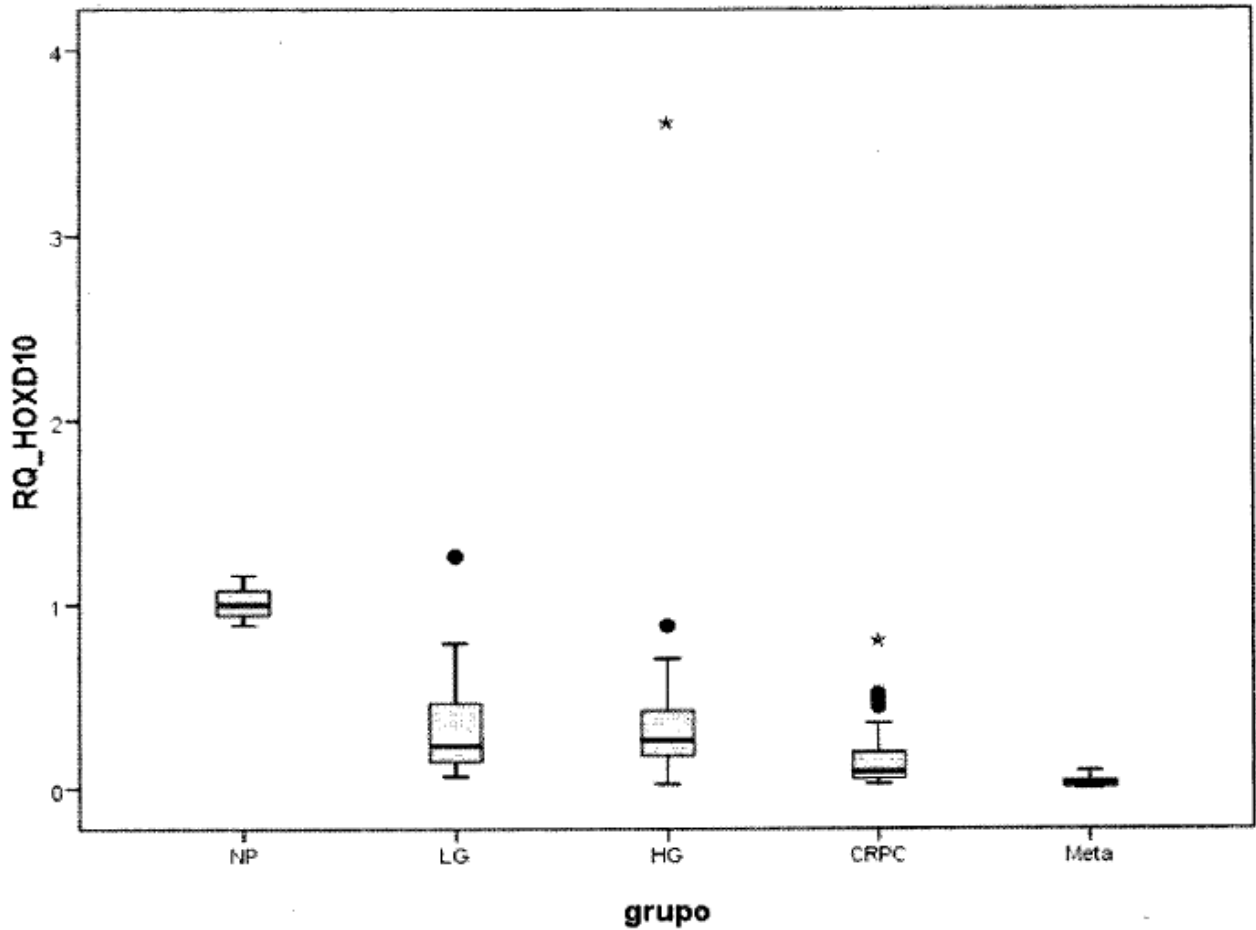
MPRSFLVKKHFNASKKPNYSELDHTTVIISPPLYESYSMPVIPQPEILSSGAYSPITVWTTAAPFHAQLP  
NGLSPLSGYSSSLGRVSPPPPSDTSSSKDHSGESPISEDEERLQSKLSDPHAIEAEKFQCNLCNKTYSTF  
SGLAKHKQLHCDAQSRKSFCKYCDKEYVSLGALKMHIRTHTLPCVCKICGKAFSRPWLLQGHIRTHTGE  
KPFSCPHCNRAFADRSNLAHLQTHSDVKKYQCKNCSKTFSRMSLLHKHEESGCCVAH

**FIGURA 34**

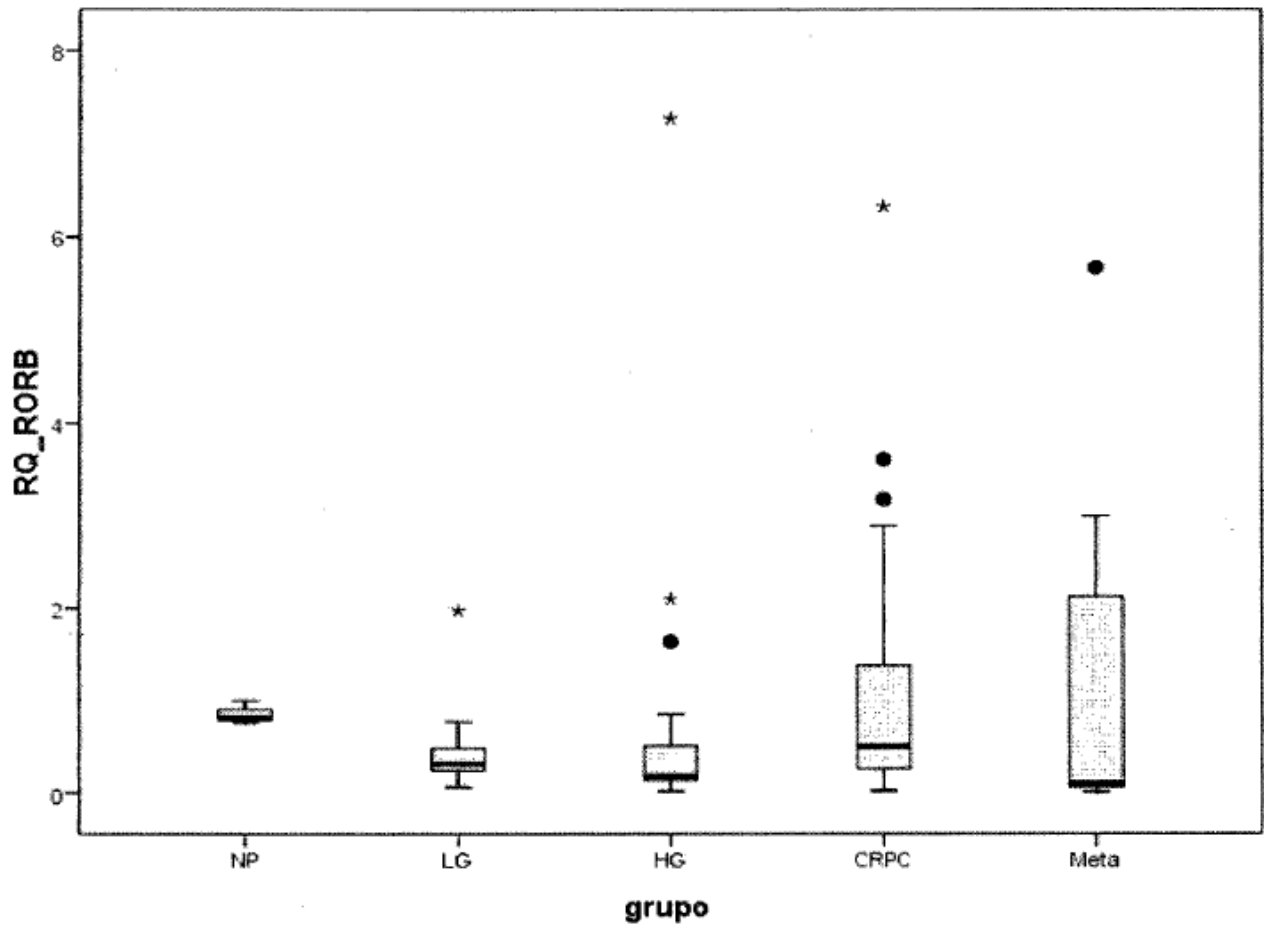
|      | Mediana (RQ) | Media (RQ) | Media <sup>2</sup> log |
|------|--------------|------------|------------------------|
|      | TLDA         | TLDA       | Genechip®              |
| NP   | 0,79         | 0,66       |                        |
| LG   | 4,56         | 7,60       | 5,21                   |
| HG   | 5,98         | 6,24       | 5,22                   |
| CRPC | 4,87         | 5,71       | 5,50                   |
| Meta | 6,05         | 9,13       | 6,03                   |

**FIGURA 35**

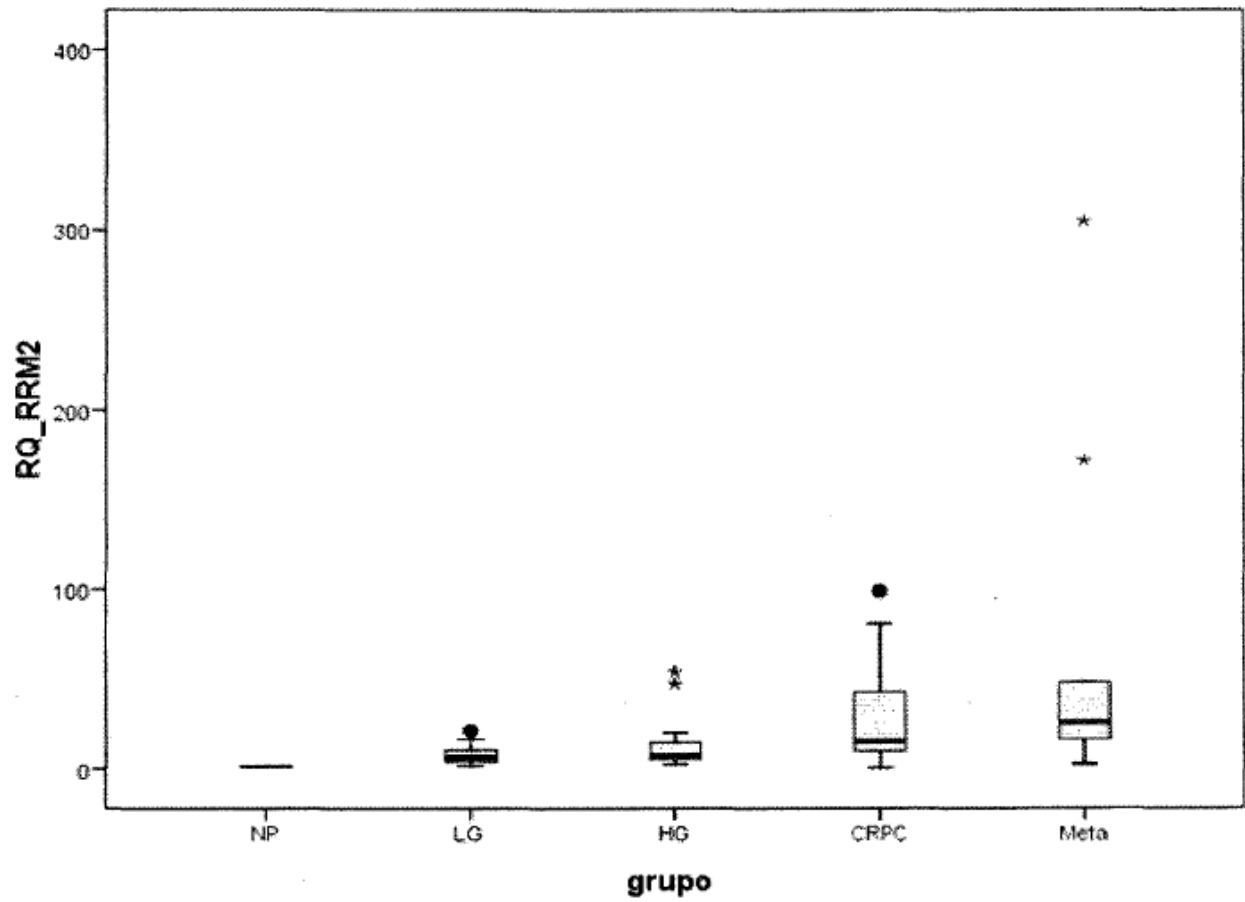
|      | Mediana (RQ) | Media (RQ) | Media <sup>2</sup> log |
|------|--------------|------------|------------------------|
|      | TLDA         | TLDA       | Genechip®              |
| NP   | 1,00         | 0,99       |                        |
| LG   | 0,50         | 0,61       | 7,01                   |
| HG   | 0,70         | 0,75       | 7,72                   |
| CRPC | 0,37         | 0,68       | 6,92                   |
| Meta | 0,02         | 0,09       | 4,36                   |

**FIGURA 36**

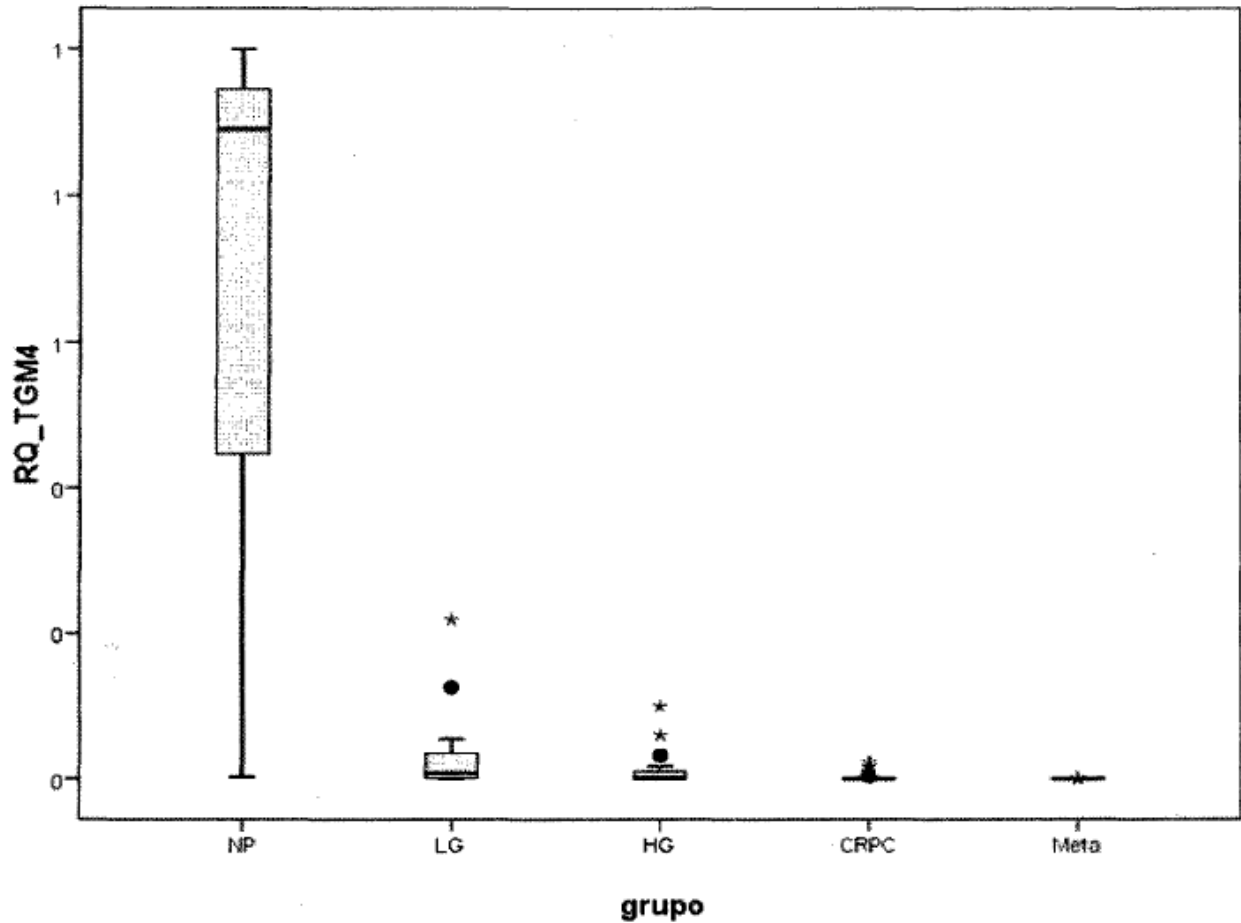
|      | Mediana (RQ)<br>TLDA | Media (RQ)<br>TLDA | Media <sup>2</sup> log<br>Genechip® |
|------|----------------------|--------------------|-------------------------------------|
| NP   | 1,00                 | 1,02               |                                     |
| LG   | 0,23                 | 0,35               | 4,93                                |
| HG   | 0,26                 | 0,47               | 4,97                                |
| CRPC | 0,09                 | 0,20               | 4,92                                |
| Meta | 0,02                 | 0,03               | 3,62                                |

**FIGURA 37**

|      | Mediana (RQ) | Media (RQ) | Media <sup>2</sup> log |
|------|--------------|------------|------------------------|
|      | TLDA         | TLDA       | Genechip®              |
| NP   | 0,81         | 0,86       |                        |
| LG   | 0,31         | 0,43       | 5,60                   |
| HG   | 0,18         | 0,74       | 5,50                   |
| CRPC | 0,50         | 1,24       | 6,56                   |
| Meta | 0,10         | 1,27       | 6,13                   |

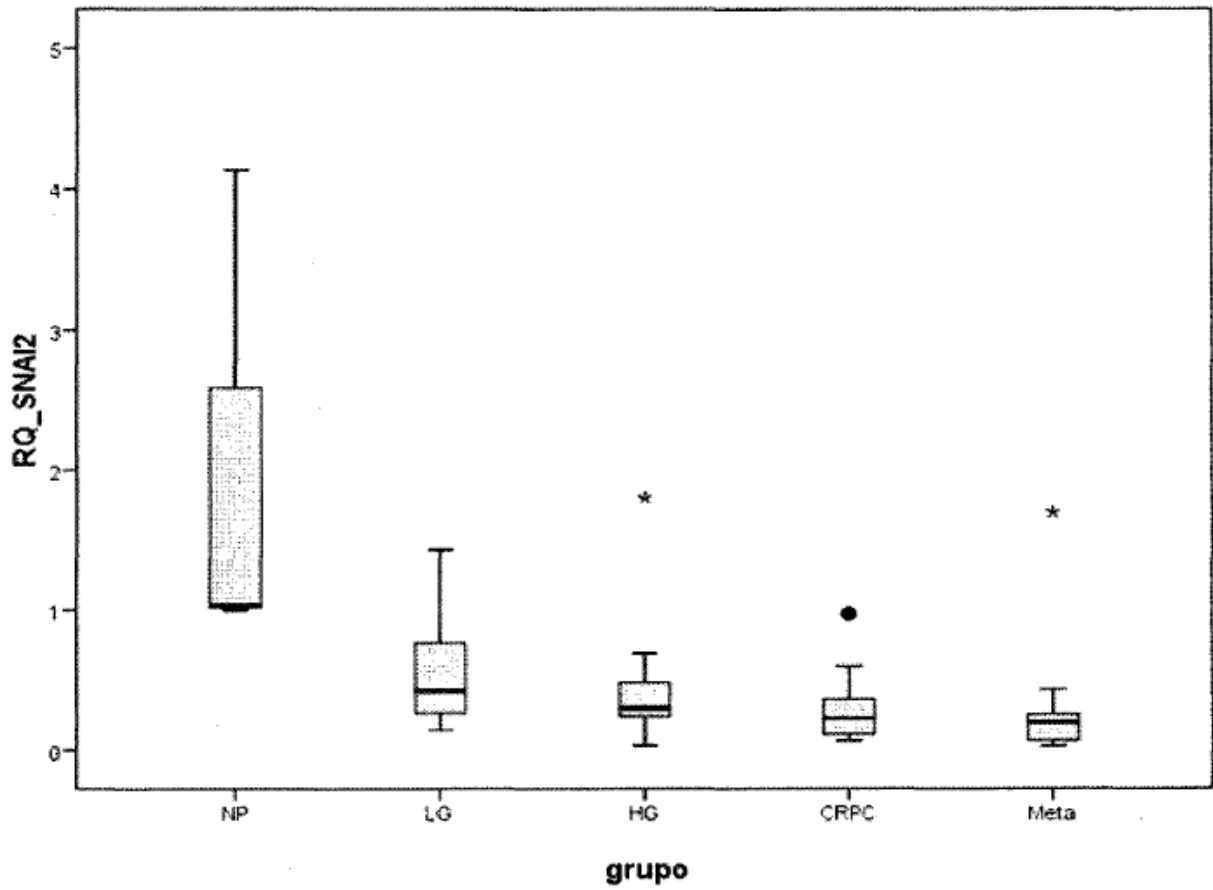
**FIGURA 38**

|      | Mediana (RQ) | Media (RQ) | Media <sup>2</sup> log |
|------|--------------|------------|------------------------|
|      | TLDA         | TLDA       | Genechip®              |
| NP   | 1,08         | 1,24       |                        |
| LG   | 6,06         | 7,49       | 4,83                   |
| HG   | 7,16         | 12,38      | 5,23                   |
| CRPC | 15,10        | 28,63      | 5,14                   |
| Meta | 25,60        | 68,92      | 5,70                   |

**FIGURA 39**

|      | Mediana (RQ) | Media (RQ) | Media <sup>2</sup> log |
|------|--------------|------------|------------------------|
|      | TLDA         | TLDA       | Genechip®              |
| NP   | 0,89         | 0,63       |                        |
| LG   | 0,01         | 0,03       | 7,53                   |
| HG   | 0,001        | 0,010      | 5,81                   |
| CRPC | 0,0001600    | 0,002700   | 5,59                   |
| Meta | 0,0000075    | 0,0000160  | 3,40                   |

**FIGURA 40**



|      | Mediana (RQ) | Media (RQ) | Media <sup>2</sup> log g |
|------|--------------|------------|--------------------------|
|      | TLDA         | TLDA       | Genechip®                |
| NP   | 1,04         | 2,06       |                          |
| LG   | 0,42         | 0,54       | 6,95                     |
| HG   | 0,30         | 0,42       | 7,33                     |
| CRPC | 0,22         | 0,28       | 6,29                     |
| Meta | 0,19         | 0,34       | 5,57                     |