

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 424**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010** E 16152123 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** EP 3048176

54 Título: **Método de diagnóstico del cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

**20.04.2009 US 170928 P**

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

**31.07.2019**

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER  
ROTTERDAM (100.0%)  
Dr. Molewaterplein 50  
3015 GE Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**ZWARTHOF, ELLEN CATHARINA y  
VAN TILBORG, ANNECHIENA GEERTRUIDE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

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

**ES 2 721 424 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método de diagnóstico del cáncer de vejiga

Campo de la invención

5 La presente invención está en el campo del diagnóstico de cáncer de vejiga, y en particular los métodos para predecir la progresión de los tumores de cáncer de vejiga. La invención proporciona métodos de diagnóstico y composiciones de diagnóstico para uso en tales métodos. La invención proporciona además objetivos terapéuticos para tratar formas específicas de cánceres de vejiga.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer de vejiga es el quinto cáncer más común en el mundo occidental con una incidencia de 20 casos nuevos por año por cada 100,000 personas en los EE. UU. Lamentablemente, estas estadísticas no incluyen el cáncer de vejiga pTa superficial, que representa el tipo más común de cáncer de vejiga. En los Países Bajos, la incidencia de cáncer de vejiga tanto superficial como invasivo se estima en aproximadamente 30 casos nuevos por año por cada 100,000 personas. Esto está de acuerdo con los datos de las estadísticas mundiales de cáncer para el mundo occidental. Los tumores superficiales de la vejiga se extirpan mediante resección transuretral. Sin embargo, hasta el 15 70% de estos pacientes desarrollarán una o más recurrencias, y se estima que 1 de cada 1,450 personas está bajo vigilancia por cáncer de vejiga en el Reino Unido. La cistoscopia es un procedimiento incómodo, invasivo y costoso, pero actualmente sigue siendo el estándar de oro para la detección de recurrencias. Debido a que los pacientes tienen que ser monitorizados perpetuamente y tienen una supervivencia a largo plazo, el cáncer de vejiga es el cáncer más costoso cuando se calcula con base en cada paciente.

20 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento económico, no invasivo y simple para la detección del cáncer de vejiga. La citología realizada en orina evacuada es un procedimiento no invasivo con hasta un 100% de especificidad. Desafortunadamente, este método está limitado por su sensibilidad, que es especialmente pobre para los tumores de bajo grado. Debido a esta sensibilidad limitada, es necesario desarrollar métodos alternativos para la detección de células tumorales en la orina evacuada.

25 Resumen de la invención

Los presentes inventores han encontrado que la metilación de un número de islas CpG específicas (CGI) en el ADN de células sombreadas en la orina de un sujeto es indicativa de la presencia de un tumor, en particular un tumor de vejiga. Por lo tanto, la metilación aberrante de estas islas CpG en el ADN de un sujeto puede usarse como marcador de diagnóstico y/o pronóstico, así como un objetivo terapéutico.

30 Se ha encontrado que el presente hallazgo es particularmente ventajoso en el caso de los diagnósticos de cáncer de vejiga (que incluyen el pronóstico de la enfermedad y la predicción de la recurrencia y la progresión de la enfermedad), ya que la detección de metilación puede ocurrir en el ADN (de las células) en una muestra de orina obtenida del sujeto a ser diagnosticado. En particular, las células uroteliales presentes en dicha muestra de orina se utilizan para este fin. El experto en la técnica entenderá que los métodos de diagnóstico como se indican en este documento pueden hacer 35 uso de cualquier muestra corporal en la que se pueda detectar el ADN que comprende las metilaciones aberrantes como se define en este documento, incluidas las biopsias de tejido canceroso, o el tejido sospechoso de ser maligno.

Los presentes inventores han demostrado la adecuabilidad de utilizar la metilación de islas CpG específicas como marcadores de diagnóstico en los diagnósticos de cáncer de vejiga, tal como para:

detección de cáncer recurrente en el ADN aislado de la orina del paciente, y

40 detección de cáncer primario en ADN aislado de la orina del paciente.

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar cáncer en un sujeto que comprende detectar en el ADN de dicho sujeto al menos una isla CpG hipermetilada asociada con dicho cáncer, en donde una elevación en el nivel de metilación en dicha isla CpG de dicho sujeto, en relación con el nivel de metilación en dicha isla CpG de un sujeto de control, es indicativo de que dicha isla CpG está hipermetilada, según se recita en la reivindicación 1. La presencia de una isla CpG hipermetilada puede indicar que el sujeto está en riesgo de, o de padecer, un cáncer.

Dicha isla CpG está en ONECUT-2.

En los métodos de la invención, dicho cáncer es cáncer de vejiga.

50 En otra realización preferida de los métodos de la invención, dicho método comprende la detección de formas recurrentes de cáncer en el ADN aislado de la orina del paciente y en donde dicha al menos una metilación de islas CpG asociada con el cáncer se encuentra en ONECUT-2.

En aún otra realización preferida de los métodos de la invención, dicho método comprende la detección de formas primarias de cáncer en el ADN aislado de la orina del paciente y en donde dicha al menos una metilación de islas CpG asociada con el cáncer se encuentra en ONECUT-2.

5 En todavía una realización preferida adicional de los métodos de la invención, dicho ADN se obtiene a partir de una muestra de orina de dicho sujeto.

10 En otra realización preferida de los métodos de la invención, dicho cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga no invasivo de músculo. Alternativamente, dicho cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga invasivo de músculo. En realizaciones de la invención, dicho método proporciona la detección de la metilación diferencial del gen ONECUT-2. La metilación diferencial de uno o más de los genes proporcionados en la Tabla 7 se usa para discriminar entre subgrupos de cáncer de vejiga, tal como entre grupos NMI-wt y MI y NMI-mt.

15 En una realización preferida de los métodos de la invención, las células inflamatorias generales en la orina, preferiblemente linfocitos, se detectan por metilación de al menos uno de los CGI en ONECUT-2. La Tabla 9 indica un número de CGI metilados en la sangre pero no en el cáncer de vejiga. La metilación diferencial de estos CGI, que pueden detectarse en el ADN (de las células) en una muestra de orina obtenida del sujeto que se va a diagnosticar, y en particular en las células uroteliales presentes en dicha muestra de orina, son útiles para la detección de linfocitos en orina, o en general células inflamatorias en la orina, lo que es indicativo de cistitis. La detección positiva de la presencia de células inflamatorias en la orina se puede utilizar para diagnosticar una infección o una inflamación no infecciosa del tracto urinario y el riñón.

20 En una realización preferida, dicho método comprende la detección de cáncer recurrente en ADN aislado de la orina del paciente. Este método conlleva la detección de metilaciones específicas de la isla CpG asociadas con formas recurrentes del cáncer.

En otra realización preferida, dicho método comprende la detección de cáncer primario en ADN aislado de la orina del paciente. Este método conlleva la detección de metilaciones específicas de la isla CpG asociadas con las formas primarias del cáncer.

25 Los presentes inventores han demostrado además la adecuabilidad de usar metilación de islas CpG específicas como marcadores de pronóstico en los diagnósticos de cáncer de vejiga, tales como para:

predicción de curso de la enfermedad con base en el análisis de ADN derivado de tumores u derivado de orina, que incluye:

predicción del potencial invasivo de carcinomas uroteliales invasivos no musculares;

30 predicción de la supervivencia específica del carcinoma urotelial, y

predicción de la presencia/ausencia de nodos linfáticos y metástasis distante causadas por carcinomas uroteliales

35 Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para la predicción de la recurrencia del cáncer de vejiga, que comprende detectar en el ADN de dicho sujeto al menos una isla CpG hipermetilada asociada con dicho cáncer, en donde una elevación en el nivel de metilación en dicha isla CpG de dicho sujeto, con respecto al nivel de metilación en dicha isla CpG de un sujeto de control sano, es indicativo de que dicha isla CpG está hipermetilada, en donde dicha isla CpG está en ONECUT-2; y en donde dicha isla CpG está indicada por chr18: 53254153-53259851 como se incluye en la Human Genome Assembly hg18 de marzo de 2006. La presencia de una isla CpG hipermetilada podría indicar que el sujeto está en riesgo de recurrencia de cáncer. En el presente documento se describe un método para el pronóstico del riesgo de recurrencia del cáncer, la progresión de un cáncer y/o el pronóstico desfavorable comprende la detección de uno o más CpG metilados en los CGI de los genes listados en la Tabla 12B, por lo que los CGI se escogen preferiblemente de los genes GPR103, DBC1 y/o GATA2. Dicho cáncer es preferiblemente el cáncer de vejiga.

45 En aspectos de la presente invención, la metilación del dinucleótido en o el nivel de metilación de una isla CpG puede determinarse mediante cualquier método disponible para la persona experimentada. Preferiblemente dicho método comprende PCR específica para metilación (MSP). Alternativamente, o adicionalmente, se puede hacer uso de una amplificación de sonda dependiente de la ligadura múltiplex (MLPA).

Los presentes inventores han demostrado además la adecuabilidad de usar metilación de islas CpG específicas como marcadores en los diagnósticos de cáncer de vejiga para la predicción de la respuesta terapéutica, tal como para la predicción de fracaso o éxito de las terapias (neo)-adyuvantes.

50 Los presentes inventores prevén ahora como parte de la divulgación el uso de agentes desmetilantes capaces de desmetilar específicamente las islas CpG asociadas con el tumor, en particular el cáncer de vejiga, como se define en el presente documento. También pueden ser de utilidad como terapia de cebado para regímenes quimioterapéuticos.

Por lo tanto, se divulga un método para el tratamiento o la prevención del cáncer, en particular el cáncer de vejiga, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un

agente desmetilante capaz de desmetilar selectivamente al menos una de las metilaciones de islas CpG asociadas con cáncer como se describe aquí.

El resultado clínico de los agentes de desmetilación puede depender de los perfiles de metilación específicos.

5 Además, se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden agentes desmetilantes capaces de desmetilar selectivamente al menos una de las metilaciones de las islas CpG asociadas con el cáncer como se describe aquí.

La presente invención proporciona además composiciones de diagnóstico que comprenden cebadores de PCR y reactivos o sondas capaces de hibridar selectivamente bajo condiciones rigurosas a islas CpG hipermetiladas como se define aquí.

Descripción detallada de la invención

10 Como se usa en el presente documento, el término "isla CpG" se refiere a regiones genómicas que contienen una alta frecuencia de nucleótidos CG. En los genomas de mamíferos, las islas CpG tienen típicamente una longitud de 300-3,000 pares de bases. Están en y cerca de aproximadamente el 40% de los promotores de genes de mamíferos (alrededor del 70% en promotores humanos). La "p" en notación CpG se refiere al enlace fosfodiéster entre la citoquina y la guanina. Las islas CpG se caracterizan por un contenido de dinucleótido CpG de al menos el 60% del que se  
15 esperaría estadísticamente (~4-6%), mientras que el resto del genoma tiene una frecuencia CpG mucho más baja (~1%), un fenómeno llamado supresión de CG. A diferencia de los sitios CpG en la región codificante de un gen, en la mayoría de los casos, los sitios CpG en las islas CpG de promotores no están metilados si los genes se expresan.

20 Como se usa en el presente documento, el término "metilación de la isla CpG" se refiere a una metilación de al menos un dinucleótido CG en una región CpG como se define en el presente documento. Por lo tanto, los métodos de la presente invención incluyen la detección de al menos un dinucleótido CG individual que se está metilado en una isla CpG como se define en el presente documento.

25 Como se usa en el presente documento, el término "islas CpG hipermetiladas" se refiere a una isla CpG que presenta una elevación en el nivel de metilación, en relación con el nivel de metilación en la misma isla CpG de un sujeto de control. Nuevamente, el nivel de metilación incluye la presencia de un dinucleótido CG metilado individual en la isla CpG en comparación con la situación de control, en la cual la misma isla CpG no está metilada. Además, los métodos de la invención incluyen realizaciones en donde la metilación de un dinucleótido CG individual en una isla CpG como se define aquí se detecta entre otros sitios metilados.

30 Como se usa en el presente documento, "cáncer" debe entenderse como uno o más de un amplio rango de tumores benignos o malignos, incluidos aquellos que son capaces de un crecimiento invasivo y metástasis a través de un cuerpo humano o animal o una parte del mismo, tal como por ejemplo, a través del sistema linfático y/o el torrente sanguíneo. Como se usa en el presente documento, el término "tumor" incluye tumores tanto benignos como malignos o crecimientos sólidos, no obstante que la presente invención está particularmente dirigida al diagnóstico o detección de tumores malignos y cánceres sólidos. Los cánceres típicos incluyen, pero no se limitan a carcinomas, linfomas o sarcomas, tal como, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer uterino, leucemia linfática aguda, Enfermedad de Hodgkin, carcinoma de células pequeñas del pulmón, melanoma, neuroblastoma, glioma y sarcoma de tejidos blandos de humanos; y linfoma, melanoma, sarcoma y adenocarcinoma de animales.

40 El término "cáncer de vejiga", como se usa en el presente documento, se refiere en general a carcinoma de células uroteliales, es decir, carcinomas de vejiga urinaria, uréter, pelvis renal y uretra. El término incluye referencia a las formas no invasoras de músculo (NMI) o superficiales, así como a los tipos de invasión muscular (MI) más peligrosos. También se incluye en el término la referencia a las formas primarias, así como a las formas recurrentes del cáncer.

45 Los tipos de NMI pueden además ser subdivididos en FGFR3<sup>+</sup> y FGFR3<sup>-</sup>. Las mutaciones en el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3, indicado aquí como FGFR3<sup>+</sup>) ocurren en el 50% de los tumores primarios de vejiga. Se sabe (por ejemplo, Van Oers et al. 2005 Clin. Cancer Res; 11 (21), pp. 7743-7748) que una mutación de FGFR3 se asocia con un buen pronóstico, ilustrado por un porcentaje significativamente menor de pacientes con mortalidad específica por progresión y enfermedad. Las mutaciones de FGFR3 son especialmente prevalentes en los tumores de bajo grado/estadio, y los tumores pTa albergan mutaciones en el 85% de los casos. Estos tumores recurren en el 70% de los pacientes. Un problema clínico importante es la detección eficiente de mutaciones en FGFR3 con fines de pronóstico y para la detección de recurrencias en la orina. De este modo, en realizaciones preferidas de la presente invención, el método de diagnóstico incluye además la etapa de detectar una mutación del gen FGFR3. Esta etapa adicional se puede realizar antes de, durante o después de la etapa de detectar la isla CpG hipermetilada como se indica en el presente documento. La detección de la mutación del gen FGFR3 como se indica en Van Oers et al (esta referencia se menciona expresamente e incorpora aquí como referencia en su totalidad para que los métodos y las mutaciones se detecten tal como se describe aquí) indica que es muy probable que el cáncer sea del tipo no  
55 invasivo.

"Sujeto" como se usa en este documento incluye, pero no se limita a, mamíferos, que incluyen, por ejemplo, un humano, un primate no humano, un ratón, un cerdo, una vaca, una cabra, un gato, un conejo, una rata, un conejillo de

indias, un hámster, un degu, un caballo, un mono, una oveja u otro mamífero no humano; y animales no mamíferos, que incluyen, por ejemplo, un vertebrado no mamífero, tal como un ave (por ejemplo, un pollo o pato) o un pez, y un invertebrado.

5 Un método de la invención puede realizarse en cualquier fluido corporal adecuado, tal como por ejemplo en fluido abdominal, pleural, bronquial, fluido pericárdico, sangre, suero, leche, plasma, sudor, lágrimas, orina, fluido peritoneal, linfa, secreción vaginal, semen, líquido cefalorraquídeo, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, saliva, heces, esputo, moco o exudado mamario. Preferiblemente, un método de la invención se realiza en sangre, suero, plasma o fluido ascítico, más preferiblemente suero. Dependiendo de los métodos empleados, el experto en la técnica será capaz de establecer la cantidad de muestra requerida para realizar las diversas etapas del método de la presente invención.

10 Generalmente, tales cantidades comprenderán un volumen que oscila entre 0.01 µl y 100 ml o más. Las muestras preferidas son muestras de orina.

En realizaciones incluso más preferidas de aspectos de la invención, se usa la fracción celular de orina, preferiblemente fracción de células tumorales. Las fracciones celulares de la orina se pueden obtener por filtración o centrifugación. El ADN celular puede analizarse subsecuentemente, por ejemplo, al extraer el ADN de las células, aunque también se prevén métodos in situ realizados en células enteras.

15

El médico o biólogo experto estará familiarizado con las diversas formas de proporcionar una muestra de un fluido corporal de un sujeto, en particular una muestra de orina. La recolección de orina y la preparación de la muestra para el análisis de metilación de la isla CpG comprende de manera adecuada, por ejemplo, la recogida de una muestra de orina se recolectó en un tubo de centrifuga de 50 ml. La muestra puede usarse opcionalmente para pruebas adicionales, tales como pruebas de varilla de inmersión para leucocitos, eritrocitos y nitritos, como se realiza rutinariamente en la técnica. Las células en la orina se centrifugan de manera adecuada durante 10 min a 3000 rpm; 4 °C. Una cantidad de sobrenadante se almacena de manera adecuada a -80 °C para su uso posterior. La pella celular se puede lavar, por ejemplo, agregando una cantidad adecuada de PBS (solución salina regulada con fosfato), tal como 10 ml, a la pella celular. Después de la mezcla y la centrifugación (por ejemplo, 10 min a 3000 rpm; 4 °C), el PBS se puede desechar. La pella celular puede luego resuspenderse en PBS (por ejemplo, 1 ml) y transferirse a un tubo de microcentrifuga. La suspensión se centrifuga de manera adecuada (por ejemplo, 5 min a 6000 rpm; 4 °C). El sobrenadante se puede eliminar con cuidado y el sedimento celular se puede almacenar en un congelador a -80 °C hasta la extracción del ADN.

20

25

Los sistemas comerciales para el aislamiento del ADN de la sangre, la orina y el tejido están disponibles de diversos proveedores de reactivos biológicos moleculares. Se hace referencia especial al kit de tejido y sangre DNeasy® y al kit de tejido y sangre DNeasy® 96 disponibles en QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania.

30

El término "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto puede detectarse, por ejemplo, mediante marcadores químicos o niveles de antígeno. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción de los síntomas físicos. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y el alcance de la condición y los agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada puede determinarse mediante experimentación de rutina y está a criterio del médico.

35

Para los fines de la divulgación, una dosis efectiva será de aproximadamente 0.01 mg/kg a 50 mg/kg o de 0.05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones de polinucleótidos o polipéptidos en el individuo al que se administra.

40

La divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de desmetilación como se definen en el presente documento.

45 Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico, tal como un polipéptido, polinucleótido y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que se puede administrar sin una toxicidad excesiva. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes y de metabolismo lento, tal como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos. Tales portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica.

50

Se pueden usar en la misma sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Se encuentra disponible un análisis exhaustivo de los excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

55

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en tales vehículos pueden estar presentes sustancias

auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH y similares. Típicamente, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen dentro de la definición de un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 Una vez formuladas, las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden ser (1) administradas directamente al sujeto; (2) entregados ex vivo, a células derivadas del sujeto; o (3) administrado in vitro para la expresión de proteínas recombinantes.

10 El suministro directa de las composiciones generalmente se realizará mediante inyección, ya sea por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o administrada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en el sistema nervioso. Otros modos de administración incluyen aplicaciones tópicas, orales, supositorios y transdérmicas, agujas y pistolas de partículas o hipoasersiones. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

Los aspectos específicos de la presente invención se relacionan con las islas CpG indicativas de ciertas formas de cáncer que emergen, por ejemplo, de las siguientes Comparaciones:

- 15 A) Islas CpG hipermetiladas en el cáncer de vejiga (BC) no invasivo de los músculos (BC) que son de tipo silvestre FGFR3, en este documento denominado NMI-BC wt, versus al cáncer de la vejiga invasivo en los músculos (MI), en este documento denominado MI-BC (n = 31)
- B) Islas CpG hipermetiladas en MI-BC vs. NMI-BC wt (n = 11)
- C) Islas CpG hipermetiladas en todos los cánceres de vejiga (n = 62)
- 20 D) Islas CpG hipermetiladas en el mutante NMI-BC-FGFR3 de tipo silvestre vs. NMI-BC-FGFR3 (n = 31), y
- E) Islas CpG hipermetiladas que predicen la progresión de la enfermedad o la muerte de la enfermedad (resp. N = 3 y n = 11)).

25 Los métodos de la invención comprenden la detección de islas CpG hipermetiladas en el ADN de un sujeto. Como se indicó, la hipermetilación es un término relativo que indica que el nivel de metilación de la isla CpG respectiva es más alto que o elevado con respecto al nivel de metilación de la isla CpG correspondiente en un sujeto de control sano.

30 Los métodos de la invención comprenden la detección de al menos una isla CpG hipermetilada en el ADN de un sujeto. Como hay muchas islas CpG indicadas aquí cuya hipermetilación es indicativa de cáncer, en particular cáncer de vejiga, el método conlleva preferiblemente la detección de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más, tal como 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o más hipermetilaciones en el ADN de un sujeto. En tales casos, es posible hablar de un perfil de metilación de la isla CpG. En tal perfil, el porcentaje de islas CpG detectadas positivamente es preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 90%.

Los perfiles de metilación de la isla CpG pueden comprender entre 2 y 25 islas CpG para fines de diagnóstico, tal como determinar si existe un cáncer de vejiga y/o si se trata de un tipo de NMI o MI.

35 Los perfiles de metilación de la isla CpG comprenden preferiblemente entre 2 a 25, más preferiblemente más, tal como entre 50 y 150, por ejemplo alrededor de 100 islas CpG para fines de diagnóstico, tal como determinar el pronóstico de un NMI para convertirse en un tipo de MI más agresivo de tumor. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de pronóstico para determinar si un cáncer de vejiga de tipo NMI puede convertirse en un tipo de MI.

40 También es posible usar un método de la presente invención para distinguir entre una forma primaria o recurrente del tumor.

El experto en la técnica conoce bien los diversos métodos que se han desarrollado para analizar la metilación del ADN. Entre estos métodos se encuentran los enfoques basados en enzimas de restricción y bisulfito de sodio, así como los enfoques de amplificación de sonda dependiente de la ligadura múltiple (MLPA).

45 Los métodos basados en enzimas de restricción se basan en la incapacidad de las enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir las citoquinas metiladas en su sitio de reconocimiento. La identificación del estado de metilación se basa en técnicas de hibridación Southern o PCR y se basa en la longitud del fragmento de ADN digerido. La incapacidad para digerir secuencias metiladas da como resultado fragmentos más largos, lo que indica un dinucleótido CpG metilado. Los métodos basados en enzimas de restricción son simples, rápidos y altamente sensibles y son adecuados para los análisis de metilación amplio del genoma, así como para las técnicas de descubrimiento de marcadores.

50 Los métodos preferidos para la aplicación en aspectos de la presente invención son la detección de la metilación del ADN basada en bisulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>). Tales métodos se basan esencialmente en el hecho de que el tratamiento de ADN monocatenario con bisulfito de sodio da como resultado diferencias de secuencia debido a la desaminación

de citoquinas no metiladas a uracilo bajo condiciones en las que las citoquinas metiladas permanecen sin cambios. La diferencia en el estado de metilación marcado por la reactividad del bisulfito se puede determinar y cuantificar con precisión mediante tecnología basada en PCR. Las técnicas de secuenciación de bisulfito (tales como se describe en Frommer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 1827-1831) proporcionan datos cualitativos sobre el estado de metilación de las 5-metilcitoquinas en el amplicón entre los cebadores de secuencia y, por lo tanto, requiere cebadores específicos para bisulfito convertido, pero no específico para ADN metilado o no metilado. Este enfoque proporciona información detallada sobre el estado de metilación de todos los sitios CpG.

Se puede usar un ensayo de PCR específica para metilación (MSP) para determinar el estado de metilación de las islas CpG. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Herman et al. 1996 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 9821-9826) y Herman and Baylin (Current Protocols in Human Genetics 10 (1998), 10.16.11-10.16.10). El ensayo de MSP se basa en el uso de dos conjuntos distintos de cebadores específicos para metilación para la secuencia de interés. El cebador no metilado (U) solo amplifica el ADN convertido con bisulfito de sodio en condición no metilada, mientras que el cebador metilado (M) es específico para el ADN metilado convertido con bisulfito de sodio. Usando MSP, se puede detectar 1 alelo metilado en un fondo de 1000 alelos no metilados. MSP es muy adecuado para analizar el estado de metilación de los dinucleótidos CpG en una isla CpG. El método también se puede aplicar para el análisis de alto rendimiento de muestras clínicas. Los parámetros más críticos que determinan el éxito y la especificidad de la MSP, es decir, la conversión con bisulfito, el diseño del cebador y la PCR, así como varios enfoques de validación posteriores a la PCR, se analizan en Derks et al. 2004 (Cellular Oncology 26 (2004) 291-299). La PCR específica para metilación (MSP) se describe con gran detalle en los documentos US5,786,146, US6,017,704, US6,200,756 y US6,265,171 y en la patente internacional WO 97/46705.

Los sistemas comerciales para el análisis de metilación de ADN que utilizan MSP están disponibles a través de diversos proveedores de reactivos biológicos moleculares. Se hace referencia especial al kit EZ DNA Methylation-Startup™ y al kit EZ DNA Methylation-Direct™ disponibles en Zymo Research Corp. Orange, CA, EE. UU.

También se puede hacer uso, solo o en combinación con cualquiera de los anteriores, de la técnica MLPA. La técnica MLPA se describe, por ejemplo, con gran detalle en Schouten et al., 2002 (Nucleic Acids Research 3 (12) e57, 13 pp.).

Además, se puede hacer uso de un chip de micromatriz al que se hibrida el ADN de un sujeto. Tales matrices para islas CpG están, por ejemplo, disponibles comercialmente en Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EE. UU.

A continuación se proporcionan las siguientes tablas:

Tabla 1. Coordenadas de las regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes basadas en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006). Estas islas CpG son un aspecto de la presente invención ya que la hipermetilación de estas regiones está asociada con cáncer, preferiblemente cáncer de vejiga y/o ciertas formas de dicho cáncer.

Tabla 2. Islas CpG metiladas diferencialmente en NMI-BC wt versus BC invasiva. Estas 42 islas CpG son un aspecto de la presente invención, ya que la hipermetilación de estas regiones está asociada ya sea con NMI o formas de MI más agresivas del cáncer. Por lo tanto, estas regiones están particularmente indicadas para uso en métodos de diagnóstico en donde la tipificación del cáncer es relevante. La tabla proporciona datos sobre las islas CpG hipermetiladas en el cáncer de vejiga no invasivo del músculo (NMI) que son FGFR3 de tipo silvestre, aquí denominado NMI-BC wt, versus cáncer de la vejiga invasivo del músculo (MI) denominado aquí MI-BC (n = 31), así como las islas CpG hipermetiladas en MI-BC versus NMI-BC wt (n = 11).

Tabla 3. Islas CpG hipermetiladas en cáncer (de vejiga). Estas 62 islas CpG son un aspecto de la presente invención, ya que la hipermetilación de estas islas CpG está asociada con el cáncer (de vejiga).

Tabla 4. Islas CpG hipermetiladas en NMI-BC FGFR3 wt versus NMI-BC FGFR3 mut. Estas 31 islas CpG son un aspecto de los marcadores de diagnóstico de la presente invención para la tipificación de los cánceres (de vejiga) y, en particular, indican la relevancia de las mutaciones de FGFR3 en el cáncer de vejiga. Estas 31 islas CpG pueden usarse para el diagnóstico de tumores primarios y recurrentes de FGFR3 wt en orina, por ejemplo. Estas 31 islas CpG también pueden usarse para la detección de tumores FGFR3 wt en pacientes con un tumor primario FGFR3 mt (mutante). Alternativamente, estas 31 islas CpG se pueden usar para la identificación de recurrencias que progresaron a una enfermedad invasiva del músculo, o a la etapa pT1 o a alto grado (sistema de calificación WHO 2004) o G3 (sistema de clasificación WHO 1973). Estas 31 islas CpG también pueden usarse para presentar objetivos específicos para la terapia en tumores NMI-BC que son FGFR3 wt.

Tabla 5. Islas CpG potencialmente involucradas en la progresión y muerte de la enfermedad. Estas 14 islas CpG son un aspecto de la presente invención, ya que la hipermetilación de estas regiones se asocia con la predicción de la recurrencia, la progresión o el pronóstico del cáncer de cáncer, en particular el cáncer de vejiga.

La Tabla 7 (incluidas las Tablas 7A y 7B) indica CGI marcados diferencialmente entre subgrupos de cáncer de vejiga y/o entre subgrupos de cáncer de vejiga y una muestra de referencia (es decir, sangre).

5 La Tabla 9 indica un número de CGI metilados en la sangre pero no en el cáncer de vejiga. La metilación diferencial de estos CGI, que pueden detectarse en el ADN (de las células) en una muestra de orina obtenida del sujeto que se va a diagnosticar, y en particular en las células uroteliales presentes en dicha muestra de orina, son - aparte del propósito indicado aquí para el diagnóstico de cáncer de vejiga - también es útil para la detección de linfocitos en la orina o, en general, en células inflamatorias en la orina, lo que es indicativo de cistitis. La detección positiva de la presencia de células inflamatorias en la orina se puede utilizar para diagnosticar una infección o una inflamación no infecciosa del tracto urinario y el riñón.

10 La Tabla 10 proporciona una lista de los CGI hipermetilados que muestran 3 o más dinucleótidos CpG altamente metilados en un CGI específico. Esta lista comprende 82 CGIs que representan 71 genes y 11 CGI no asociados directamente con un gen. Un gen preferido de la Tabla 10 es MEIS1, que muestra el grado más alto de metilación con un cambio de multiplicidad de 4.8 y un cambio de multiplicidad promedio de 2.2 en las 10 sondas que estaban presentes en la matriz para este CGI.

15 La Tabla 12 (incluidas las Tablas 12A y 12B) proporciona una lista de CGIs que se metilan de manera diferencial entre los tumores y la orina del control del cáncer no de vejiga. Estos genes representan biomarcadores potenciales para las pruebas de orina.

Leyenda a las figuras

Figura 1. Patrón de metilación y expresión de genes seleccionados. (a) MEIS1, (b) NR4A2 y (c) HOXA9. (d), (e), (f) son diagramas de caja que representan los perfiles de expresión que se tomaron de oncomine

20 Figura 2. Comparación de la metilación diferencial entre subgrupos. (a) Análisis no supervisado realizado en todas las sondas presentes en la matriz 244K sin selección: PCA que muestra los distintos grupos de tumores de vejiga agrupados por separado (Red-MI, Blue-NMI-mt y Green NMI-wt), (b) diagrama de Venn que muestra el número de CGI que están metilados diferencialmente.

25 Figura 3. Análisis semi-supervisados entre subgrupos de tumores de vejiga que involucran aglomeración jerárquica y PCA. (a) Aglomeración y PCA de los tumores NMI-mt y NMI-wt, (b) Aglomeración y PCA de los tumores MI y NMI-wt, (c) Aglomeración y PCA de los tumores NMI-mt y MI.

Figura 4. La mayoría de los CGI asociados a genes metilados son objetivos de complejos de peine múltiple. (a) Representación excesiva de los genes de PcG en CGI metilados con BC. (b), diagrama de Venn que muestra la superposición de los genes diana de PcG entre los subgrupos de cáncer de vejiga.

30 Figura 5. A. Aglomeración jerárquica de datos GGMA de todas las muestras investigadas. B. Mapa de calor que muestra las sondas que están metiladas en todos los subgrupos de tumores versus sangre y la orina; C) Metilación de dos CpG en el MEIS1 CGI (picos negros: CpG metilado, rojo: no metilado. IM, ADN metilado in vitro; RT112, T24, J82: líneas celulares de cáncer de vejiga; PU: orina del paciente; NU: orina normal; NB: sangre), D) Curva KM para la progresión a enfermedad invasiva del músculo con base en una combinación de metilación de GRP103, DBC1 y GATA2.

35 Tabla 1. Coordenadas de regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes basadas en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006)

chr1:119333484-119333719	chr1:149638545-149639227	chr1:160220156-160220709
chr1:178464743-178471598	chr1:2072175-2072389	chr1:2106293-2106715
chr1:232106869-232108183	chr1:33385564-33385979	chr1:41122328-41122880
chr1:47672249-47672972	chr1:68288825-68289104	chr1:71284766-71286392
chr10:21828640-21829645	chr10:22804715-22807056	chr10:73437163-73438385
chr10:7449476-7449790	chr10:7489383-7495345	chr12:113657930-113659205
chr12:118612357-118612674	chr12:94776044-94776377	chr13:113930978-113931584
chr13:34950488-34951119	chr13:49595986-49600287	chr13:94152191-94153185
chr14:36205192-36206099	chr14:37746906-37747538	chr14:53488428-53488700

## ES 2 721 424 T3

chr15:94688798-94689131	chr15:94696311-94696840	chr15:94705727-94706054
chr15:94712480-94712812	chr16:52873104-52882105	chr16:52873104-52882105
chr16:85098883-85102729	chr16:86294154-86294408	chr16:87372445-87372729
chr17:24303411-24303889	chr17:34157398-34159854	chr17:44074280-44075233
chr17:56827843-56838048	chr17:58865328-58865618	chr17:73932992-73933361
chr17:75377960-75381951	chr17:75531280-75531546	chr18:5186244-5187389
chr18:68359955-68362770	chr19:4059891-4060207	chr19:42586165-42586705
chr19:63420090-63420541	chr19:63784504-63785085	chr2:104835284-104839920
chr2:105864220-105865009	chr2:111591678-111597436	chr2:115635091-115637285
chr2:124498611-124499725	chr2:156892636-156892878	chr2:156893736-156894685
chr2:171384729-171385226	chr2:176737610-176738187	chr2:19424445-19425131
chr2:43251514-43251780	chr2:45249374-45251726	chr2:63134470-63134933
chr2:66525936-66527222	chr2:70984709-70985764	chr2:72224630-72228512
chr20:22505518-22507240	chr20:22510737-22514165	chr20:22514762-22515148
chr20:35582018-35583550	chr20:54012011-54014085	chr20:60061693-60062033
chr21:33316999-33322115	chr21:36990008-36995832	chr21:37857725-37858416
chr21:43350621-43351134	chr3:129688131-129694023	chr3:148591199-148594390
chr3:62330280-62330608	chr3:62331767-62332398	chr4:111780013-111780343
chr4:122520930-122521740	chr4:155881084-155881434	chr4:177159356-177159814
chr4:40134579-40135662	chr4:9756136-9756429	chr5:115810975-115811393
chr5:122461778-122463450	chr5:134390896-134393045	chr5:135442969-135443206
chr5:140724146-140724826	chr5:174091287-174092335	chr6:101023927-101024343
chr6:1549606-1560865	chr6:21704622-21705099	chr6:26312699-26313302
chr7:121727243-121727884	chr7:1481682-1482268	chr7:155266364-155266696
chr7:155288454-155292175	chr7:156895132-156895886	chr7:2082782-2083345
chr7:27164708-27165039	chr7:27219187-27220360	chr7:2724511-2724848
chr7:27251165-27252762	chr7:32768010-32768497	chr7:55040457-55041024
chr7:8449587-8450236	chr7:96488158-96489591	chr8:132985505-132986242
chr8:142288380-142288718	chr8:57520625-57522095	chr8:65661156-65662687

## ES 2 721 424 T3

chr8:9798161-9799053      chr9:121170908-121172141      chrX:39749470-39754050  
chrX:50040955-50041296

5 TABLA 2. Islas CpG metiladas diferencialmente en NMI-BC wt versus BC invasiva. Se provee para cada uno: ID; Comparación; Coordenadas de regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes con base en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006); Cromosoma; Nombre del Gen; Ubicación relativa a la secuencia de genes.

7; I vs SW; chr1:41122328-41122880; 1; chr1:041122606-041122650; Desconocido  
61; I vs SW; chr10:73437163-73438385; 10; CHST3; INTERIOR  
97; I vs SW; chr12:118612357-118612674; 12; CIT; INTERIOR  
162; I vs SW; chr17:34157398-34159854; 17; PCGF2-PSMB3; PROMOTOR\_DIVERGENTE  
169; I vs SW; chr17:56827843-56838048; 17; TBX2; INTERIOR  
270; I vs SW; chr21:37857725-37858416; 21; chr21:037857850-037857894; Desconocido  
271; I vs SW; chr21:43350621-43351134; 21; CBS; INTERIOR  
283; I vs SW; chr4:40134579-40135662; 4; FLJ20273; INTERIOR  
357; I vs SW; chr7:27219187-27220360; 7; chr7:027219187-027219246; Desconocido  
373; I vs SW; chr7:156895132-156895886; 7; DNAJB6; INTERIOR  
389; I vs SW; chr8:132985505-132986242; 8; chr8:132985506-132985550; Desconocido  
12; SW vs I; chr1:68288825-68289104; 1; DIRAS3; INTERIOR  
15; SW vs I; chr1:71284766-71286392; 1; PTGER3; INTERIOR  
21; SW vs I; chr1:119333484-119333719; 1; TBX15; INTERIOR  
26; SW vs I; chr1:178464743-178471598; 1; LHX4; INTERIOR  
40; SW vs I; chr10:7449476-7449790; 10; SFMBT2; INTERIOR  
41; SW vs I; chr10:7489383-7495345; 10; SFMBT2; INTERIOR  
112; SW vs I; chr14:37746906-37747538; 14; SSTR1; INTERIOR  
118; SW vs I; chr14:53488428-53488700; 14; BMP4; INTERIOR  
147; SW vs I; chr16:52873104-52882105; 16; IRX3; PROMOTOR  
151; SW vs I; chr16:85098883-85102729; 16; FOXF1; PROMOTOR  
180; SW vs I; chr17:75377960-75381951; 17; CBX8; CORRIENTE ABAJO  
187; SW vs I; chr18:68359955-68362770; 18; CBLN2; INTERIOR  
200; SW vs I; chr19:42586165-42586705; 19; ZNF569; CORRIENTE ABAJO

## ES 2 721 424 T3

207; SW vs I; chr19:63420090-63420541; 19; ZNF274; CORRIENTE ABAJO

223; SW vs I; chr2:72224630-72228512; 2; CYP26B1; INTERIOR

227; SW vs I; chr2:104835284-104839920; 2; POU3F3; PROMOTOR

235; SW vs I; chr2:124498611-124499725; 2; CNTNAP5; PROMOTOR

257; SW vs I; chr20:22505518-22507240; 20; FOXA2/C20orf56; CORRIENTE ABAJO

262; SW vs I; chr20:54012011-54014085; 20; CBLN4; INTERIOR

268; SW vs I; chr21:33316999-33322115; 21; OLIG2; PROMOTOR

276; SW vs I; chr3:148591199-148594390; 3; ZIC4; INTERIOR

285; SW vs I; chr4:122520930-122521740; 4; GPR103; INTERIOR

293; SW vs I; chr4:155881084-155881434; 4; LRAT; PROMOTOR

296; SW vs I; chr4:177159356-177159814; 4; GPM6A; INTERIOR

317; SW vs I; chr5:140724146-140724826; 5; PCDHGA5; INTERIOR

333; SW vs I; chr6:101023927-101024343; 6; SIM1; PROMOTOR

367; SW vs I; chr7:121727243-121727884; 7; FEZF1; CORRIENTE ABAJO

376; SW vs I; chr8:9798161-9799053; 8; hsa-mir-124a-1; PROMOTOR

380; SW vs I; chr8:65661156-65662687; 8; BHLHB5; CORRIENTE ABAJO

398; SW vs I; chr9:121170908-121172141; 9; DBC1; PROMOTOR

403; SW vs I; chrX:50040955-50041296; X; CCNB3; PROMOTOR

TABLA 3. Islas CpG hipermetiladas en cáncer (de vejiga). Se proveen para cada una de ellas: ID; Comparación; Coordenadas de regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes con base en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006); Cromosoma; Nombre del gen; Ubicación relativa a la secuencia de genes.

5

2; TODOS;; chr1:2072175-2072389; 1; PRKCZ; INTERIOR
3; TODOS; chr1:2106293-2106715; 1; PRKCZ/FP7162; INTERIOR
6; TODOS; chr1:33385564-33385979; 1; chr1:033385935-033385979; Desconocido
8; TODOS; chr1:47672249-47672972; 1; FOXD2/MGC12982; PROMOTOR
50; TODOS; chr10:21828640-21829645; 10; C10orf114; PROMOTOR
54; TODOS; chr10:22804715-22807056; 10; chr10:022806090-022806137; Desconocido
87; TODOS; chr12:94776044-94776377; 12; SNRPF; PROMOTOR

## ES 2 721 424 T3

94; TODOS; chr12:113657930-113659205; 12; chr12:113657930-113657987; Desconocido
99; TODOS; chr13:34950488-34951119; 13; MAB21L1; PROMOTOR
102; TODOS; chr13:49595986-49600287; 13; chr13:049599159-049599206; Desconocido
103; TODOS; chr13:94152191-94153185; 13; SOX21; CORRIENTE ABAJO
107; TODOS; chr13:113930978-113931584; 13; chr13:113931540-113931584; Desconocido
111; TODOS; chr14:36205192-36206099; 14; PAX9; INTERIOR
130; TODOS; chr15:94688798-94689131; 15; NR2F2; CORRIENTE ABAJO
133; TODOS; chr15:94696311-94696840; 15; chr15:094696796-094696840; Desconocido
134; TODOS; chr15:94705727-94706054; 15; chr15:094705808-094705853; Desconocido
136; TODOS; chr15:94712480-94712812; 15; chr15:094712480-094712531; Desconocido
145; TODOS; chr16:52873104-52882105; 16; IRX3; PROMOTOR
153; TODOS; chr16:86294154-86294408; 16; KLHDC4; CORRIENTE ABAJO
155; TODOS; chr16:87372445-87372729; 16; chr16:087372616-087372660; Desconocido
165; TODOS; chr17:44074280-44075233; 17; hsa-mir-196a-1; PROMOTOR
172; TODOS; chr17:58865328-58865618; 17; CYB561; INTERIOR
176; TODOS; chr17:73932992-73933361; 17; DNAH17; INTERIOR
181; TODOS; chr17:75531280-75531546; 17; TBC1D16; INTERIOR
183; TODOS; chr18:5186244-5187389; 18; chr18:005186349-005186393; Desconocido
193; TODOS; chr19:4059891-4060207; 19; MAP2K2; INTERIOR
209; TODOS; chr19:63784504-63785085; 19; MGC2752; INTERIOR
210; TODOS; chr2:19424445-19425131; 2; OSR1; PROMOTOR
212; TODOS; chr2:43251514-43251780; 2; chr2:043251514-043251559; Desconocido
214; TODOS; chr2:45249374-45251726; 2; chr2:045251412-045251456; Desconocido
217; TODOS; chr2:63134470-63134933; 2; OTX1; INTERIOR
220; TODOS; chr2:66525936-66527222; 2; MEIS1; INTERIOR
222; TODOS; chr2:70984709-70985764; 2; VAX2; INTERIOR
230; TODOS; chr2:105864220-105865009; 2; NCK2; INTERIOR

ES 2 721 424 T3

232; TODOS; chr2:111591678-111597436; 2; FLJ44006-BCL2L11; PROMOTOR_DIVERGENTE
238; TODOS; chr2:156892636-156892878; 2; NR4A2; INTERIOR
240; TODOS; chr2:156893736-156894685; 2; NR4A2; INTERIOR
245; TODOS; chr2:171384729-171385226; 2; GAD1; INTERIOR
254; TODOS; chr2:176737610-176738187; 2; HOXD3; INTERIOR
259; TODOS; chr20:35582018-35583550; 20; NNAT; PROMOTOR
267; TODOS; chr20:60061693-60062033; 20; TAF4; INTERIOR
281; TODOS; chr4:9756136-9756429; 4; chr4:009756149-009756196; Desconocido
284; TODOS; chr4:111780013-111780343; 4; PITX2; PROMOTOR
302; TODOS; chr5:115810975-115811393; 5; SEMA6A; INTERIOR
304; TODOS; chr5:122461778-122463450; 5; chr5:122462228-122462286; Desconocido
311; TODOS; chr5:134390896-134393045; 5; PITX1; CORRIENTE ABAJO
314; TODOS; chr5:135442969-135443206; 5; chr5:135443148-135443192; Desconocido
319; TODOS; chr5:174091287-174092335; 5; MSX2; CORRIENTE ABAJO
324; TODOS; chr6:1549606-1560865; 6; FOXC1; PROMOTOR
339; TODOS; chr7:1481682-1482268; 7; chr7:001481829-001481873; Desconocido
340; TODOS; chr7:2082782-2083345; 7; MAD1L1; INTERIOR
345; TODOS; chr7:2724511-2724848; 7; AMZ1; CORRIENTE ABAJO
349; TODOS; chr7:8449587-8450236; 7; NXPH1; INTERIOR
354; TODOS; chr7:27164708-27165039; 7; HOXA7; PROMOTOR
358; TODOS; chr7:27251165-27252762; 7; EVX1; INTERIOR
359; TODOS; chr7:32768010-32768497; 7; chr7:032768257-032768301; Desconocido
362; TODOS; chr7:55040457-55041024; 7; chr7:055040965-055041024; Desconocido
364; TODOS; chr7:96488158-96489591; 7; DLX5; INTERIOR
369; TODOS; chr7:155266364-155266696; 7; RBM33; INTERIOR
371; TODOS; chr7:155288454-155292175; 7; SHH; INTERIOR
390; TODOS; chr8:142288380-142288718; 8; SLC45A4; CORRIENTE ABAJO

## ES 2 721 424 T3

402; TODOS; chrX:39749470-39754050; X; chrX:039752648-039752692; Desconocido

Tabla 4. Islas CpG hipermetiladas en NMI-BC FGFR3 wt vs mut. Se proveen para cada una: ID; Comparación; Coordenadas de regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes con base en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006); Cromosoma; Nombre del Gen; Ubicación relativa a la secuencia de genes.

5

4; SW vs SM; chr1:2211959-2212429; 1; SKI; INTERIOR
5; SW vs SM; chr1:2226303-2228929; 1; SKI; INTERIOR
19; SW vs SM; chr1:92718496-92725197; 1; GFI1; INTERIOR
24; SW vs SM; chr1:163590111-163590435; 1; LMX1A; INTERIOR
29; SW vs SM; chr1:219134035-219134808; 1; HLX1; CORRIENTE ABAJO
35; SW vs SM; chr10:845627-845967; 10; LARP5; INTERIOR
38; SW vs SM; chr10:3150889-3151107; 10; PFKP; INTERIOR
42; SW vs SM; chr10:7489383-7495345; 10; SFMBT2; INTERIOR
44; SW vs SM; chr10:013553837-13554175; 10; C10orf30; INTERIOR GTCATCG
45; SW vs SM; chr10:13556159-13556753; 10; C10orf30; INTERIOR
47; SW vs SM; chr10:15294510-15295293; 10; C10orf38; INTERIOR
64; SW vs SM; chr10:88112905-88117344; 10; GRID1; INTERIOR
71; SW vs SM; chr10:102986025-102986636; 10; LBX1; PROMOTOR
108; SW vs SM; chr14:28317076-28317375; 14; FOXG1B; CORRIENTE ABAJO
126; SW vs SM; chr15:58079172-58079459; 15; FOXB1; PROMOTOR
127; SW vs SM; chr15:58083339-58085812; 15; FOXB1; PROMOTOR
167; SW vs SM; chr17:47590175-47591465; 17; CA10; INTERIOR
174; SW vs SM; chr17:67623575-67623903; 17; SOX9; PROMOTOR
175; SW vs SM; chr17:67627870-67631593; 17; SOX9; INTERIOR
199; SW vs SM; chr19:42586101-42586705; 19; ZNF569; CORRIENTE ABAJO
204; SW vs SM; chr19:57082579-57083180; 19; ZNF577; INTERIOR
233; SW vs SM; chr2:119329502-119332035; 2; EN1; PROMOTOR
264; SW vs SM; chr20:54633629-54640196; 20; TFAP2C; PROMOTOR

ES 2 721 424 T3

280; SW vs SM; chr3:148619483-148620015; 3; ZIC1; CORRIENTE ABAJO
289; SW vs SM; chr4:134288613-134289892; 4; PCDH10; PROMOTOR
290; SW vs SM; chr4:134291113-134293078; 4; PCDH10; INTERIOR
309; SW vs SM; chr5:133887842-133891327; 5; PHF15; PROMOTOR
328; SW vs SM; chr6:5080084-5080849; 6; LYRM4; INTERIOR
379; SW vs SM; chr8:65653638-65653908; 8; BHLHB5; PROMOTOR
386; SW vs SM; chr8:72916429-72917309; 8; MSC; INTERIOR
400; SW vs SM; chrX:2845926-2846236; X; ARSD; INTERIOR

Tabla 5. Islas CpG potencialmente involucradas en la progresión y muerte de la enfermedad. Se proveen para cada una: ID; Comparación, Coordenadas de regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes con base en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006); Cromosoma; Nombre del GEn; Ubicación relativa a la secuencia de genes.

5

406; DOD/vivo; chr2:115635091-115637285; 2; DPP10; PROMOTOR
407; DOD/vivo; chr3:62330280-62330608; 3; FEZF2; INTERIOR
408; DOD/vivo; chr3:62331767-62332398; 3; FEZF2; INTERIOR
409; DOD/vivo; chr20:22514762-22515148 20; chr20:22514762-22515148; Desconocido
410; DOD/vivo; chr20:22510737-22514165; 20; FOXA2; PROMOTOR
411; DOD/vivo; chr8:57520625-57522095; 8; PENK; PROMOTOR
412; DOD/vivo; chr17:24303411-24303889; 17; PHF12-SEZ6; PROMOTOR_DIVERGENTE
413; DOD/vivo; chr1:149638545-149639227; 1; PSMB4; PROMOTOR
414; DOD/vivo; chr21:36990008-36995832; 21; SIM2; PROMOTOR
415; DOD/vivo; chr1:232106869-232108183; 1; SLC35F3; PROMOTOR
416; DOD/vivo; chr6:21704622-21705099; 6; SOX4; INTERIOR
417; p-np; chr1:160220156-160220709; 1; OLFML2B; INTERIOR
418; p-np; chr3:129688131-129694023; 3; GATA2; INTERIOR
419; p-np; chr6:26312699-26313302; 6; HIST1H4E; INTERIOR

## ES 2 721 424 T3

Tabla 6. Cebadores y sondas para MEIS1 MS-SnapShot.

Cebadores BSP (MEIS1)						
De avance. 5' GGGTTTTTAGAGGTTAGGGGAA 3'						
Reverso. 5' CAACTAAATAACCAAACCTCTCCTC 3'						
Sondas MEIS1 A/B SNAPSHOT						
Sonda	Secuencia (5'-> 3')	Tamaño (bp)	Cadena	UM	MT	μM*
MEIS1 A	T21 GGAGAGGGGGGTTATGATGTTAGG	45	En sentido	T	C	0,2
MEIS1 B	T14 GTTTGTGGTTTTAGAGAA	34	En sentido	T	C	0,2

Tabla 7A. CGIs marcados diferencialmente entre subgrupos relativos a la sangre

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr01-2072175- <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">2072389</span>	PRKCZ	chr01:002072146-002072190	NMI-mt vs Ref
chr01-2106293-2106715	PRKCZ	chr01:002106497-002106541	MI vs Ref
	PRKCZ	chr01:002106664-002106715	NMI-wt vs Ref
chr01 -47672249-47672972	FOXD2	chr01:047671905-047671953	NMI-wt vs Ref
	FOXD2	chr01:047672191-047672235	NMI-mt vs Ref
	FOXD2	chr01:047682633-047682689	MI vs Ref
chr1:63554983-63563059	FOXD3	chr01:063559476-063559520	NMI-mt vs Ref
	FOXD3	chr01:063559476-063559520	NMI-wt vs Ref
chr01-68288825-68289104	DIRAS3	chr01:068289060-068289104	NMI-wt vs MI
	DIRAS3	chr01:068290072-068290116	NMI-wt vs Ref
chr01-71284766-71286392	PTGER3	chr01:071284980-071285024	NMI-wt vs Ref
chr1:90955098-90955445	BARHL2	chr01:090955137-090955181	NMI-mt vs Ref
chr01-119333484-119333719	TBX15	chr01:119333484-119333528	NMI-wt vs MI
	TBX15	chr01:119333569-119333613	NMI-wt vs Ref
chr1:163590111-163590435	LMX1 A	chr01:163590167-163590226	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr1:173258989-173259419	MRPS14	chr01:173259418-173259462	NMI-mt vs MI
chr01-178464743-178471598	LHX4	chr01:178470479-178470532	NMI-wt vs Ref
	LHX4	chr01:178470597-178470641	NMI-wt vs MI
	LHX4	chr01:178470597-178470641	NMI-wt vs NMI-mt
chr1:196153712-196154414	LHX9	chr01:196154203-196154247	NMI-wt vs Ref
chr1:219117072-219117487	HLX1	chr01:219117515-219117568	NMI-mt vs Ref
	HLX1	chr01:219121301-219121352	MI vs Ref
	HLX1	chr01:219134113-219134157	NMI-wt vs Ref
chr1:241719037-241719368	SDCCAG8	chr01:241719439-241719492	NMI-wt vs Ref
chr02-19424445-19425131	OSR1	chr02:019415391-019415435	NMI-mt vs Ref
	OSR1	chr02:019424965-019425009	NMI-wt vs Ref
chr02-45249374-45251726	SIX3	chr02:045013420-045013464	NMI-wt vs Ref
	SIX3	chr02:045015982-045016033	MI vs Ref
	SIX3	chr02:045015982-045016033	NMI-mt vs Ref
	SIX2	chr02:045085251-045085298	NMI-wt vs Ref
chr2:54536404-54537878	SPTBN1	chr02:054536311-054536361	NMI-wt vs Ref
chr02-63134470-63134933	OTX1	chr02:063134470-063134515	MI vs Ref
	OTX1	chr02:063134470-063134515	NMI-mt vs Ref
	OTX1	chr02:063134803-063134847	NMI-wt vs Ref
chr02-66525936-66527222	MEIS1	chr02:066525898-066525942	MI vs Ref
	MEIS1	chr02:066526023-066526067	NMI-mt vs Ref
	MEIS1	chr02:066526791-066526835	NMI-wt vs Ref
chr02-70984709-70985764	VAX2	chr02:070985519-070985563	MI vs Ref
	VAX2	chr02:070985519-070985563	NMI-wt vs Ref
chr02-72224630-72228512	CYP26B1	chr02:072227412-072227461	NMI-wt vs Ref
	CYP26B1	chr02:072227537-072227583	NMI-wt vs MI

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr2:73004709-73005568	EMX1	chr02:073004783-073004827	NMI-wt vs Ref
chr2:85213468-85216104	TCF7L1	chr02:085215511-085215555	NMI-wt vs Ref
	TCF7L1	chr02:085216153-085216212	NMI-mt vs Ref
chr02-105864220-105865009	NCK2	chr02:105864372-105864417	NMI-wt vs Ref
	NCK2	chr02:105864443-105864487	NMI-mt vs Ref
	NCK2	chr02:105864906-105864950	MI vs Ref
chr02-111591678-111597436	FLJ44006- BCL2L11	chr02:111592037-111592081	NMI-mt vs Ref
	FLJ44006- BCL2L11	chr02:111593125-111593170	NMI-wt vs Ref
chr02-115635091-115637285	DPP10	chr02:115636612-115636656	NMI-wt vs Ref
chr2:119329502-119332035	EN1	chr02:119330694-119330738	NMI-wt vs Ref
chr02-156892636-156892878	NR4A2	chr02:156892639-156892683	MI vs Ref
chr02-156893736-156894685	NR4A2	chr02:156894489-156894533	NMI-mt vs Ref
	NR4A2	chr02:156894576-156894620	NMI-wt vs Ref
chr02-171384729-171385226	GAD1	chr02:171384729-171384773	MI vs Ref
	GAD1	chr02:171385019-171385063	NMI-mt vs Ref
	GAD1	chr02:171385019-171385063	NMI-wt vs Ref
chr2:172653235-172653630	MAP1 D	chr02:172653288-172653332	NMI-wt vs Ref
chr2:174907710-174910885	FLJ46347	chr02:174910857-174910905	NMI-wt vs Ref
chr2:176652334-176656692	EVX2	chr02:176655532-176655591	NMI-mt vs Ref
	EVX2	chr02:176656139-176656183	NMI-wt vs Ref
	EVX2	chr02:176656517-176656563	MI vs Ref
chr2:176720618-176720921	hsa-mir-10b	chr02:176720535-176720594	NMI-mt vs Ref
	hsa-mir-10b	chr02:176720535-176720594	NMI-wt vs Ref
chr02-176737610-176738187	HOXD3	chr02:176737609-176737653	NMI-mt vs Ref
	HOXD3	chr02:176737609-176737653	NMI-mt vs MI

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
	HOXD3	chr02:176738050-176738094	NMI-wt vs Ref
	CENTG2	chr02:236438664-236438711	NMI-wt vs Ref
chr3:11721578-11721824	VGLL4	chr03:011721492-011721547	NMI-wt vs Ref
chr3:12983649-12984210	IQSEC1	chr03:012983600-012983644	NMI-wt vs Ref
chr3:25680561-25681574	TOP2B	chr03:025681366-025681410	NMI-wt vs Ref
chr03-129688131-129694023	GATA2	chr03:129692644-129692688	MI vs Ref
	GATA2	chr03:129698463-129698509	NMI-wt vs Ref
chr03-148591199-148594390	ZIC4	chr03:148592447-148592499	NMI-wt vs Ref
chr3:148613030-148613264	ZIC1	chr03:148613058-148613102	NMI-mt vs Ref
	ZIC1	chr03:148619483-148619541	NMI-wt vs Ref
chr4:4910534-4911092	MSX1	chr04:004910620-004910670	MI vs Ref
	MSX1	chr04:004910620-004910670	NMI-mt vs Ref
	MSX1	chr04:004910620-004910670	NMI-wt vs Ref
chr4:30330303-30333940	PCDH7	chr04:030333744-030333788	NMI-mt vs Ref
	PCDH7	chr04:030333834-030333878	NMI-wt vs Ref
chr4:41678680-41678940	WDR21B	chr04:041678597-041678646	NMI-wt vs Ref
chr4:85636684-85639823	NKX6-1	chr04:085637474-085637518	NMI-wt vs Ref
chr4:94974810-94975333	ATOH1	chr04:094974874-094974918	NMI-wt vs Ref
chr04-111780013-111780343	PITX2	chr04:111780048-111780092	NMI-mt vs Ref
	PITX2	chr04:111780288-111780343	NMI-wt vs Ref
	PCDH10	chr04:134291474-134291518	NMI-wt vs Ref
	NR3C2	chr04:149586403-149586447	NMI-wt vs Ref
	TRIM2	chr04:154436244-154436288	NMI-wt vs Ref
chr04-155881084-155881434	LRAT	chr04:155881084-155881128	NMI-wt vs Ref
	LRAT	chr04:155881330-155881378	NMI-wt vs MI
	HAND2	chr04:174687934-174687985	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr4:184255825-184258373	FLJ30277	chr04:184255924-184255968	NMI-wt vs Ref
chr5:360287-360592	PDCD6	chr05:000360593-000360637	NMI-wt vs Ref
chr5:1161803-1162051	SLC12A7	chr05:001162056-001162100	NMI-wt vs Ref
chr5:3647468-3656054	IRX1	chr05:003654466-003654525	NMI-wt vs Ref
chr5:5192442-5193941	ADAMTS16	chr05:005192514-005192558	NMI-wt vs Ref
chr5:6790705-6791004	POLS	chr05:006790682-006790728	NMI-wt vs Ref
chr5:54554812-54555385	UNG2	chr05:054555175-054555219	NMI-wt vs Ref
	UNG2	chr05:054555391-054555442	NMI-mt vs Ref
chr5:114542616-114544119	TRIM36	chr05:114542773-114542817	NMI-wt vs Ref
chr05-115810975-115811393	SEMA6A	chr05:115811349-115811393	NMI-wt vs Ref
chr5:127899858-127900162	FBN2	chr05:127900012-127900056	NMI-wt vs MI
	FBN2	chr05:127900012-127900056	NMI-wt vs NMI-mt
	FBN2	chr05:127900101-127900154	NMI-wt vs Ref
chr05-134390896-134393045	PITX1	chr05:134390896-134390940	MI vs Ref
	PITX1	chr05:134390896-134390940	NMI-wt vs Ref
	PITX1	chr05:134391093-134391137	NMI-mt vs Ref
	TRPC7	chr05:135720277-135720321	NMI-wt vs Ref
chr05-140724146-140724826	PCDHGA5	chr05:140724562-140724606	NMI-wt vs Ref
chr5:140780945-140781256	PCDHGA11	chr05:140781192-140781236	NMI-wt vs Ref
	PCDHGA12	chr05:140791316-140791360	NMI-mt vs Ref
	PCDHGA12	chr05:140791441-140791494	NMI-wt vs Ref
chr5:141235749-141238152	PCDH1	chr05:141237048-141237094	NMI-wt vs Ref
chr05-174091287-174092335	MSX2	chr05:174091297-174091341	NMI-wt vs Ref
	MSX2	chr05:174091410-174091454	MI vs Ref
	MSX2	chr05:174091473-174091517	NMI-mt vs Ref
chr6:1326743-1330210	FOXF2	chr06:001329813-001329866	NMI-mt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
	FOXF2	chr06:001329813-001329866	NMI-wt vs Ref
chr06:1549606-1560865	FOXC1	chr06:001551371-001551415	NMI-mt vs Ref
	FOXC1	chr06:001551429-001551473	NMI-wt vs Ref
	FOXC1	chr06:001551500-001551559	MI vs Ref
chr6:5947471-5950124	NRN1	chr06:005947569-005947613	NMI-wt vs Ref
chr6:10498025-10498551	TFAP2A	chr06:010498473-010498517	MI vs Ref
	TFAP2A	chr06:010498473-010498517	NMI-wt vs Ref
	TFAP2A	chr06:010498811-010498870	NMI-mt vs Ref
chr6:22677564-22678684	HDGFL1	chr06:022677587-022677632	MI vs Ref
	HDGFL1	chr06:022677587-022677632	NMI-mt vs Ref
	HDGFL1	chr06:022677587-022677632	NMI-wt vs Ref
chr6:25834434-25834701	HIST1H2AA	chr06:025834650-025834695	NMI-wt vs Ref
	HIST1H2BA	chr06:025840937-025840981	NMI-wt vs Ref
chr6:41176454-41177326	NFYA	chr06:041177112-041177165	NMI-wt vs Ref
chr6:50895246-50896050	TFAP2B	chr06:050896068-050896112	NMI-wt vs Ref
chr6:75968300-75968853	COL12A1	chr06:075968669-075968713	NMI-wt vs Ref
chr06-101023927-101024343	SIM1	chr06:101024299-101024343	NMI-mt vs Ref
	SIM1	chr06:101024299-101024343	NMI-wt vs Ref
chr6:101953488-101953856	GRIK2	chr06:101953514-101953560	NMI-mt vs Ref
	GRIK2	chr06:101953514-101953560	NMI-wt vs Ref
chr6:108592365-108597232	NR2E1	chr06:108595517-108595561	NMI-wt vs Ref
chr6:126122028-126122524	HEY2	chr06:126122132-126122176	NMI-wt vs Ref
chr6:166499964-166503413	T	chr06:166502963-166503011	NMI-wt vs Ref
chr6:169801163-169801511	WDR27	chr06:169801059-169801108	NMI-wt vs Ref
chr7:1029023-1029492	hsa-mir-339	chr07:001029489-001029533	NMI-wt vs Ref
chr07-2082782-2083345	MAD1L1	chr07:002083155-002083200	MI vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
	MAD1L1	chr07:002083155-002083200	NMI-wt vs Ref
	MAD1L1	chr07:002121288-002121332	NMI-mt vs Ref
chr07-2724511-2724848	AMZ1	chr07:002724511-002724555	MI vs Ref
	AMZ1	chr07:002724511-002724555	NMI-wt vs Ref
	AMZ1	chr07:002724629-002724673	NMI-mt vs Ref
chr07-8449587-8450236	NXPH1	chr07:008449587-008449636	NMI-mt vs Ref
	NXPH1	chr07:008449587-008449636	NMI-wt vs Ref
	NXPH1	chr07:008450192-008450240	MI vs Ref
chr7:19113449-19113833	TWIST1	chr07:019113860-019113907	NMI-wt vs Ref
chr7:27149139-27152087	HOXA5	chr07:027150566-027150625	MI vs Ref
	HOXA5	chr07:027151311-027151355	NMI-mt vs Ref
chr07-27164708-27165039	HOXA7	chr07:027164869-027164913	MI vs Ref
	HOXA7	chr07:027164869-027164913	NMI-mt vs Ref
	HOXA7	chr07:027164944-027164988	NMI-wt vs Ref
chr7:27170441-27172987	HOXA9	chr07:027170467-027170515	NMI-mt vs Ref
	HOXA9	chr07:027170467-027170515	NMI-wt vs Ref
	HOXA9	chr07:027170998-027171042	MI vs Ref
chr7:27198331-27199622	HOXA11	chr07:027198283-027198327	NMI-wt vs Ref
chr07-27219187-27220360	EVX1	chr07:027245650-027245694	NMI-wt vs Ref
chr07-27251165-27252762	EVX1	chr07:027251482-027251527	MI vs Ref
chr7:35263447-35264743	TBX20	chr07:035263668-035263712	NMI-wt vs Ref
chr7:96469320-96469736	DLX6	chr07:096469212-096469266	NMI-mt vs Ref
	DLX6	chr07:096469526-096469572	MI vs Ref
	DLX6	chr07:096469776-096469827	NMI-wt vs Ref
chr07-96488158-96489591	DLX5	chr07:096489129-096489173	NMI-mt vs Ref
	DLX5	chr07:096489475-096489520	MI vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
	DLX5	chr07:096489536-096489591	NMI-wt vs Ref
chr7:119702299-119702721	KCND2	chr07:119702676-119702723	NMI-wt vs Ref
chr07-121727243-121727884	FEZF1	chr07:121727241-121727285	NMI-wt vs MI
	FEZF1	chr07:121727336-121727380	NMI-wt vs Ref
chr07-155288454-155292175	SHH	chr07:155291537-155291581	MI vs Ref
	SHH	chr07:155291593-155291637	NMI-mt vs Ref
	SHH	chr07:155291751-155291795	NMI-wt vs Ref
chr7:158509937-158510390	VIPR2	chr07:158509989-158510033	NMI-wt vs Ref
chr08-9798161-9799053	hsa-mir -124a-1	chr08:009798455-009798508	NMI-wt vs NMI-mt
	hsa-mir-124a-1	chr08:009798593-009798644	NMI-wt vs Ref
	hsa-mir-124a-1	chr08:009800023-009800077	NMI-wt vs MI
chr8:10624024-10624296	SOX7	chr08:010624244-010624300	NMI-mt vs Ref
	SOX7	chr08:010624319-010624366	NMI-wt vs Ref
chr8:11597006-11600365	GATA4	chr08:011599544-011599588	NMI-wt vs Ref
chr8:25955253-25955609	EBF2	chr08:025955446-025955495	NMI-mt vs Ref
	EBF2	chr08:025955446-025955495	NMI-wt vs Ref
chr8:55532724-55535078	SOX17	chr08:055533948-055533992	NMI-wt vs Ref
chr08-65661156-65662687	BHLHB5	chr08:065661235-065661282	NMI-wt vs MI
	BHLHB5	chr08:065662258-065662302	NMI-wt vs Ref
chr8:72916429-72917309	MSC	chr08:072917197-072917241	MI vs Ref
	MSC	chr08:072917336-072917380	NMI-wt vs Ref
chr8:140700279-140700514	KCNK9	chr08:140700520-140700564	NMI-wt vs Ref
chr08-142288380-142288718	SLC45A4	chr08:142288398-142288442	NMI-mt vs Ref
	SLC45A4	chr08:142288610-142288657	MI vs Ref
	SLC45A4	chr08:142288610-142288657	NMI-wt vs Ref
chr8:145014900-145015187	EPPK1	chr08:145015195-145015240	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr9:959530-963276	DMRT3	chr09:000959621-000959665	NMI-wt vs Ref
chr9:21979774-21980108	CDKN2A	chr09:021979951-021979995	NMI-wt vs Ref
chr9:23812413-23812667	ELAVL2	chr09:023812373-023812424	NMI-wt vs Ref
chr9:37024136-37028341	PAX5	chr09:037024964-037025008	NMI-wt vs Ref
chr9:101621613-101627382	NR4A3	chr09:101627386-101627439	NMI-wt vs Ref
chr10-7489383-7495345	SFMBT2	chr10:007491431-007491476	NMI-wt vs Ref
	SFMBT2	chr10:007491576-007491626	NMI-wt vs NMI-mt
chr10:13556172-13556753	C10orf30	chr10:013556159-013556211	NMI-wt vs Ref
chr10: 15294605-15294858	C10orf38	chr10:015294592-015294641	NMI-wt vs Ref
chr10-21828640-21829645	C10orf114	chr10:021828885-021828929	NMI-wt vs Ref
	C10orf114	chr10:021828954-021828998	NMI-mt vs Ref
	C10orf114	chr10:021829373-021829417	MI vs Ref
chr10:76825135-76839606	ZNF503	chr10:076834917-076834976	NMI-wt vs Ref
	ZNF503	chr10:076837381-076837425	NMI-mt vs Ref
chr10:88112905-88117344	GRID1	chr10:088115612-088115656	NMI-wt vs Ref
chr10:94441310-94441717	HHEX	chr10:094441395-094441439	NMI-mt vs Ref
	HHEX	chr10:094441744-094441795	NMI-wt vs Ref
chr10:99068802-99071038	FRAT1	chr10:099070245-099070298	NMI-wt vs Ref
	FRAT1	chr10:099070376-099070420	NMI-mt vs Ref
chr10:101277153-101277910	NKX2-3	chr10:101277900-101277957	NMI-wt vs Ref
chr10:102974173-102980053	LBX1	chr10:102975940-102975999	NMI-wt vs Ref
	LBX1	chr10:102976227-102976273	NMI-wt vs MI
	LBX1	chr10:102976227-102976273	NMI-wt vs NMI-mt
chr10:106389558-106392802	SORCS3	chr10:106392567-106392611	NMI-wt vs Ref
chr10:124891898-124892607	HMX2	chr10:124892023-124892067	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr10:128863581-128864054	FLJ45557	chr10:128864100-128864145	NMI-wt vs Ref
chr11:22319439-22319953	SLC17A6	chr11:022319657-022319701	NMI-wt vs Ref
chr11:31776637-31777992	PAX6	chr11:031776609-031776653	NMI-wt vs Ref
chr11:68274244-68274755	MTL5	chr11:068274304-068274348	NMI-mt vs Ref
chr11:117983446-117987106	PHLDB1	chr11:117984800-117984844	NMI-wt vs Ref
chr12:1844001-1845219	CACNA2D4	chr12:001844114-001844158	NMI-wt vs Ref
chr12:40253533-40253742	PDZRN4	chr12:040253480-040253529	NMI-wt vs Ref
chr12:52726910-52727810	HOXC4	chr12:052727781-052727833	NMI-mt vs Ref
	HOXC4	chr12:052727781-052727833	NMI-wt vs Ref
chr12:79634857-79635257	MYF5	chr12:079634813-079634857	NMI-wt vs Ref
chr12:94776044-94776377	SNRPF	chr12:094776044-094776094	NMI-wt vs Ref
chr12:95164929-95165298	ELK3	chr12:095165171-095165220	NMI-wt vs Ref
chr12-113657930-113659205	TBX5	chr12:113325125-113325174	NMI-wt vs Ref
chr12:113609113-113609535	TBX3	chr12:113609153-113609207	MI vs Ref
	TBX3	chr12:113609259-113609303	MI vs NMI-wt
chr13-34950488-34951119	MAB21L1	chr13:034950488-034950532	MI vs Ref
	MAB21L1	chr13:034950709-034950765	NMI-wt vs Ref
	MAB21L1	chr13:034950955-034950999	NMI-mt vs Ref
chr13:35817738-35819004	SPG20	chr13:035817882-035817927	NMI-mt vs MI
chr13:57101588-57102323	PCDH17	chr13:057101685-057101729	NMI-wt vs Ref
	PCDH17	chr13:057105585-057105629	NMI-mt vs Ref
chr13-94152191-94153185	SOX21	chr13:094152286-094152330	MI vs Ref
	SOX21	chr13:094152463-094152507	NMI-mt vs Ref
	SOX21	chr13:094152463-094152507	NMI-wt vs Ref
chr13:105943410-105943788	EFNB2	chr13:105943362-105943406	NMI-mt vs Ref
	EFNB2	chr13:105943488-105943532	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr13:111763361-111764235	SOX1	chr13:111764262-111764315	NMI-wt vs Ref
chr13:112249708-112249928	TUBGCP3	chr13:112249984-112250030	NMI-wt vs Ref
chr14:19992581-19993863	APEX1	chr14:019993551-019993604	NMI-mt vs MI
chr14:23710894-23712060	REC8L1	chr14:023711936-023711980	NMI-mt vs Ref
chr14:28317076-28317375	FOXG1B	chr14:028317289-028317343	NMI-wt vs Ref
chr14:33338698-33340189	NPAS3	chr14:033339869-033339913	NMI-wt vs Ref
chr14:36122289-36122589	NKX2-8	chr14:036122225-036122274	MI vs Ref
	NKX2-8	chr14:036123184-036123232	NMI-wt vs Ref
chr14-36205192-36206099	PAX9	chr14:036196442-036196486	NMI-mt vs Ref
	PAX9	chr14:036205602-036205647	MI vs Ref
	PAX9	chr14:036206112-036206171	NMI-wt vs Ref
chr14:37137198-37138958	FOXA1	chr14:037137114-037137159	NMI-wt vs Ref
	FOXA1	chr14:037137543-037137587	NMI-mt vs Ref
chr14:56347822-56348040	OTX2	chr14:056347712-056347756	NMI-wt vs Ref
chr14:60045486-60047933	SIX6	chr14:060046995-060047041	NMI-wt vs Ref
chr14:60173732-60174416	SIX1	chr14:060173710-060173754	NMI-mt vs Ref
	SIX1	chr14:060179528-060179574	NMI-wt vs Ref
chr14:98781593-98783184	BCL11B	chr14:098782637-098782681	NMI-mt vs Ref
chr15:50867751-50870991	ONECUT1	chr15:050870481-050870525	NMI-wt vs Ref
chr15:58083428-58085812	FOXB1	chr15:058084349-058084393	NMI-wt vs Ref
chr15:62984853-62985116	ANKDD1A	chr15:062984784-062984834	NMI-wt vs Ref
chr15:65902540-65909629	LBXCOR1	chr15:065908791-065908850	NMI-wt vs Ref
chr15:72206924-72210097	ISLR2	chr15:072206870-072206914	NMI-wt vs Ref
chr15:74414579-74414893	ISL2	chr15:074414745-074414789	NMI-wt vs Ref
chr15:88158407-88159577	ANPEP	chr15:088158433-088158477	NMI-wt vs Ref
chr15-94688798-94689131	NR2F2	chr15:094688839-094688885	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
	NR2F2	chr15:094688901-094688949	MI vs Ref
	NR2F2	chr15:094689087-094689131	NMI-mt vs Ref
chr16:727072-727328	NARFL	chr16:000727383-000727427	NMI-wt vs Ref
	CBLN1	chr16:047869472-047869516	NMI-wt vs Ref
chr16-52873104-52882105	IRX3	chr16:052879704-052879750	NMI-mt vs Ref
	IRX3	chr16:052879918-052879974	NMI-wt vs Ref
	IRX3	chr16:052880382-052880426	MI vs Ref
	IRX5	chr16:053528320-053528364	NMI-wt vs Ref
chr16:66071900-66072846	ATP6V0D1	chr16:066071973-066072017	NMI-mt vs MI
chr16-85098883-85102729	FOXF1	chr16:085098933-085098977	NMI-wt vs Ref
	CNTNAP1	chr17:038089272-038089316	NMI-mt vs Ref
	CNTNAP1	chr17:038089272-038089316	NMI-wt vs Ref
chr17-44074280-44075233	HOXB5	chr17:044026017-044026069	MI vs Ref
	HOXB5	chr17:044026017-044026069	NMI-wt vs Ref
	hsa-mir-196a-1	chr17:044074404-044074448	NMI-wt vs Ref
	hsa-mir-196a-1	chr17:044074457-044074501	NMI-mt vs Ref
chr17-58865328-58865618	CYB561	chr17:058865281-058865326	MI vs Ref
	CYB561	chr17:058865281-058865326	NMI-wt vs Ref
	CYB561	chr17:058865512-058865556	NMI-mt vs Ref
chr17:67627870-67631593	SOX9	chr17:067630891-067630945	NMI-wt vs Ref
chr17:71582000-71585125	GALR2	chr17:071583191-071583235	NMI-mt vs MI
chr17-75531280-75531546	TBC1D16	chr17:075531439-075531483	NMI-wt vs Ref
chr17:75936057-75936582	C17orf27	chr17:075936313-075936368	MI vs Ref
	C17orf27	chr17:075936313-075936368	NMI-wt vs Ref
chr17:76404186-76404427	KIAA1303	chr17:076404103-076404162	MI vs Ref
	KIAA1303	chr17:076404103-076404162	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr17:77537903-77538626	ASPSCR1	chr17:077538538-077538583	NMI-wt vs Ref
chr18:894579-899574	ADCYAP1	chr18:000899042-000899087	NMI-wt vs Ref
chr18-5186244-5187389	ONECUT2	chr18:053259508-053259552	NMI-mt vs Ref
	ONECUT2	chr18:053259508-053259552	NMI-wt vs Ref
chr18-68359955-68362770	CBLN2	chr18:068361299-068361343	NMI-wt vs MI
chr18:74837994-74842232	SALL3	chr18:074838538-074838582	NMI-wt vs Ref
chr18:75565313-75565933	CTDP1	chr18:075565319-075565363	NMI-wt vs Ref
chr19:898548-898981	ARID3A	chr19:000898650-000898694	NMI-wt vs Ref
chr19-4059891-4060207	MAP2K2	chr19:004059891-004059935	NMI-wt vs Ref
	MAP2K2	chr19:004060122-004060166	MI vs Ref
	MAP2K2	chr19:004060122-004060166	NMI-mt vs Ref
chr19:9131907-9132918	ZNF317	chr19:009132692-009132736	NMI-wt vs Ref
chr19:12985960-12986259	NFIX	chr19:012986040-012986084	NMI-wt vs Ref
chr19-42586165-42586705	ZNF569	chr19:042586544-042586592	NMI-wt vs Ref
chr19:55553586-55553895	NAPSA	chr19:055553837-055553881	NMI-wt vs Ref
chr19:57082654-57083180	ZNF577	chr19:057082979-057083023	NMI-wt vs Ref
chr19:60283718-60285792	EPS8L1	chr19:060285492-060285536	NMI-mt vs Ref
chr19:60907042-60907388	EPN1	chr19:060907107-060907151	NMI-mt vs Ref
	EPN1	chr19:060907320-060907364	NMI-wt vs Ref
chr19:62043096-62043807	PEG3	chr19:062043010-062043054	NMI-wt vs Ref
chr19:63321122-63322053	ZNF329	chr19:063321824-063321868	NMI-wt vs Ref
chr19-63420090-63420541	ZNF274	chr19:063420437-063420481	NMI-wt vs Ref
chr19-63784504-63785085	MGC2752	chr19:063784639-063784683	NMI-wt vs Ref
	MGC2752	chr19:063784804-063784848	MI vs Ref
	MGC2752	chr19:063784804-063784848	NMI-mt vs Ref
chr20 :9444472-9444893	C20orf103	chr20:0094444951-0094444998	NMI-wt vs Ref

ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr20:21433933-21444714	NKX2-2	chr20:021439947-021439991	NMI-wt vs Ref
chr20-22505518-22507240	FOXA2	chr20:022505822-022505866	NMI-wt vs MI
chr20-22510737-22514165	FOXA2	chr20:022505888-022505938	NMI-wt vs Ref
chr20-22514762-22515148	FOXA2	chr20:022507864-022507908	NMI-wt vs NMI-mt
chr20:23294035-23294650	GZF1	chr20:023294489-023294536	NMI-wt vs Ref
chr20:25011839-25013525	VSX1	chr20:025011908-025011952	NMI-wt vs Ref
chr20-35582018-35583550	NNAT	chr20:035582918-035582969	NMI-mt vs Ref
	NNAT	chr20:035582918-035582969	NMI-wt vs Ref
chr20:36785545-36790786	SLC32A1	chr20:036787891-036787941	NMI-wt vs Ref
chr20:38749965-38753401	MAFB	chr20:038753128-038753174	NMI-mt vs Ref
	MAFB	chr20:038753269-038753318	NMI-wt vs Ref
chr20:49542203-49542863	NFATC2	chr20:049542266-049542311	NMI-wt vs Ref
chr20-54012011-54014085	CBLN4	chr20:054013134-054013178	NMI-wt vs Ref
chr20:54411932-54412178	CSTF1	chr20:054412143-054412187	NMI-wt vs Ref
chr20:55680656-55681057	TMEPAI	chr20:055680906-055680952	NMI-wt vs Ref
chr20:56860125-56860442	GNAS	chr20:056860480-056860524	NMI-wt vs Ref
chr20-60061693-60062033	TAF4	chr20:060015181-060015225	MI vs Ref
	TAF4	chr20:060062094-060062139	NMI-wt vs Ref
chr20:62371744-62371958	PCMTD2	chr20:062371900-062371944	NMI-wt vs Ref
chr21-33316999-33322115	OLIG2	chr21:033318624-033318681	NMI-wt vs Ref
chr21-36990008-36995832	SIM2	chr21:036991619-036991663	NMI-wt vs Ref
	SIM2	chr21:036999107-036999151	MI vs Ref
chr21-43350621-43351134	HSF2BP	chr21:043902052-043902096	MI vs Ref
	HSF2BP	chr21:043902052-043902096	NMI-mt vs Ref
chr21:45511336-45511549	POFUT2	chr21:045511551-045511595	NMI-wt vs Ref
chr21:46892946-46893236	PRMT2	chr21:046893181-046893225	NMI-wt vs Ref

## ES 2 721 424 T3

CGI	Nombre del gen	Ubicación de la sonda	Subgrupo
chr22:18453364-18453931	DGCR8	chr22:018453720-018453764	NMI-wt vs Ref

Tabla 7B. Secuencias de los CGI marcados diferencialmente entre los subgrupos de cáncer de vejiga en relación con la sangre

CGI: rango 561 =chr1:63554983-63563059
CGI: rango 26 =chr1:90955098-90955445
CGI: rango 29 =chr1:163590111-163590435
CGI: rango 32 =chr1:173258989-173259419
CGI: rango 58 =chr1:196153712-196154414
CGI: rango 43 =chr1:219117072-219117487
CGI: rango 25 =chr1:241719037-241719368
CGI: rango 132 =chr2:54536404-54537878
CGI: rango 77 =chr2:73004709-73005568
CGI: rango 221 =chr2:85213468-85216104
CGI: rango 173 =chr2:119329502-119332035
CGI: rango 36 =chr2:172653235-172653630
CGI: rango 295 =chr2:174907710-174910885
CGI: rango 289 =chr2:176652334-176656692
CGI: rango 25 =chr2:176720618-176720921
CGI: rango 20 =chr2:236438623-236438823
CGI: rango 22 =chr3:11721578-11721824
CGI: rango 68 =chr3:12983649-12984210
CGI: rango 120 =chr3:25680561-25681574
CGI: rango 23 =chr3:148613030-148613264
CGI: rango 41 =chr4:4910534-4911092
CGI: rango 300 =chr4:30330303-30333940
CGI: rango 21 =chr4:41678680-41678940

## ES 2 721 424 T3

CGI: rango 217 =chr4:85636684-85639823
CGI: rango 39 =chr4:94974810-94975333
CGI: rango 162 =chr4:134291113-134293078
CGI: rango 308 =chr4:149582663-149586506
CGI: rango 44 =chr4:154436043-154436665
CGI: rango 122 =chr4:174686622-174688044
CGI: rango 245 =chr4:184255825-184258373
CGI: rango 33 =chr5:360287-360592
CGI: rango 18 =chr5:1161803-1162051
CGI: rango 584 =chr5:3647468-3656054
CGI: rango 140 =chr5:5192442-5193941
CGI: rango 21 =chr5:6790705-6791004
CGI: rango 54 =chr5:54554812-54555385
CGI: rango 129 =chr5:114542616-114544119
CGI: rango 21 =chr5:127899858-127900162
CGI: rango 56 =chr5:135720297-135720941
CGI: rango 29 =chr5:140780945-140781256
CGI: rango 182 =chr5:141235749-141238152
CGI: rango 263 =chr6:1326743-1330210
CGI: rango 190 =chr6:5947471-5950124
CGI: rango 40 =chr6:10498025-10498551
CGI: rango 100 =chr6:22677564-22678684
CGI: rango 20 =chr6:25834434-25834701
CGI: rango 71 =chr6:41176454-41177326
CGI: rango 68 =chr6:50895246-50896050 ]
CGI: rango 43 =chr6:75968300-75968853
CGI: rango 27 =chr6:101953488-101953856

## ES 2 721 424 T3

CGI: rango 318 =chr6:108592365-108597232
CGI: rango 38 =chr6:126122028-126122524
CGI: rango 270 =chr6:166499964-166503413
CGI: rango 25 =chr6:169801163-169801511
CGI: rango 40 =chr7:1029023-1029492
CGI: rango 26 =chr7:19113449-19113833
CGI: rango 207 =chr7:27149139-27152087
CGI: rango 201 =chr7:27170441-27172987
CGI: rango 114 =chr7:27198331-27199622
CGI: rango 111 =chr7:35263447-35264743
CGI: rango 30 =chr7:96469320-96469736 ]
CGI: rango 32 =chr7:119702299-119702721
CGI: rango 42 =chr7:158509937-158510390
CGI: rango 20 =chr8:10624024-10624296
CGI: rango 221 =chr8:11597006-11600365
CGI: rango 25 =chr8:25955253-25955609
CGI: rango 233 =chr8:55532724-55535078
CGI: rango 74 =chr8:72916429-72917309
CGI: rango 17 =chr8:140700279-140700514
CGI: rango 21 =chr8:145014900-145015187
CGI: rango 260 =chr9:959530-963276
CGI: rango 25 =chr9:21979774-21980108
CGI: rango 20 =chr9:23812413-23812667
CGI: rango 278 =chr9:37024136-37028341
CGI: rango 392 =chr9:101621613-101627382
CGI: rango 56 =chr10:13556172-13556753
CGI: rango 22 =chr10:15294605-15294858

## ES 2 721 424 T3

CGI: rango 987 =chr10:76825135-76839606
CGI: rango 356 =chr10:88112905-88117344
CGI: rango 34 =chr10:94441310-94441717
CGI: rango 182 =chr10:99068802-99071038
CGI: rango 56 =chr10:101277153-101277910
CGI: rango 403 =chr10:102974173-102980053
CGI: rango 295 =chr10:106389558-106392802
CGI: rango 56 =chr10:124891898-124892607
CGI: rango 32 =chr10:128863581-128864054
CGI: rango 38 =chr11:22319439-22319953
CGI: rango 98 =chr11:31776637-31777992
CGI: rango 61 =chr11:68274244-68274755
CGI: rango 269 =chr11:117983446-117987106
CGI: rango 97 =chr12:1844001-1845219
CGI: rango 16 =chr12:40253533-40253742
CGI: rango 79 =chr12:52726910-52727810
CGI: rango 32 =chr12:79634857-79635257
CGI: rango 30 =chr12:95164929-95165298
CGI: rango 35 =chr12:113609113-113609535
CGI: rango 121 =chr13:35817738-35819004
CGI: rango 58 =chr13:57101588-57102323
CGI: rango 30 =chr13:105943410-105943788
CGI: rango 74 =chr13:111763361-111764235
CGI: rango 28 =chr13:112249708-112249928
CGI: rango 87 =chr14:19992581-19993863
CGI: rango 79 =chr14:23710894-23712060
CGI: rango 23 =chr14:28317076-28317375

## ES 2 721 424 T3

CGI: rango 147 =chr14:33338698-33340189
CGI: rango 22 =chr14:36122289-36122589
CGI: rango 123 =chr14:37137198-37138958
CGI: rango 20 =chr14:56347822-56348040
CGI: rango 178 =chr14:60045486-60047933
CGI: rango 54 =chr14:60173732-60174416
CGI: rango 133 =chr14:98781593-98783184
CGI: rango 248 =chr15:50867751-50870991
CGI: rango 226 =chr15:58083428-58085812
CGI: rango 22 =chr15:62984853-62985116
CGI: rango 541 =chr15:65902540-65909629
CGI: rango 216 =chr15:72206924-72210097
CGI: rango 32 =chr15:74414579-74414893
CGI: rango 109 =chr15:88158407-88159577
CGI: rango 21 =chr16:727072-727328
CGI: rango 61 =chr16:47868915-47869809
CGI: rango 179 =chr16:53527803-53530347
CGI: rango 78 =chr16:66071900-66072846
CGI: rango 39 =chr17:38089258-38089793
CGI: rango 69 =chr17:44074360-44075233
CGI: rango 269 =chr17:67627870-67631593
CGI: rango 260 =chr17:71582000-71585125
CGI: rango 38 =chr17:75936057-75936582
CGI: rango 22 =chr17:76404186-76404427
CGI: rango 53 =chr17:77537903-77538626
CGI: rango 330 =chr18:894579-899574
CGI: rango 338 =chr18:74837994-74842232

## ES 2 721 424 T3

CGI: rango 43 =chr18:75565313-75565933
CGI: rango 33 =chr19:898548-898981
CGI: rango 70 =chr19:9131907-9132918
CGI: rango 25 =chr19:12985960-12986259
CGI: rango 35 =chr19:55553586-55553895
CGI: rango 47 =chr19:57082654-57083180
CGI: rango 159 =chr19:60283718-60285792
CGI: rango 34 =chr19:60907042-60907388
CGI: rango 61 =chr19:62043096-62043807
CGI: rango 94 =chr19:63321122-63322053
CGI: rango 35 =chr20:9444472-9444893
CGI: rango 671 =chr20:21433933-21444714
CGI: rango 61 =chr20:23294035-23294650
CGI: rango 118 =chr20:25011839-25013525
CGI: rango 380 =chr20:36785545-36790786
CGI: rango 315 =chr20:38749965-38753401
CGI: rango 43 =chr20:49542203-49542863
CGI: rango 20 =chr20:54411932-54412178
CGI: rango 30 =chr20:55680656-55681057
CGI: rango 26 =chr20:56860125-56860442
CGI: rango 18 =chr20:62371744-62371958
CGI: rango 22 =chr21:45511336-45511549
CGI: rango 24 =chr21:46892946-46893236
CGI: rango 38 =chr22:18453364-18453931

ES 2 721 424 T3

Tabla 8. Genes diana de PcG metilados en todos los tumores de vejiga o subgrupos específicos.

Todos	NMI-wt solamente	NMI-mt solamente	MI solamente	NMI-mt y NMI-wt	MI y NMI-wt	MI y NMI-mt
DLX5	ADCYAP1	BARHL2	TBX3	CNTNAP1	EVX1	HOXA5
DLX6	ATOH1	BCL11B		EBF2	GATA2	
FOXD2	BHLHB5			FOXA1	HOXB5	
GAD1	C20orf103			FOXD3	MSC	
HLX1	CACNA2D4			HHEX	NKX2-8	
HOXA7	CBLN1			HOXC4	SIM2	
HOXA9	CBLN4			HOXD3	VAX2	
IRX3	CDKN2A			MAFB		
MAB21L1	COL12A1			ONECUT2		
MEIS1	COL27A1			OSR1		
MSX1	CYP26B1			PCDH17		
MSX2	DMRT3			PCDH7		
NR2F2	DPP10			PITX2		
NXPH1	ELAVL2			SIM1		
OTX1	EMX1			SIX1		
PAX9	EN1			SOX7		
PITX1	FBN2			UNG2		
PRKCZ	FEZF1			ZIC1		
SHH	FLJ46347			ZNF503		
SIX3	FOXA2					
SOX21	FOXB1					
TFAP2A	FOXF1					
	FOXG1B					
	GATA4					
	GNAS					
	GRID1					

ES 2 721 424 T3

Todos	NMI-wt solamente	NMI-mt solamente	MI solamente	NMI-mt NMI-wt	y	MI y NMI-wt	MI y NMI-mt
	GZF1						
	HAND2						
	HEY2						
	HMX2						
	HOXA11						
	IRX1						
	IRX5						
	ISL2						
	ISLR2						
	KCNK9						
	LBX1						
	LBXCOR1						
	LHX4						
	LHX9						
	LMX1A						
	LRAT						
	MAP1D						
	NFIX						
	NKX2-2						
	NKX2-3						
	NKX6-1						
	NPAS3						
	NR2E1						
	NR3C2						
	NR4A3						
	NRN1						

ES 2 721 424 T3

Todos	NMI-wt solamente	NMI-mt solamente	MI solamente	NMI-mt NMI-wt	y	MI y NMI-wt	MI y NMI-mt
	OLIG2						
	ONECUT1						
	OTX2						
	PAX5						
	PAX6						
	PCDH1						
	PCDH10						
	PHLDB1						
	PTGER3						
	SEMA6A						
	SFMBT2						
	SIX2						
	SIX6						
	SLC32A1						
	SNRPF						
	SORCS3						
	SOX17						
	SOX9						
	T						
	TBX15						
	TBX20						
	TBX5						
	TFAP2B						
	TRIM2						
	TRIM36						
	TWIST1						

ES 2 721 424 T3

Todos	NMI-wt solamente	NMI-mt solamente	MI solamente	NMI-mt y NMI-wt	MI y NMI-wt	MI y NMI-mt
	VIPR2					
	VSX1					
	ZIC4					

TABLA 9. Islas CpG (CGI) metiladas en la sangre pero no en el cáncer de vejiga. Se provee para cada uno: Número de identificación; Coordenadas de regiones seleccionadas que contienen islas CpG relevantes con base en el genoma completo de Homo sapiens según lo proporciona UCSC (hg18, marzo de 2006); Nombre del Gen; Ubicación de la sonda utilizada; el Cambio de multiplicidad; y la secuencia de los CGI.

5

No	CGI	Nombre del Gen	Ubicación de la sonda CGI	FC
1	chr19:53930240-53930625	RASIP1	chr19:053930330-053930374	2.66
2	chr7:72883371-72883981	CLDN4	chr7:072883457-072883501	2.64
3	chr22:26522794-26528592	MN1	chr22:026525238-026525282	2.21
4	chr7:5614184-5614510	FSCN1	chr7:005614143-005614190	2.15
5	chr16:66239477-66241425	RLTPR	chr16:066241103-066241147	1.93
6	chr5:551112-551430	SLC9A3	chr5:000551380-000551424	1.86
7	chr19:6426223-6426998	DENND1C	chr19:006427051-006427102	1.82
8	chr3:32836146-32836433	TRIM71	chr3:032836466-032836511	1.78
9	chrX:129301145-129301626	SLC25A14	chrX:129301313-129301357	1.76
10	chr9:124027565-124030907	LHX6	chr9:124029663-124029718	1.74
11	chr10:129424401-129427356	FLJ46831	chr10:129426989-129427033	1.71
12	chr1:3147370-3148160	PRDM16	chr1:003147944-003147988	1.65
13	chrX:128941527-128945710	BCORL1	chrX:128944842-128944886	1.64
14	chr17:7584523-7585036	DNAH2	chr17:007584859-007584908	1.63
15	chr1:27548507-27550603	SYTL1	chr1:027550188-027550232	1.6
16	chr19:10304689-10307022	ICAM3	chr19:010306004-010306051	1.56
17	chrX:129132628-129134108	AIFM1-RAB33A	chrX:129133196-129133244	1.55
18	chr21:45648960-45650662	COL18A1	chr21:045663489-045663539	1.53
19	chr10:134864694-134865392	KNDC1	chr10:134865054-134865098	1.48

ES 2 721 424 T3

No	CGI	Nombre del Gen	Ubicación de la sonda CGI	FC
20	chr9:129556229-129557670	SH2D3C	chr9:129556146-129556190	1.48
21	chrX:47305347-47306043	ARAF	chrX:047305953-047305997	1.45

Tabla 10. Genes hipermetilados y CGI en cáncer de vejiga.

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
MEIS1	chr2:66525936-66527140	4.76
NR2F2	chr15:94688798-94689034	2.93
SOX21	chr13:94152191-94153185	2.8
MAB21L1	chr13:34950554-34951119	2.68
OTX1	chr2:63134539-63134851	2.67
MGC2752	chr19:63784504-63785085	2.64
IRX3	chr16:52873104-52882105	2.63
PAX9	chr14:36205265-36206099	2.62
FOXC1	chr6:1549606-1560865	2.5
DLX5	chr7:96488158-96489487, chr7:96489900-96490182	2.45
NR4A2	chr2:156892636-156892878, chr2:156893804-156894601	2.45
CNTNAP1	chr17:38089258-38089793	2.35
FOXF2	chr6:1338049-1339169	2.35
HHEX	chr10:94441310-94441717	2.33
PRKCZ	chr1:2072175-2072389, chr1:2106293-2106661	2.31
HOXA7	chr7:27164708-27165039	2.27
MSX2	chr5:174091287-174092335	2.26
SLC45A4	chr8:142288380-142288627	2.22
FLJ44006-BCL2L11	chr2:111591678-111597436	2.21
MAP2K2	chr19:4059920-4060207	2.2

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
SHH	chr7:155288454-155292175	2.19
chr13:	chr13:49605587-49606020	2.19
MAD1L1	chr7:2082894-2083307	2.18
hsa-mir-196a-1	chr17:44074360-44075233	2.17
NXPH1	chr7:8449658-8450236	2.17
chr18:	chr18:5186244-5187389	2.12
C10ORF114	chr10:21828640-21829594	2.1
SIX3	chr2:45014932-45016562, chr2:45013398-45013616	2.08
TFAP2A	chr6:10530308-10530634, chr6:10498025-10498551	2.08
ISL2	chr15:74414579-74414893, chr15:74419318-74422570	2.05
VAX2	chr2:70984709-70985764	2.04
AMZ1	chr7:2724531-2724783	2.01
CYB561	chr17:58865386-58865618	1.99
HOXD3	chr2:176737660-176738187	1.97
SIM1	chr6:101003802-101004342, chr6:101002495-101002783	1.95
EFNB2	chr13:105943410-105943788	1.91
GAD1	chr2:171384799-171385226	1.91
MSX1	chr4:4915358-4915735, chr4:4910534-4911092	1.9
FOXA1	chr14:37137198-37138958	1.88
HDGFL1	chr6:22677564-22678684	1.85
chr13:	chr13:49595986-49600287	1.84
chr16:	chr16:87372445-87372706	1.84
EVX1	chr7:27251165-27252762	1.83
UNG2 (CCNO)	chr5:54554812-54555385	1.83
ONECUT2	chr18:53254153-53259851	1.81

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
HSF2BP	chr21:43902100-43904249	1.8
chr1:	chr1:119350668-119352843	1.8
FOXD3	chr1:63554983-63563059	1.79
FOXA2	chr20:22514822-22515055, chr20:22510737-22514104, chr20:22505518-22507240	1.77
GRIK2	chr6:101953488-101953856	1.77
chr2:	chr2:45249374-45251690	1.77
SIX1	chr14:60178708-60179539	1.76
HOXA9	chr7:27170441-27172987	1.75
FOXD2	chr1:47671713-47671985, chr1:47682300-47683607, chr1:47672249-47672972	1.73
NKX2-8	chr14:36122886-36123441	1.72
ZNF274	chr19:63420090-63420541	1.72
TAF4	chr20:60061693-60062033	1.71
SIX2	chr2:45085286-45086054	1.7
chr8:	chr8:145909302-145910517	1.7
PCDH7	chr4:30330303-30333940	1.69
PITX2	chr4:111774415-111774953	1.68
TCF7L1	chr2:85213468-85216104	1.68
chr6:	chr6:10492952-10493478	1.68
SOX7	chr8:10624024-10624296	1.66
HOXC4	chr12:52726910-52727810	1.65
PITX1	chr5:134390992-134393045	1.65
PCDHGA12	chr5:140790679-140792801	1.64
chr6:	chr6:170422815-170423038	1.64
EPN1	chr19:60907042-60907388	1.63
DLX6	chr7:96469320-96469736	1.62

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
hsa-mir-10b	chr2:176723195-176723460, chr2:176720618-176720921	1.62
SIM2	chr21:36990064-36995761	1.61
CACNA2D4	chr12:1844001-1845219	1.6
HOXA5	chr7:27149139-27152087	1.6
NCK2	chr2:105864220-105865009	1.6
OSR1	chr2:19424445-19425131	1.58
C17orf27 (RNF213)	chr17:75936057-75936582	1.57
chr6:	chr6:169051743-169052507	1.56
EVX2	chr2:176652334-176656692	1.53
ZNF503	chr10:76825135-76839606	1.52
chr5:	chr5:92931996-92934631	1.52
KIAA1303	chr17:76404186-76404427, chr17:76390187-76390410	1.48

Tabla 11. Distribución genómica de las sondas metiladas en el cáncer de vejiga.

Ubicación de la sonda	% en la matriz	% en cáncer de vejiga
Promotor divergente	2.5	2.4
corriente abajo	3.9	4.0
Interior	52.4	52.3
promotor	26.0	25.9
intergénico	15.3	15.3

Tabla 12A. Visión general de los CGI metilados diferencialmente entre el tumor y la orina de control.

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
HOXA9	chr7:27170441-27172987	16.53
PENK	chr8:57520681-57521969	14.69

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
PCDH7	chr4:30330303-30333940	12.00
KCNA1	chr12:4888847-4891432	11.89
HLX1	chr1:219134071-219134808	10.46
POU4F2	chr4:147778656-147781351, chr4:147777682-147778033	10.17
LHX4	chr1:178464743-178471598	9.79
FOXD2	chr1:47682300-47683607, chr1:47672249-47672972	9.67
LBX1	chr10:102986025-102986636	9.44
chr11:115956893-115956940	chr11:115955870-115957122	9.03
LMX1A	chr1:163590111-163590435	8.86
BHLHB5	chr8:65662303-65662699, chr8:65661156-65661382	8.61
OTX1	chr2:63134539-63134851	8.22
GAD2	chr10:26544390-26547440	8.02
EVX2	chr2:176652334-176656692	8.02
FLJ44006-BCL2L11	chr2:111591678-111597436	7.89
ONECUT2	chr18:53254153-53259851	7.75
ZIC1	chr3:148619591-148620015	7.33
FOXA1	chr14:37137198-37138958	7.24
DSC3	chr18:26875488-26877115	7.19
SIM2	chr21:36990064-36995761	6.78
MEIS1	chr2:66525936-66527140	6.74
FEZF1	chr7:121727243-121727884	6.62
ZNF503	chr10:76825135-76839606	6.57
SLC35F3	chr1:232106922-232108080	6.34
FEZF2	chr3:62331811-62332352	6.26

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
NR4A2	chr2:156893804-156894601	6.20
EN1	chr2:119329502-119332035	5.59
PCDH10	chr4:134291113-134293078	5.53
OSR1	chr2:19424445-19425131	5.23
ZIC4	chr3:148591199-148594390	5.00
CBLN1	chr16:47868915-47869809	4.92
HMX2	chr10:124891898-124892607	4.89
FOXB1	chr15:58083428-58085812, chr15:58079172-58079459	4.76
chr19:057648585-057648629	chr19:57648469-57649057	4.58
DPP10	chr2:115635208-115637235	4.55
chr7:032768257-032768301	chr7:32768010-32768497	4.48
C10orf114	chr10:21828640-21829594	4.44
FOXD3	chr1:63554983-63563059	4.39
chr5:092933638-092933682	chr5:92931996-92934631	4.25
TCF7L1	chr2:85213468-85216104	4.21
VAX2	chr2:70984709-70985764	3.99
CBLN2	chr18:68359955-68362770	3.97
PCDHGA12	chr5:140790679-140792801	3.94
chr21:037857850-037857894	chr21:37857725-37858416	3.89
HOXA7	chr7:27164708-27165039	3.79
GRIK2	chr6:101953488-101953856	3.77
NKX2-8	chr14:36122886-36123441	3.65
SOX9	chr17:67627870-67631593	3.64

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
chr18:005186349-005186393	chr18:5186244-5187389	3.50
SOX21	chr13:94152191-94153185	3.43
SNRPF	chr12:94776152-94776377	3.39
MSC	chr8:72916429-72917309	3.18
PITX1	chr5:134390992-134393045	3.05
SOX7	chr8:10624024-10624296	2.99
chr2:042182832-042182879	chr2:42182944-42183157	2.97
TBX15	chr1:119333515-119333719	2.96
SIM1	chr6:101003802-101004342	2.91
PFKFB1-APEX2	chrX:55043085-55043710	2.89
GATA2	chr3:129688183-129694961	2.86
chr5:122462228-122462286	chr5:122461778-122463450	2.82
GPR103	chr4:122521018-122521740	2.81
SIX2	chr2:45085286-45086054	2.80
SFMBT2	chr10:7489383-7495345	2.79
NXPH1	chr7:8449658-8450236	2.73
CA10	chr17:47590175-47591465	2.71
CNTNAP5	chr2:124498723-124499725	2.66
ZNF274	chr19:63420090-63420541	2.62
HOXD3	chr2:176737660-176738187	2.61
PITX2	chr4:111774415-111774953	2.55
OLIG2	chr21:33316999-33322115	2.54
FOXA2	chr20:22505518-22507240, chr20:22510737-22514104	2.53
DBC1	chr9:121170908-121172035	2.49

ES 2 721 424 T3

Símbolo	CGI	Cambio de multiplicidad
PAX2	chr10:102497473-102499636	2.45
MAB21L1	chr13:34950554-34951119	2.35
CYP26B1	chr2:72224630-72228512	2.31
CBLN4	chr20:54012011-54014085	2.26
GAD1	chr2:171384799-171385226	2.25
HHEX	chr10:94441310-94441717	2.22
chr9:013268499-013268548	chr9:13268313-13269805	2.20
FOXF2	chr6:1338049-1339169	2.17
DLX5	chr7:96489900-96490182	2.08
TBX3	chr12:113589232-113589931	2.04
MEIS2	chr15:35174679-35174906	2.04
PTGER3	chr1:71284813-71286392	2.04

Tabla 12B. Visión general de los CGI asociados con la progresión de NMI-BC.

Símbolo	CGI	FC
GPR103	chr4:122520930-122520974	1.81
chr2:042182832-042182879	chr2:042182832-042182879	1.96
KCNA1	chr12:004890074-004890118	2.01
HLX1	chr1:219134113-219134157	2.14
DBC1	chr9:121171898-121171944	2.59
GPR103	chr4:122521031-122521075	4.17
TBX3	chr12:113609259-113609303	2.76
GATA2	chr3:129693434-129693486	2.20
TBX2	chr17:056833879-056833928	2.15
TBX2	chr17:056835246-056835290	2.10
ZNF577	chr19:057082979-057083023	2.08

Símbolo	CGI	FC
MSC	chr8:072916695-072916739	1.82

## Ejemplos

## Ejemplo 1

5 Las hipermetilaciones de la isla CpG como se indica en las Tablas 1-5 son el resultado de estudios comparativos que utilizan muestras de pacientes bien caracterizadas. Se analizaron tanto las muestras tumorales como los controles. El ADN se extrajo directamente del tumor y del tejido de control. Las muestras de ADN se analizaron utilizando una micromatriz de isla CpG que comprende 200.000 islas CpG (Agilent Technologies Inc.). Los resultados obtenidos se indican en las distintas Tablas 1-5 que se enumeran en este documento.

10 The CpG island hypermethylations as indicated in the Tables 1-5 are the result of comparative studies using well characterized patient samples. Both tumor samples and controls were analyzed. The DNA was extracted directly from the tumor and control tissue. DNA samples were analyzed using a CpG island microarray comprising 200.000 CpG islands (Agilent Technologies Inc.). The results obtained are indicated in the various Tables 1-5 as listed herein.

## Ejemplo 2

## Materiales y métodos

15 Muestras de pacientes, declaración de ética y aislamiento de ADN.

Se recolectaron muestras de 44 tejidos de cáncer de vejiga congelados frescos, que representan 29 tumores invasivos no musculares (19 con mutación FGFR3 (NMI-mt) y 10 sin (NMI-wt) y 15 tumores invasivos de músculo (MI). El tejido tumoral de los pacientes se obtuvo del Departamento de Urología de Erasmus MC, Rotterdam. El comité de ética médica del Erasmus MC Rotterdam aprobó el proyecto. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. Para la validación, se recolectaron 90 muestras de cáncer de vejiga fijadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE) (27 Ta NMI-mt, 13 Ta NMI-wt, 10 T1-mt, 14 T1-wt, 26 MI) del Departamento de Patología. El uso de estas muestras se realizó de acuerdo con las normas presentadas en "El Código para el Uso Secundario Apropriado de Tejidos Humanos en los Países Bajos" (<http://www.federa.org>). Las muestras de tumores se incluyeron solo si al menos el 80% de la muestra consistía en células cancerosas, como se verificó mediante tinción con H&E. El ADN del tejido tumoral se aisló con el kit DNeasy Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó ADN genómico de sangre humana normal comercialmente disponible (Promega, Madison, WI, EE. UU.) como referencia en el análisis amplio del genoma y el GGMA. El ADN aislado de células presentes en la orina normal de cuatro personas sanas de más de 50 años de edad se utilizó como referencia en el ensayo de validación GGMA.

30 Hibridación de metilación diferencial (DMH) y análisis de datos

Los amplicones de ADN se prepararon para la hibridación de acuerdo con el protocolo de DMH (hibridación de metilación diferencial) descrito por Yan et al [Yan et al. 2002.] *Methods Mol Biol* 200: 87-100]. En resumen, se digirieron 0.5 µg de ADN genómico con la enzima de restricción Msel de cuatro bases (T<sup>A</sup>TAA), que restringió el ADN genómico en fragmentos de menos de 250 pb de longitud, mientras que las CGI ricas en GC estaban relativamente intactas. Subsecuentemente, los extremos pegajosos de los fragmentos se ligaron a cebadores enlazadores. Las muestras fueron luego digeridas con las enzimas de restricción HpaII y BstUI sensibles a la metilación para aumentar la cobertura del genoma y asegurar la digestión completa. Las muestras de referencia se trataron de la misma manera para generar amplicones. Las reacciones de PCR (20 ciclos) se realizaron utilizando el ADN purificado y digerido, ligado al enlazador, como plantilla para generar los amplicones diana finales, seguido de acoplamiento a los colorantes fluorescentes (Cy3 en caso de ADN de referencia genómico humano y Cy5 en caso de muestras tumorales) antes de hibridar a la micromatriz de la isla Agilent 244K CpG. Los amplicones agrupados se hibridaron conjuntamente en la matriz. Usando este enfoque, los fragmentos de ADN genómico que contienen sitios CpG no metilados en una muestra (por ejemplo, el ADN de referencia genómico humano) se degradaron por digestión de restricción y no se amplificaron. Sin embargo, los fragmentos de ADN correspondientes en la otra muestra (el tumor de vejiga) que contienen sitios de restricción metilados se protegieron de la digestión y subsecuentemente se amplificaron mediante PCR. Las secuencias metiladas diferencialmente se identificaron comparando las señales de hibridación entre los amplicones de tumores marcados con fluorescencia (Cy5) y de referencia (Cy3).

50 Todos los datos de micromatrices generadas cumplen con las normas actuales de MIAME de acuerdo con Brazma et al [Brazma 2009. *Scientific World J* 9: 420; Brazma et al. 2001. *Nat Genet* 29: 365]. La normalización, el preprocesamiento de datos sin procesar y el análisis estadístico se realizaron utilizando paquetes de Bioconductor en un entorno de programación R (<http://www.r-project.org/>). Las señales de hibridación sin procesar se normalizaron aplicando el método de normalización global "lowess" dentro de la matriz [Yang et al. 2002. *Nucleic Acids Res* 30:

e15], que asume que la mayor parte de las sondas en la matriz no se expresan diferencialmente. La normalización también incluye una etapa paso de preprocesamiento, como resultado de lo cual las intensidades normalizadas se transformaron con  $\log_2$ . Las intensidades transformadas con  $\log_2$  se sometieron luego a pruebas estadísticas adicionales para determinar cuales loci fueron metilados de manera diferente. Se aplicó el modelo lineal "limma" [Smyth 2004. Stat Appl Genet Mol Biol 3: Article3]. Se realizaron las siguientes comparaciones: todos los tumores versus sangre, NMI-mt versus NMI-wt, NMI-mt versus MI y NMI-wt versus MI, para encontrar genes que tengan diferentes perfiles de metilación en los grupos comparados. Estas comparaciones son análogas a un análisis clásico de prueba t de dos muestras.

El umbral de valor p se calculó utilizando el método de Benjamini y Hochberg [Benjamini et al. 2001. Behav Brain Res 125: 279]. Los loci correspondientes a valores p inferiores a 0.05 y un cambio de multiplicidad logarítmico de más de 0.5 o menos de -0.5 con más de 2 sondas que representan el mismo CGI se clasificaron como diferencialmente metilados. Dejamos las sondas del cromosoma Y fuera de los análisis subsecuentes.

Ensayo de metilación Golden Gate personalizado de Illumina y análisis estadístico.

Se diseñó un ensayo de metilación Golden Gate personalizado que interrogaba sondas que contenían 384 CpG que representan 238 CGI, 184 genes y 46 regiones intergénicas. La selección de las sondas se basó en los loci metilados de manera diferencial en el análisis amplio del genoma. Se incluyeron las sondas para detectar la metilación en todos los subgrupos de vejiga, pero también las sondas que parecían ser específicas para un cierto subgrupo en comparación con otras, y algunas sondas específicas para la progresión o muerte de la enfermedad. El ensayo de metilación es una adaptación del ensayo de genotipado de SNP de alto rendimiento de Illumina descrito por Fan et al. [Fan et al. 2003. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 68: 69]. En resumen, las citoquinas no metiladas (C) se convirtieron en uracilo (U) mediante tratamiento con bisulfito. La modificación con bisulfito de sodio del ADN genómico se llevó a cabo utilizando el kit EZ DNA Methylation Gold (Zymo Research Corp, Orange, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante, utilizando 0.8  $\mu\text{g}$  de ADN de FFPE. La eficiencia de conversión se monitorizó mediante PCR con cebadores específicos para BS universales proporcionados con el kit. Las matrices se ejecutaron en Service XS, Leiden, Países Bajos, de acuerdo con el protocolo del fabricante y según lo descrito por Bibikova et al. [Bibikova et al. 2006. Genome Res 16: 383].

Los datos se analizaron con el software del módulo BeadStudio Methylation de Illumina. Todos los puntos de datos de la matriz se representaron mediante señales fluorescentes de los alelos tanto metilados (M) como no metilados (U). El valor promedio de metilación  $\beta$  se derivó de aproximadamente 30 mediciones de metilación repetidas para cada locus. El nivel de metilación fue dado por  $\beta = (\max(M, 0)) / (|U| + |M| + 100)$ . El valor  $\beta$  ( $0 \leq \beta \leq 1$ ) refleja el nivel de metilación de cada sitio CpG donde 1 representa completamente metilado y 0 representa sin metilar. En cada locus para cada muestra, el valor p de detección se definió como 1 - valor p calculado a partir del modelo de fondo que caracteriza la posibilidad de que la señal sea distinguible de los controles negativos. Usando esto como una métrica para el control de calidad para el rendimiento de la muestra, se retiraron 6 muestras de FFPE (6%) del análisis, ya sea porque tenían una intensidad de señal general muy baja o  $> 25\%$  de los loci fallaron. Las diferencias significativas se evaluaron comparando el valor  $\beta$  promedio por locus por grupo. Los loci significativos se seleccionaron sobre la base de una relación del valor  $\beta$  promedio mayor que 1.4 y una diferencia entre el valor  $\beta$  promedio ( $\Delta\beta$ ) mayor que 0.3.

Validación de la metilación de CGI individuales.

Se utilizó el método MS-SNAPSHOT descrito en [Gonzalvo y Liang 2007. Nat Protoc 2: 1931; Lurkin et al. 2010. PLoS One 5: e8802] para investigar cuantitativamente la metilación en el ADN de la orina. El método implica la conversión con bisulfito del ADN genómico y la subsecuente amplificación de la región genómica interesada. A esto le sigue la extensión del cebador de un solo nucleótido específico de metilación con sondas específicas de CpG y, finalmente, los fragmentos se visualizan en un secuenciador ABI. Para probar el método, se investigó la metilación del gen MEIS1 utilizando muestras de orina normales del paciente junto con líneas celulares de cáncer de vejiga. Se usó ADN metilado in vitro como control positivo. En la Tabla 6 se proporciona una lista de los cebadores y sondas utilizados.

Resultados

Un perfil de metilación amplio del genoma para el cáncer de vejiga.

Para investigar la metilación global del ADN en los cánceres de vejiga, se analizaron 44 tumores de vejiga en micromatrices de islas CpG humanas Agilent 244K utilizando hibridación de metilación diferencial. Se encontró que 729 sondas diferentes eran significativamente más metiladas en los tumores de vejiga en comparación con la sangre, con un cambio de multiplicidad logarítmico superior a 0.5 y un valor de  $p < 0.05$ . Para seleccionar los CGI más hipermetilados, se utilizaron como criterio adicional que 3 o más dinucleótidos CpG deberían estar altamente metilados en un CGI específico. Esta selección generó una lista de 82 CGI que representan 71 genes y 11 CGI no asociados directamente con un gen de acuerdo con el archivo de información de Agilent. Estos se muestran en la Tabla 10. El gen que mostró el grado más alto de metilación fue MEIS1 con un cambio de multiplicidad logarítmico de 4.8 para la sonda más altamente metilada y un cambio de multiplicidad logarítmico promedio de 2.2 a través de las 10 sondas que estaban presentes en la matriz para este CGI (Figura 1). Se observa que para la mayoría de los CGI

significativamente metilados, los dinucleótidos CpG adyacentes dentro de un CGI se cometilaron. En contraste, las CGI vecinas a una isla metilada usualmente no estaban metiladas.

La metilación de CGI intrónicos se asocia con una expresión génica reducida

5 La matriz de 244k contiene sondas para CGI como se despliegan en el navegador del genoma UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/>, compilación 19). De los CGI representados en la matriz, el 26% está ubicado en regiones promotoras. Muchos estudios han demostrado que la metilación aberrante de las CGI en las regiones promotoras representa uno de los eventos epigenéticos más frecuentes asociados con el silenciamiento de genes en el cáncer. En nuestro análisis observamos que no había una preferencia específica por la metilación de las regiones promotoras. En cambio, la metilación se distribuyó proporcionalmente a través de CGI en regiones promotoras, dentro de genes y en regiones intergénicas (Tabla 11). Se muestran ejemplos para CGI en dos de los genes seleccionados, MEIS1 y NR4A2 (Figura 1). Para investigar si la metilación fuera de las regiones promotoras también reprimió la expresión génica, a continuación se comparan los genes con CGI metilados con los perfiles de expresión amplios del genoma disponibles del cáncer de vejiga mediante la base de datos de Oncomine [Blaveri et al. 2005. Clin Cancer Res 11: 4044; Dyrskjot et al. 2004. Cancer Res 64: 4040; Dyrskjot et al. 2003. Nat Genet 33: 90; Lindgren et al. 2006. Oncogene 25: 2685; Modlich et al. 2004. Clin Cancer Res 10: 3410; Sanchez-carbayo et al. 2006. J Clin Oncol 24: 778]. Esta información se puede obtener para 54 genes. De estos 54 genes, 22 mostraron metilación del promotor CGI y se observó una correlación positiva con baja expresión en 17 genes (77.3%). Los 32 genes restantes mostraron metilación de CGI dentro de los intrones. Curiosamente, 23 de estos genes también mostraron baja expresión (71.9%) en los cánceres de vejiga. Estos datos sugieren que no solo la metilación del promotor CGI, sino también la metilación de los CGI intrónicos conduce a una expresión génica reducida. Las gráficas de cuadro de perfil de expresión de MEIS1, NR4A2 y HOXA9 se muestran en la Figura 1.

El análisis de subgrupos individuales muestra que los tumores NMI-wt tienen un perfil altamente metilado

Para explorar si la metilación global del ADN puede identificar subgrupos de cáncer de vejiga, se realizó un análisis no supervisado por medio de un análisis de componentes principales (PCA) utilizando todas las sondas de la matriz (244K) (Figura 2A). Los primeros tres componentes del PCA explicaron el 42.4% de la variabilidad entre las muestras, lo que sugiere que existe una discriminación razonable entre los subgrupos. Este análisis no supervisado indica la presencia de dos agrupaciones de pacientes con cáncer de vejiga. Los tumores NMI-wt (en verde) se aglomeraron muy juntos y se separaron de los tumores NMI-mt (en azul) y MI (en rojo). Además, se observaron los subgrupos individuales de tumores de vejiga. Los tumores NMI-wt mostraron un número 2.7 a 4.6 veces mayor de sondas hipermetiladas en comparación con los grupos NMI-mt y MI (Figura 2B). En la Tabla 12 se proporciona una lista de genes metilados diferencialmente entre subgrupos.

A continuación, se agruparon los diferentes subgrupos de tumores de vejiga con base en todas las sondas que se metilaron de forma diferencial entre dos grupos con un valor de  $p < 0.05$ , independientemente del cambio de multiplicidad logarítmico. Para el agrupamiento de sondas que difieren entre los tumores NMI-MT y MI, se tuvo que usar un valor de  $p < 0.5$  porque no existen muchas diferencias entre estos dos grupos. Se empleó un algoritmo de agrupamiento jerárquico que elige la distancia Euclidiana y el enlace completo para organizar las tres comparaciones diferentes (Figura 3). Luego se realizó el análisis de componentes principales en los mismos datos. Las sondas junto con los nombres de los genes y los valores de  $p$  se listan en la Tabla 12. Estos análisis semisupervisados mostraron claramente que los diferentes subgrupos de cáncer de vejiga se pueden identificar con base en su patrón de metilación.

40 Los genes hipermetilados en el cáncer de vejiga frecuentemente son genes diana PcG

Las proteínas del grupo de peine múltiple (PcG) funcionan como represores de la transcripción de genes que han sido implicados en la autorrenovación y diferenciación de las células madre. Se ha demostrado que estos genes diana de PcG son particularmente propensos a la metilación del ADN en los cánceres [Ohm et al. 2007. Nat Genet 39: 237; Widschwendter et al. 2007. Nat Genet 39: 157; Schlesinger et al. 2007. Nat Genet 39: 232]. Se investigó si la hipermetilación del ADN en el cáncer de vejiga estaba más presente en los genes diana de PcG al hacer coincidir nuestra lista de 71 genes de la Tabla 10 con estudios recientes que muestran que entre el 8 y el 14% de todos los genes en el genoma están regulados por PcG [Bracken et al. 2006. Genes Dev 20: 1123; Lee et al. 2006. Cell 125: 301]. En particular, se encontró que el 63.3% de los genes hipermetilados en el cáncer de vejiga eran genes diana PcG, con un factor de representación de más de 3 (<http://elegans.uky.edu/MA/progs/representation.stats.html>) (Figura 4A). Esto fue aproximadamente el mismo para todos los diferentes subconjuntos de tumores. Veintidós genes regulados por PcG se metilaron en todos los tres subtipos, mientras que un sorprendente 81 genes fueron específicos para tumores NMI-wt (Figura 4B). En la Tabla 8 se proporciona una lista de los genes diana de PcG metilados en el cáncer de vejiga.

Genes metilados en la sangre en comparación con el cáncer de vejiga

55 También se observaron 21 CGI que estaban metilados en la sangre pero no en los tumores de la vejiga. Estos se listan en la Tabla 9. Comparando los resultados con un estudio basado en la inmunoprecipitación con ADN metilado (MeDIP), en el que se investigó el patrón de metilación amplio del genoma en sangre [Rakyan et al. 2008. Genome Res 18: 1518]. Se encontró una correlación del 90% con su estudio.

Validación de hipermetilación y marcadores para diagnóstico y progresión.

A continuación, se propuso validar los CGI significativos seleccionados en una plataforma de Illumina personalizada basada en la conversión con bisulfito del ADN tumoral. Los siguientes CGI se incluyeron en la matriz personalizada:

1) Metilación diferencial entre tumores y sangre (tablas 9 y 10);

5 2) Sondas que podrían ser de utilidad como biomarcadores para distinguir los subgrupos. Se encontraron 7 CGI que representan 6 genes que se diferencian entre los tumores NMI-mt y NMI-wt. En la comparación de MI versus NMI-wt, se encontró que 17 CGI que representan 13 genes son significativos. No se encontraron sondas significativas entre los subgrupos MI versus NMI-mt a un valor de  $p < 0.05$ . Por lo tanto, se decidió incluir sondas de 6 CGI que representan 6 genes con un valor de  $p < 0.5$ ;

10 3) CGI que se asociaron con la progresión y la supervivencia. En todos los casos, el CGI a validar tenía al menos 3 CpG que estaban altamente metilados.

Se empleó un algoritmo de agrupamiento jerárquico en los valores beta promedio por subgrupo, con las 384 sondas en la matriz que seleccionaron la distancia Euclidiana y el enlace completo. El análisis separó claramente los tumores de vejiga de la orina y la sangre normales (Figura 5A). Se pudo validar más del 70% de las sondas hipermetiladas en todos los tumores de vejiga. Por ejemplo, en el GGMA personalizado de 384 plex, hubo 205 sondas que fueron metiladas en el cáncer de vejiga pero no en la sangre con base en nuestros datos de la matriz de Agilent. De estos, 147 sondas también fueron metiladas en el cáncer de vejiga, pero no en la sangre en el GGMA. Estas sondas se muestran en el mapa de calor (Figura 5B). También incluimos ADN aislado de células uroteliales normales. El ochenta por ciento de las sondas validadas contra la sangre tampoco fueron metiladas en la orina. Para los diferentes subgrupos de tumores de vejiga, el número de sondas validadas varió entre el 65-75% de las sondas en comparación con la sangre y el 76-83% en comparación con la orina.

Los CGI que se metilan de forma diferencial entre los tumores y la orina de los controles de cáncer no de vejiga representan biomarcadores potenciales para las pruebas de orina (Tabla 12). Se validaron varios de estos utilizando una PCR específica de bisulfito seguida de un análisis de instantáneas para la CpG. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 5C. Se pudo detectar la metilación en el ADN de la orina de forma cuantitativa mediante este método. Investigamos la metilación del gen MEIS1 en dos sitios CpG utilizando diferentes sondas (MEIS1 A y B). El pico negro (citosina) representa metilación y el pico rojo (timina) representa no metilación. El ADN metilado in vitro (IM), la muestra de orina del paciente BC (PU) y las líneas celulares de cáncer de vejiga (RT112, T24, J82) mostraron una fuerte señal de metilación, mientras que la orina normal (NU) y el ADN sanguíneo (NB) no se metilaron.

A continuación, se analizaron los CGI que se incluyeron en el GGMA como posibles marcadores de progresión. Con este fin, se analizaron por separado y en varias combinaciones (Tabla 12B) los 6 mejores CGI que se metilaron en los no progresores versus los progresores y, de manera similar, 6 CGI que se metilaron en los progresores versus los no progresores. Las curvas de Kaplan-Meier representadas en la Figura 5D muestran que una combinación de CGI en los genes GPR103, DBC1 y GATA2 puede predecir significativamente la progresión ( $p = 0.001$ ). Curiosamente, la metilación de GPR103 y DBC1 CGI se correlacionó inversamente con la progresión y la metilación de GATA2 fue fuertemente indicativa de la progresión. El CGI asociado a DBC1 se superpone con el promotor de este gen, mientras que los CGI GATA2 y GPR103 están ubicados en intrones.

#### Discusión

40 Presentamos una investigación sobre la metilación aberrante del ADN asociada a cáncer de vejiga. Por lo que sabemos, este es el primer estudio que aborda la metilación amplia del genoma en el cáncer de vejiga. El objetivo principal de este trabajo fue la identificación y validación de los CGI metilados que podrían servir como biomarcadores para la detección temprana de tumores primarios y recurrentes, así como marcadores que predicen el curso de la enfermedad. La exploración amplia del genoma dio como resultado la selección de 177 CGI que diferían significativamente en la metilación en los tumores en comparación con la sangre. Aproximadamente el 70% de estos CGI podrían validarse en un ensayo GGMA personalizado. Este análisis también mostró que la mayoría de estos CGI no estaban metilados en el ADN derivado de la orina de los controles de cáncer no de vejiga emparejados por edad. Este grupo de CGI representa marcadores para ensayos basados en orina. La metilación de algunos de estos marcadores se confirmó en muestras de orina. Otro hallazgo importante es que una combinación de CGI de los genes GRP103, DBC1 y GATA2 es capaz de predecir la progresión a la enfermedad invasiva de los músculos. Se ha observado pérdida de heterocigosidad o supresiones homocigotas del gen DBC1 (también llamado DBCCR1) (eliminado en el cáncer de vejiga 1) en muchos tumores de vejiga, así como en la metilación del promotor. La metilación hasta ahora no se ha correlacionado con el curso de la enfermedad. En nuestro estudio, la metilación del promotor CGI del gen DBC1 se asoció con una disminución del riesgo de progresión. El papel del factor de transcripción GATA 2 en el cáncer es contradictorio. Se descubrió que la disminución de la expresión se correlacionaba con la proliferación en los progenitores de monocitos, mientras que la alta expresión parece situar los cánceres de próstata para un fenotipo más agresivo y se han encontrado mutaciones puntuales de ganancia de función en la leucemia mieloide crónica. En los tumores de vejiga, se ha observado una expresión más baja de esta proteína en MI versus NMI-BC,

que se relaciona con la metilación y la asociación positiva con la progresión. Sin embargo, el gen GPR103 (QRFPR) codifica un receptor acoplado a proteína G y, por lo tanto, la proteína participa en la transducción de señales, pero no se pueden encontrar datos adicionales sobre el gen o su producto en la literatura.

5 La mayoría de los genes descubiertos en el presente estudio nunca han demostrado ser metilados en el cáncer de vejiga o en otros tipos de cáncer. Algunos de los CGI metilados descritos anteriormente en el cáncer de vejiga que están asociados con los genes SOX9, CDKN2A, TERT, DAPK1, EDNRB y LAMB3 también se encontraron metilados en nuestro estudio, aunque solo SOX9 y CDKN2A llegaron a la lista de nuestros 177 CGI altamente metilados.

10 Para nuestra sorpresa, observamos que los NMI-BC con un gen FGFR3 de tipo silvestre tienen más CGI metilados y la intensidad de la metilación es más profunda que en los grupos NMI-BC y MI-BC mutantes de FGFR3. La diferencia en la metilación presenta evidencia adicional de que los dos subgrupos de NMI-BC se desarrollan a lo largo de diferentes vías de patogénesis. Los WT NMI-BC también tienen aberraciones cromosómicas más extendidas que los FGFR3 MT NMI-BCs. La metilación extensiva en WT NMI-BC recuerda el fenotipo metilador de isla CpG (CIMP) que caracteriza un subconjunto de cánceres colorrectales (CRC). CIMP en CRC también identifica un subconjunto de CRC, ya que está asociado con mutaciones BRAF, inestabilidad de microsatélites y se presenta con más frecuencia en mujeres de edad avanzada. No se ha realizado ningún estudio amplio del genoma a gran escala sobre la metilación del ADN para el CRC, sin embargo, el CIMP se ha estudiado utilizando una matriz de 1536-plex GGMA.

15 Al comparar los genes metilados en este estudio con los encontrados por nosotros, casi no hubo superposición. Esto confirma que la metilación CGI es específica del tipo de tejido y tumor.

20 En línea con los informes anteriores en tumores sólidos, una alta proporción de los genes que encontramos de novo metilados en el cáncer de vejiga son reprimidos por los complejos de peine múltiple (PcG) en células madre embrionarias. Los genes diana de PcG tienen hasta 12 veces más probabilidades de ser silenciados por la metilación del ADN en el cáncer que los genes diana que no son PcG. La asociación entre la metilación del ADN y la PcG se ha corroborado además por el hallazgo de interacciones entre DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y varias subunidades del complejo PcG, como EZH2 y BMI1. Otro estudio reciente mostró que el 49% de los genes metilados en el cáncer de colon son dianas de peine múltiple en células madre embrionarias, coincidiendo con otros informes que muestran que los genes propensos a la hipermetilación específica del tumor en el cáncer de colon tenían más probabilidades de estar marcados por la metilación H3K27 en tejidos normales que genes que carecen de metilación H3K27. Otro estudio informó que muchos genes hipermetilados en una línea celular de cáncer de próstata estaban unidos por PcG en células normales pero perdieron la unión de PcG al adquirir la metilación del ADN en el cáncer. En esta perspectiva, encontramos que el 60% de los genes hipermetilados en el cáncer de vejiga son dianas de PcG en células madre embrionarias. Estas alteraciones epigenéticas que ocurren en el desarrollo temprano específicamente en células madre o progenitoras pueden ser específicas del cáncer de vejiga y esto fortalece la comprensión adicional de la tumorigénesis de cáncer de vejiga. Además de encontrar 92 genes comúnmente regulados por PcG en subgrupos de cáncer de vejiga, se encuentra que un grupo de 336 genes regulados por complejos de PcG es específico de los tumores NMI-wt. Además de que un posible fenotipo CIMP es la causa de la metilación extensa en este grupo, otra posible explicación para este hallazgo podría ser que la célula a partir de la cual se originan los WT NMI-BC está más estrechamente relacionada con la célula madre embrionaria o de vejiga que las células fundadoras de los MT NMI y MI-BCs. En general, se cree que los genes específicos del linaje se activan durante las etapas de diferenciación subsecuentes y durante este proceso los complejos de PcG se reemplazarán por factores de transcripción específicos del destino celular. Por lo tanto, quedarán menos objetivos de metilación posibles después de cada etapa de diferenciación.

45 Nuestros datos muestran claramente que los loci adyacentes dentro de un determinado CGI se co-metilan, mientras que los CGI vecinos de un determinado gen pueden tener un nivel de metilación muy diferente. La asociación significativa entre los estados de metilación de los sitios CpG adyacentes y una alta frecuencia de co-metilación de corto alcance se informó anteriormente. Otro hallazgo interesante en este estudio es que nuestros datos no muestran preferencia por la metilación de los CGI en las regiones promotoras en comparación con los cuerpos de los genes, ya que la ubicación de los CGI significativos se distribuye sobre el genoma de acuerdo con la distribución de los CGI en la matriz. Los efectos de la metilación del promotor en la organización de la cromatina y la expresión génica han sido bien documentados en diversos tipos de cáncer. En nuestro estudio, además de la metilación del promotor, encontramos que más del 50% de todas las sondas significativas están ubicadas en los CGI ubicados dentro de los cuerpos de los genes. La influencia de esto en la expresión génica no se conoce completamente. Informes anteriores en Arabidopsis han demostrado que la metilación del cuerpo del gen era baja en los genes transcritos a niveles bajos, más alta en los genes altamente transcritos y ausente en los genes que no se transcribieron. Al comparar nuestros resultados de metilación con los estudios de expresión génica, se muestra que para el 70% de nuestros genes existe una correlación inversa con la expresión génica, lo que sugiere que la metilación intragénica también contribuye al silenciamiento génico.

60 En resumen, hemos identificado CGI hipermetilados en el cáncer de vejiga. La metilación del ADN aberrante en el cáncer de vejiga parece ser muy selectiva y podría ser la primera etapa en la iniciación del tumor, especialmente para los WMI NMI-BC. El estudio también ilustra un hallazgo biológico interesante: además de la metilación del promotor, la metilación intragénica se observa en la misma medida en el cáncer de vejiga y también parece influir en la expresión del gen. Muchos de los CGI metilados descubiertos representan biomarcadores putativos para la detección temprana

en ensayos basados en orina. La combinación de los CGI de los genes GRP103, DBC1 y GATA2 predice la progresión a una enfermedad invasiva del músculo. Por lo tanto, los CGI identificados en este estudio serán de gran interés para una investigación adicional de su relevancia clínica y funcional y proporcionarán información avanzada sobre la patogénesis del cáncer de vejiga.

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para diagnosticar cáncer de vejiga en un sujeto que comprende detectar en el ADN de dicho sujeto al menos una isla CpG hipermetilada en ONECUT-2 asociada con dicho cáncer, en donde una elevación en el nivel de metilación en dicha isla CpG de dicho sujeto, en relación con el nivel de metilación en dicha isla CpG de un sujeto de control sano, es indicativo de que dicha isla CpG está hipermetilada; en donde dicha isla CpG está indicada por chr18: 53254153-53259851 como se incluye en la Human Genome Assembly hg18 de marzo de 2006.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye además una etapa de detección de una mutación del gen FGFR3.
- 10 3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga no invasivo de músculo.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho ADN se obtiene a partir de una muestra de orina de dicho sujeto.
- 15 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método para diagnosticar cáncer de vejiga es un método para la detección de la recurrencia del cáncer de vejiga, o un método para la detección de cáncer de vejiga primario.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método comprende la detección de formas recurrentes de cáncer en el ADN aislado de la orina del paciente.
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método comprende la detección de formas primarias de cáncer en el ADN aislado de la orina del paciente.
- 20 8. Método para la detección de la recurrencia del cáncer de vejiga, que comprende detectar en el ADN de dicho sujeto al menos una isla CpG hipermetilada asociada con dicho cáncer, en donde una elevación en el nivel de metilación en dicha isla CpG de dicho sujeto, en relación con el nivel de metilación en dicha isla CpG de un sujeto de control sano, es indicativo de que dicha isla CpG está hipermetilada, en donde dicha isla CpG está en ONECUT-2; y en donde dicha isla CpG está indicada por chr18: 53254153-53259851 como se incluye en la Human Genome Assembly hg18 de marzo de 2006.
- 25 9. Método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método comprende la PCR específica para metilación (MSP) y/o en donde dicho método comprende la amplificación de sonda dependiente de la ligación multiplex (MLPA).
- 30 10. Uso de una composición de diagnóstico que comprende un ácido nucleico capaz de hibridar selectivamente bajo condiciones rigurosas a una isla CpG hipermetilada en ONECUT-2 en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

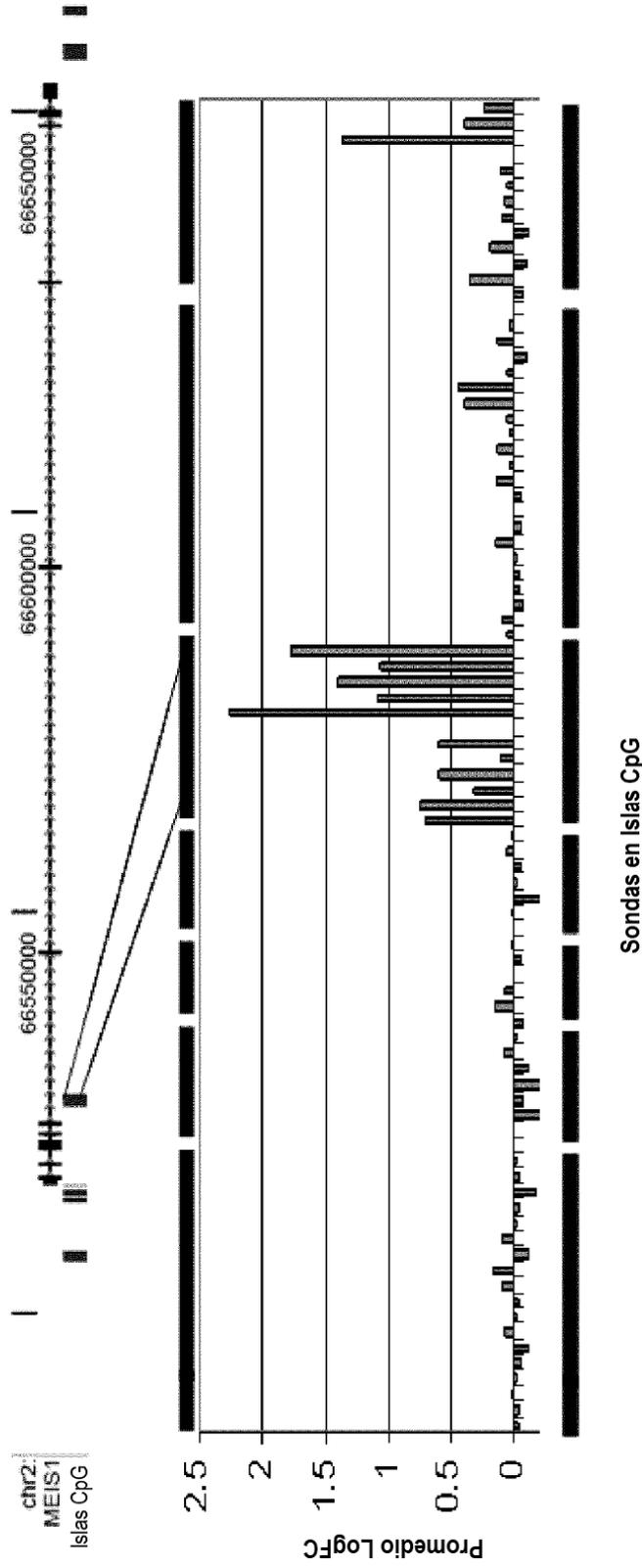


Fig. 1A

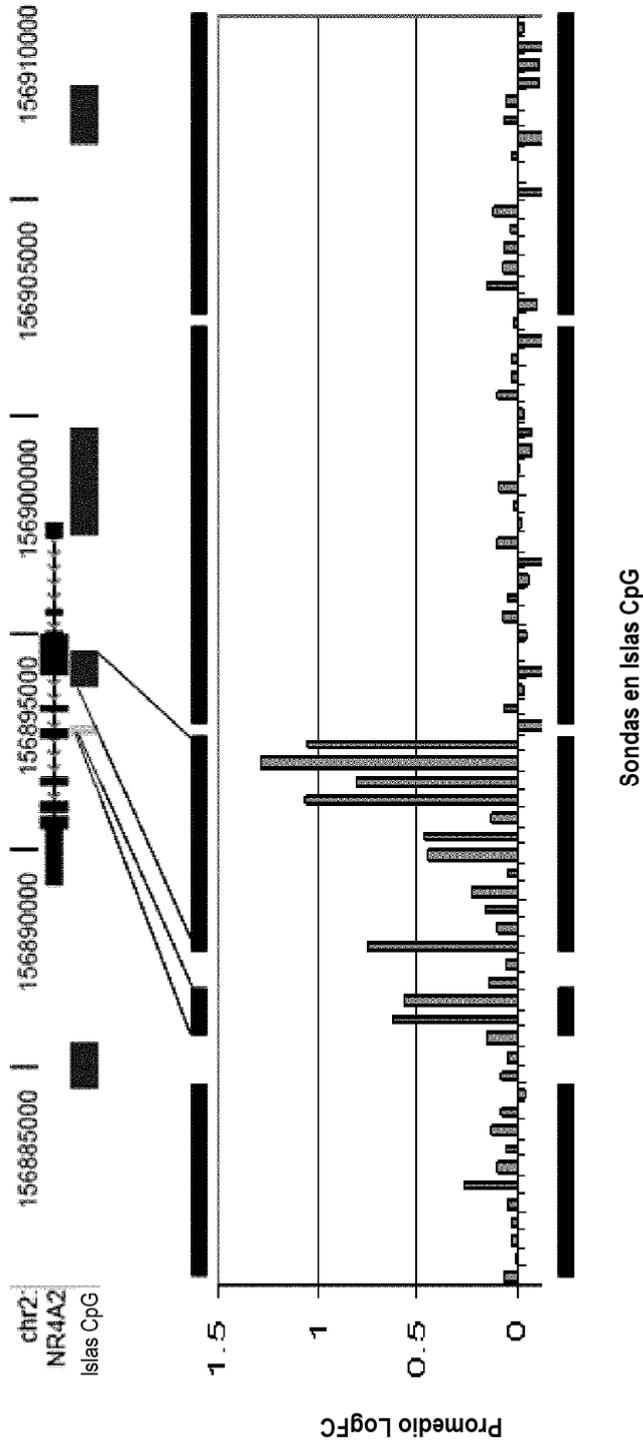


Fig. 1B

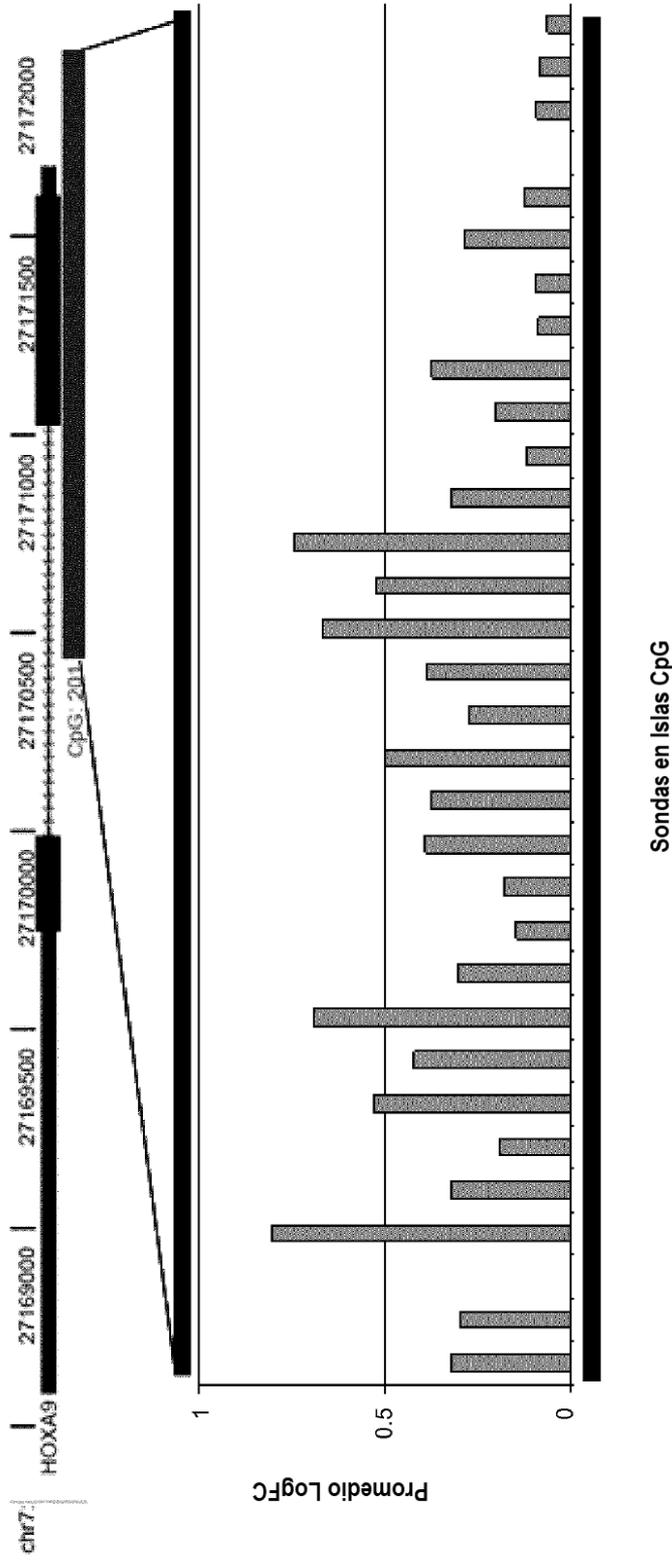


Fig. 1C

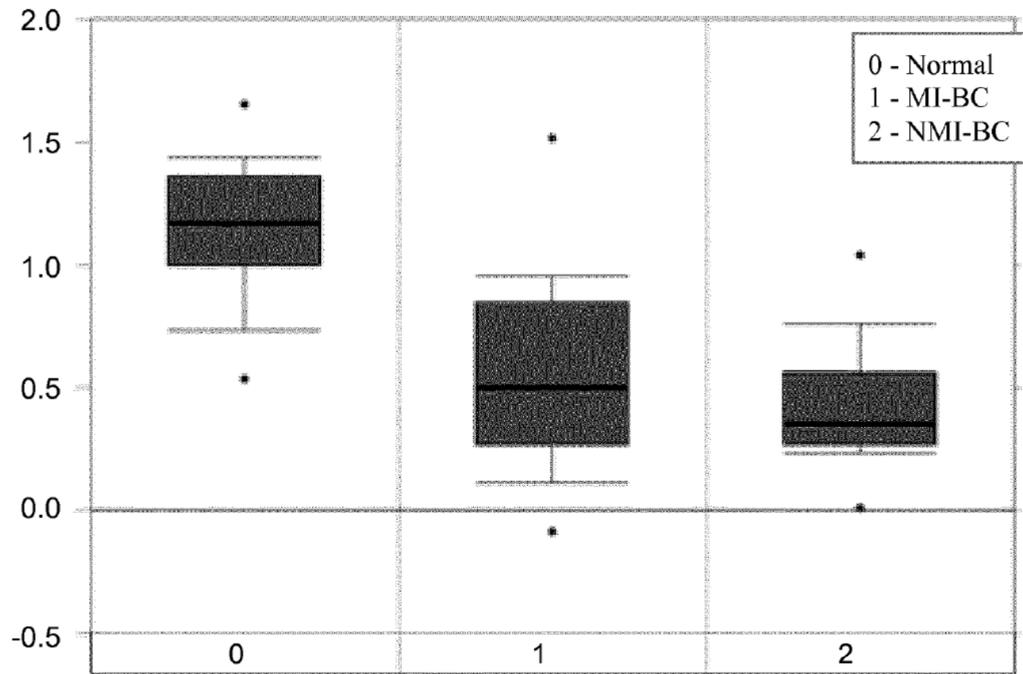


Fig. 1D

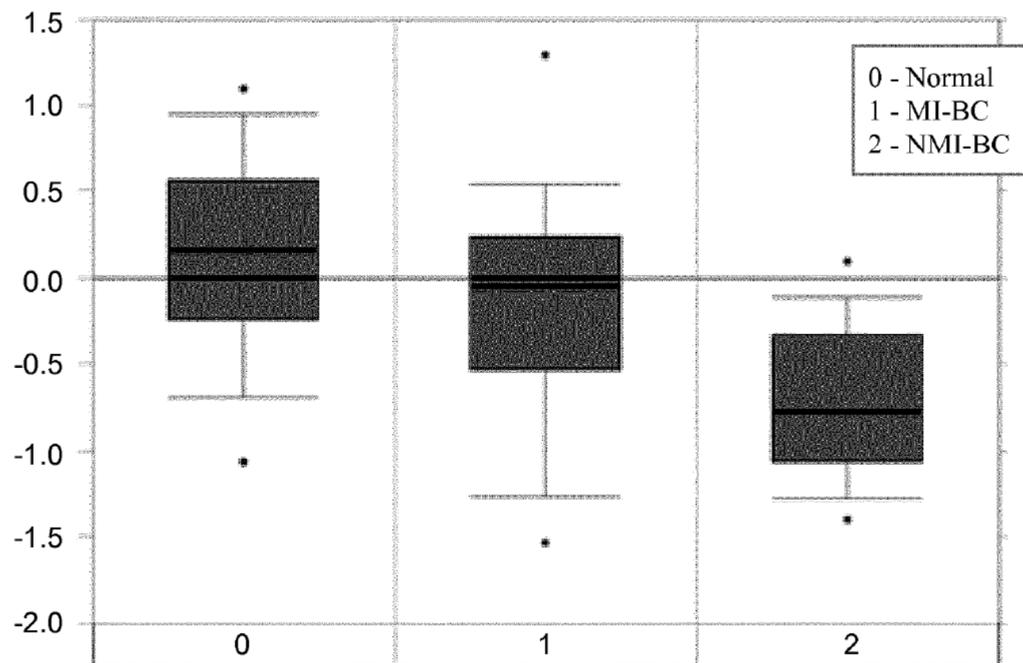


Fig. 1E

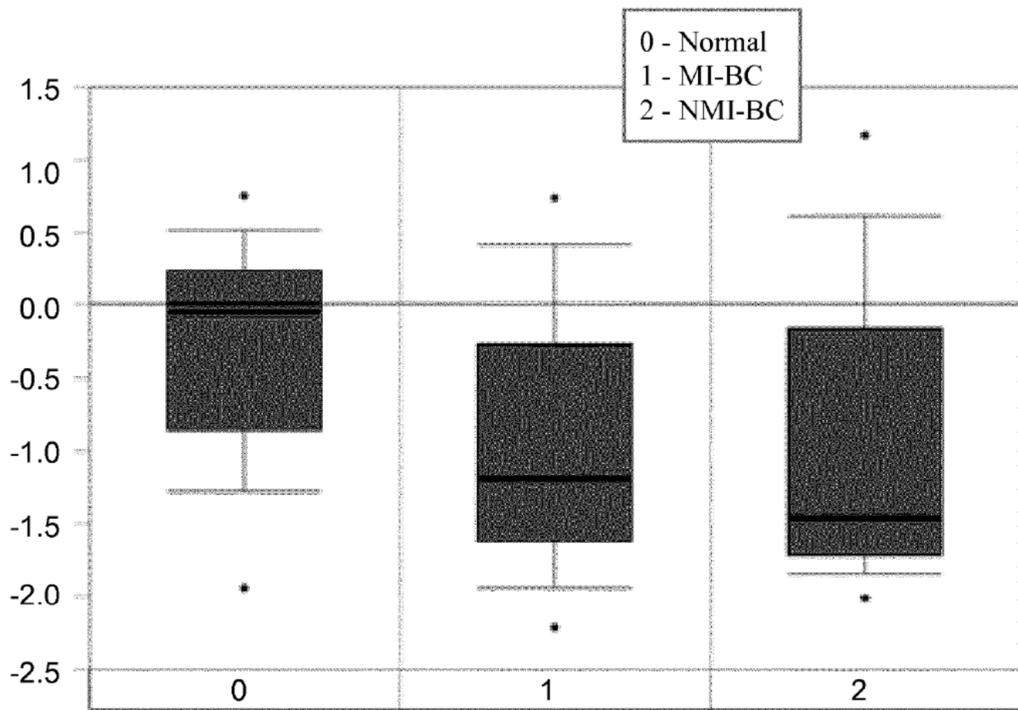


Fig. 1F

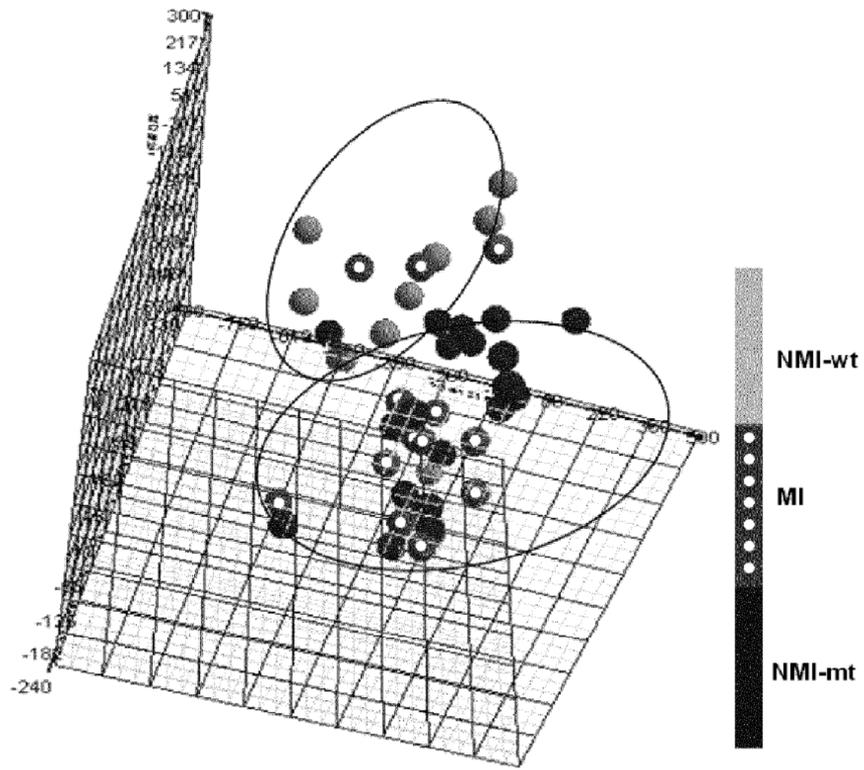


Fig. 2A

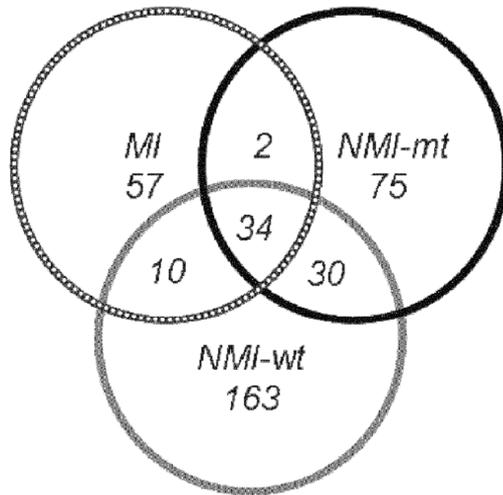


Fig. 2B

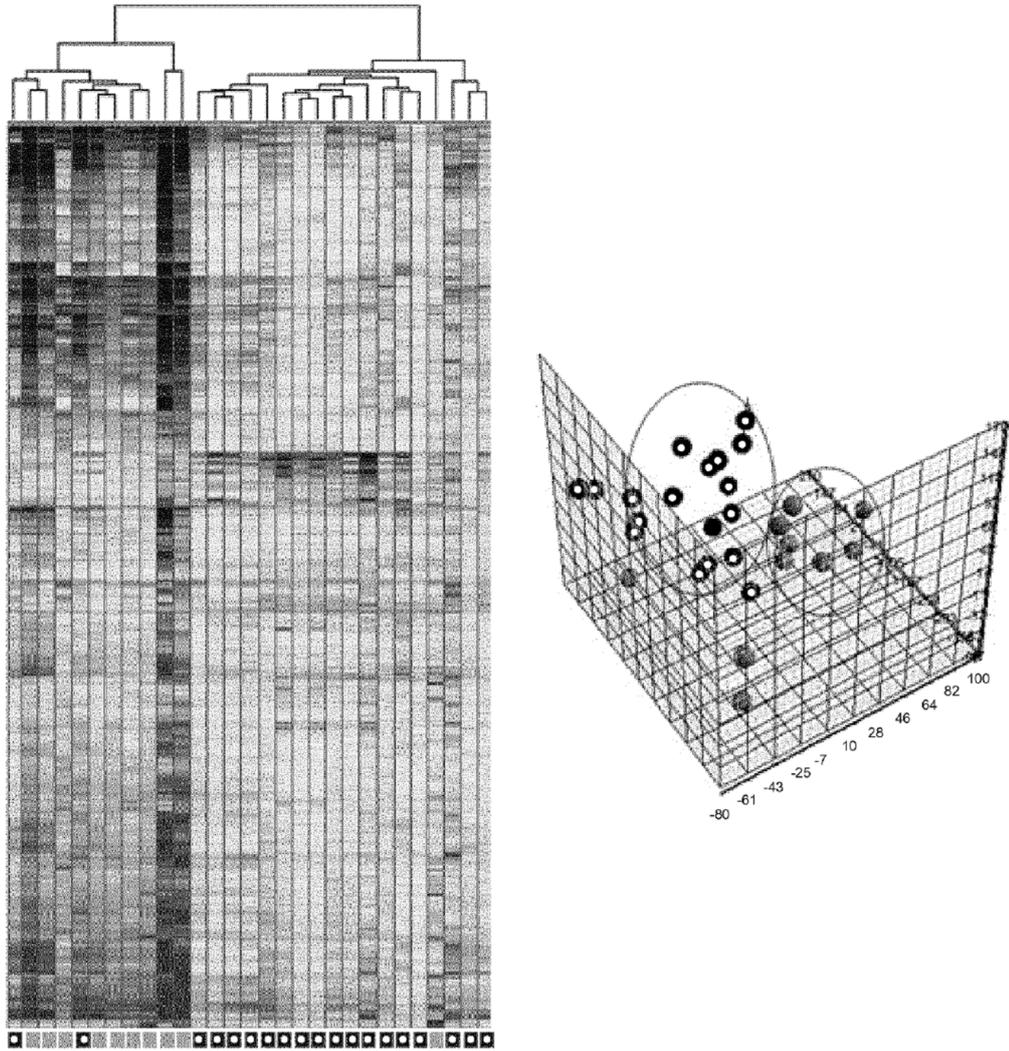


Fig. 3A

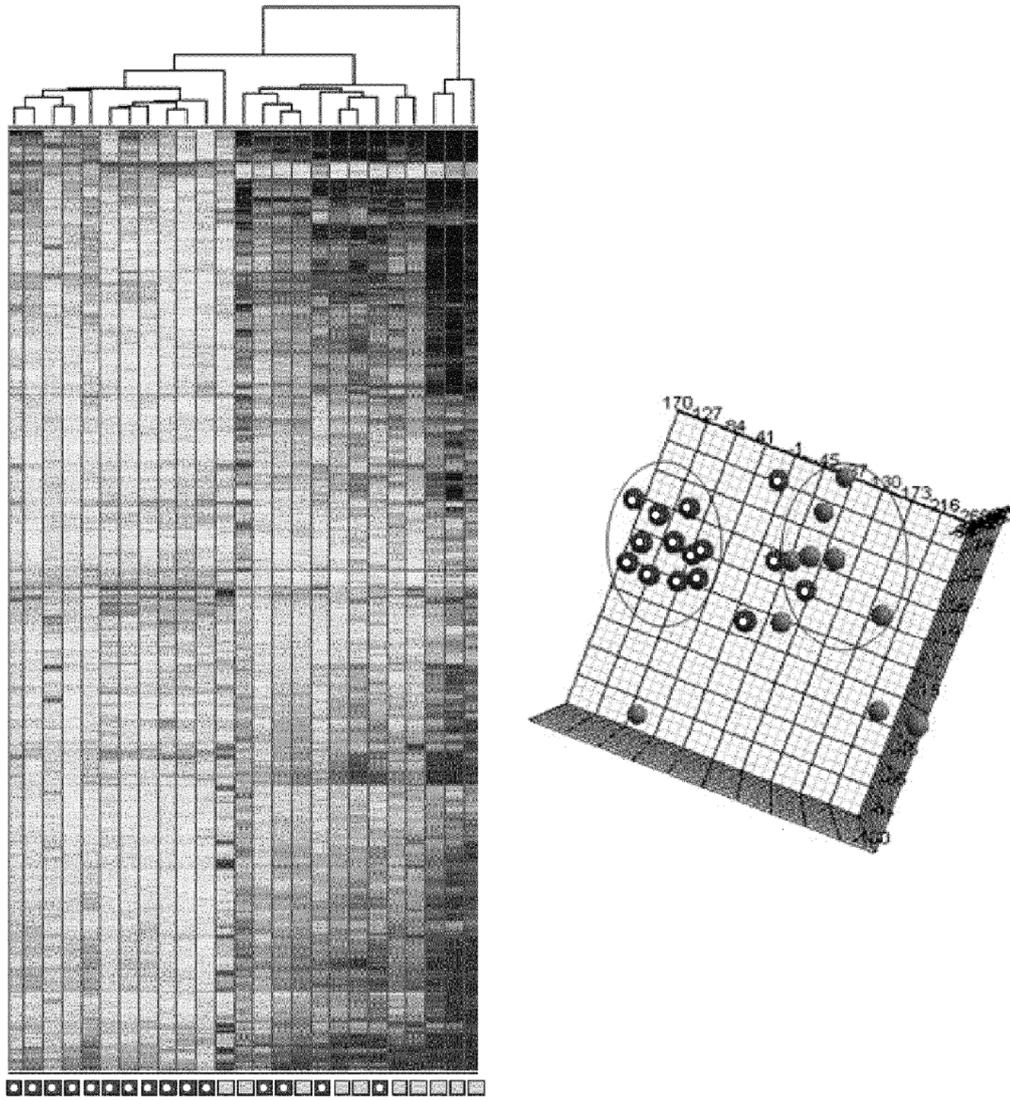


Fig. 3B

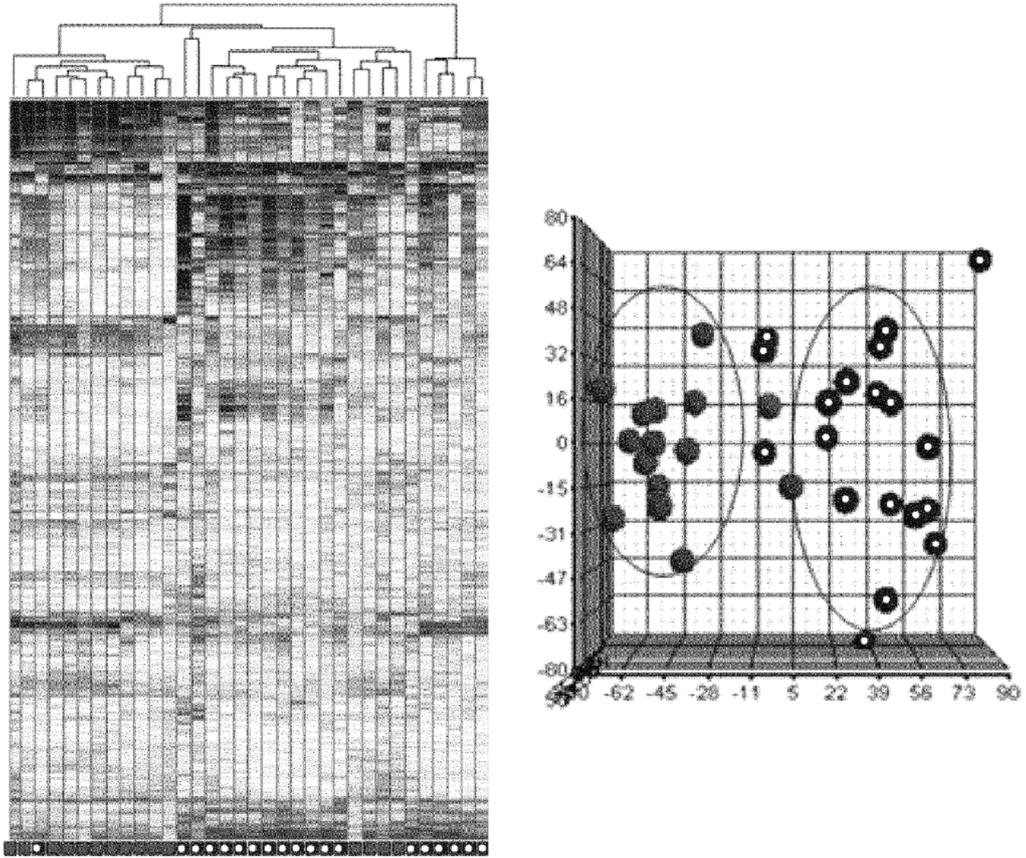


Fig. 3C

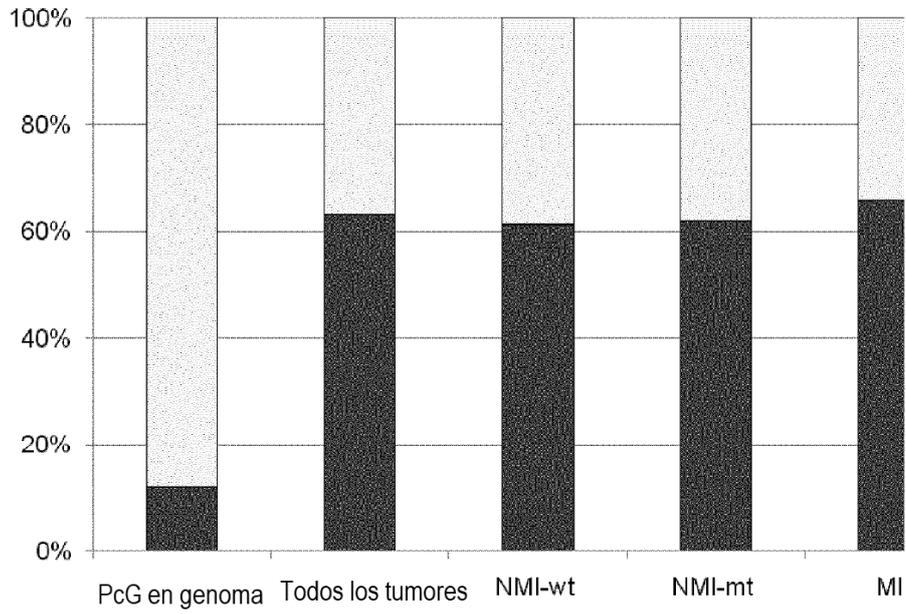


Fig. 4A

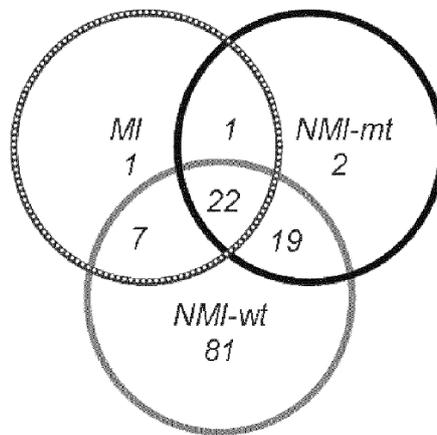


Fig. 4B

Fig. 5A

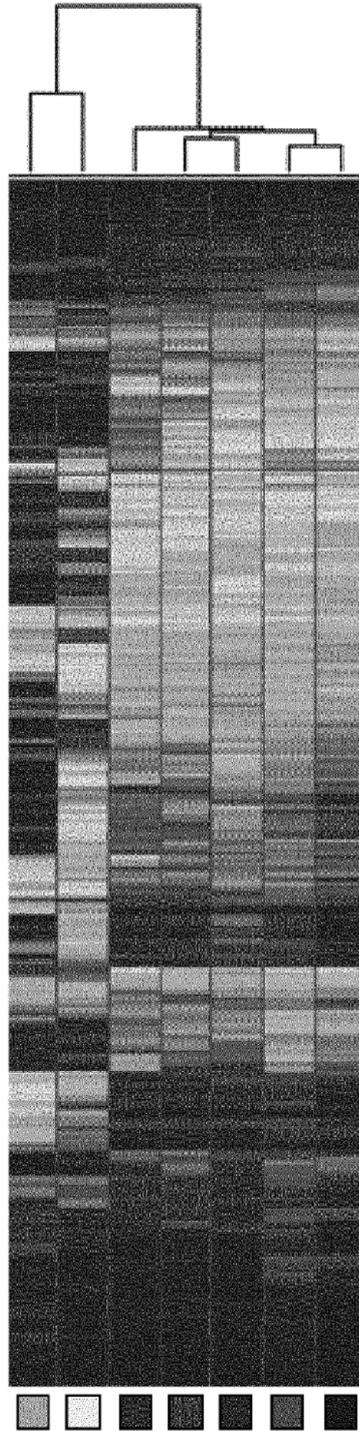
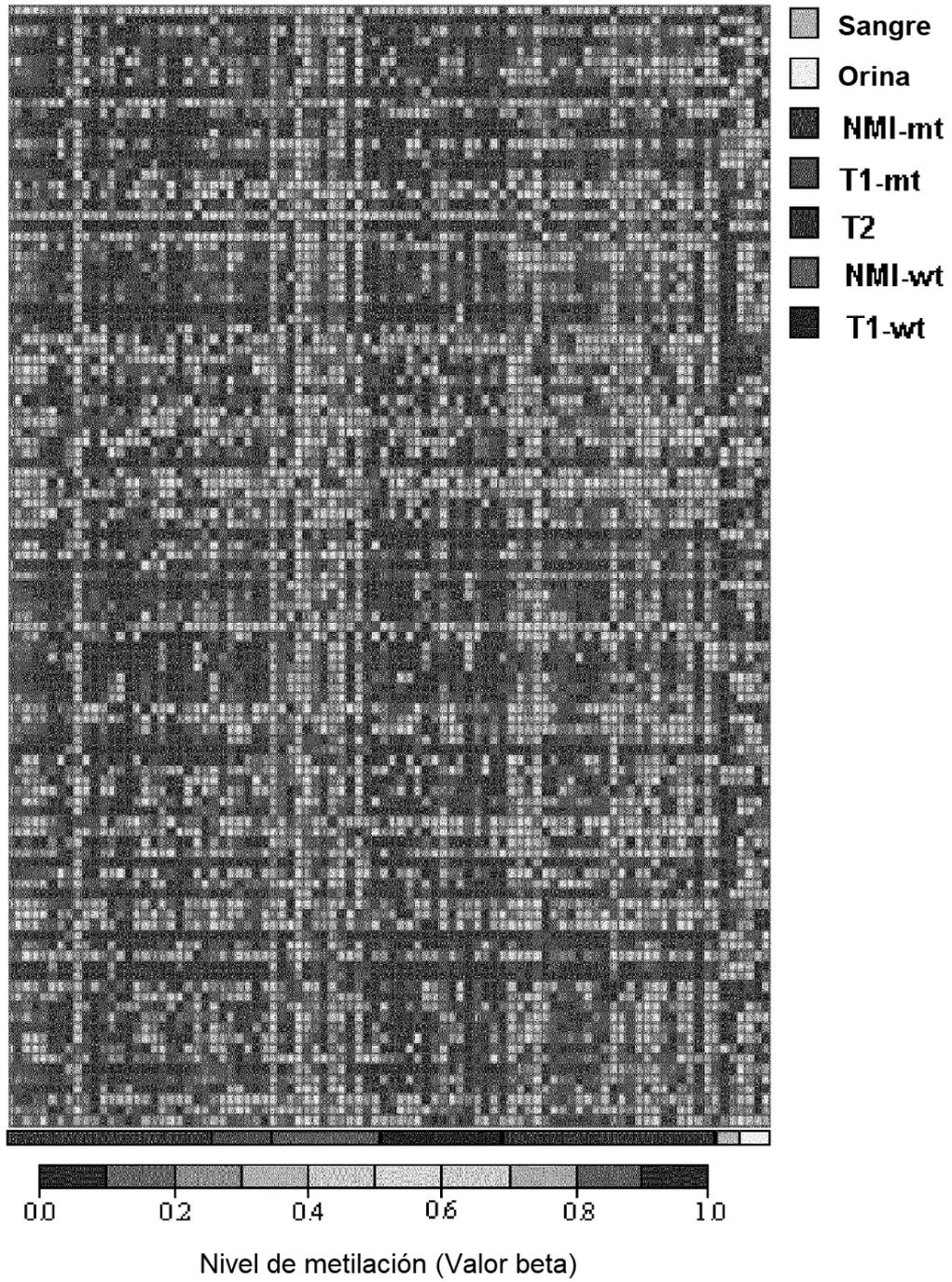


Fig. 5B



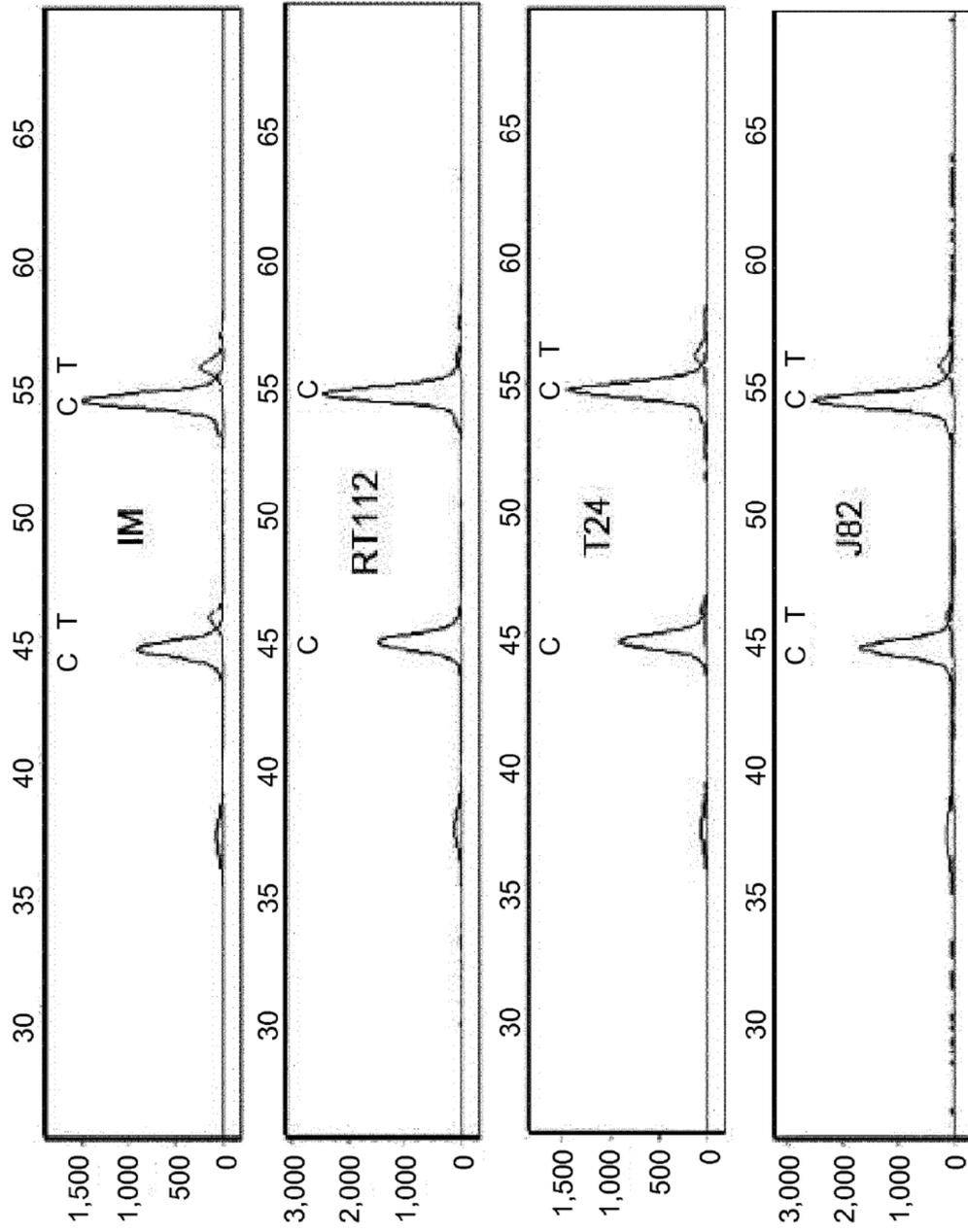


Fig. 5C

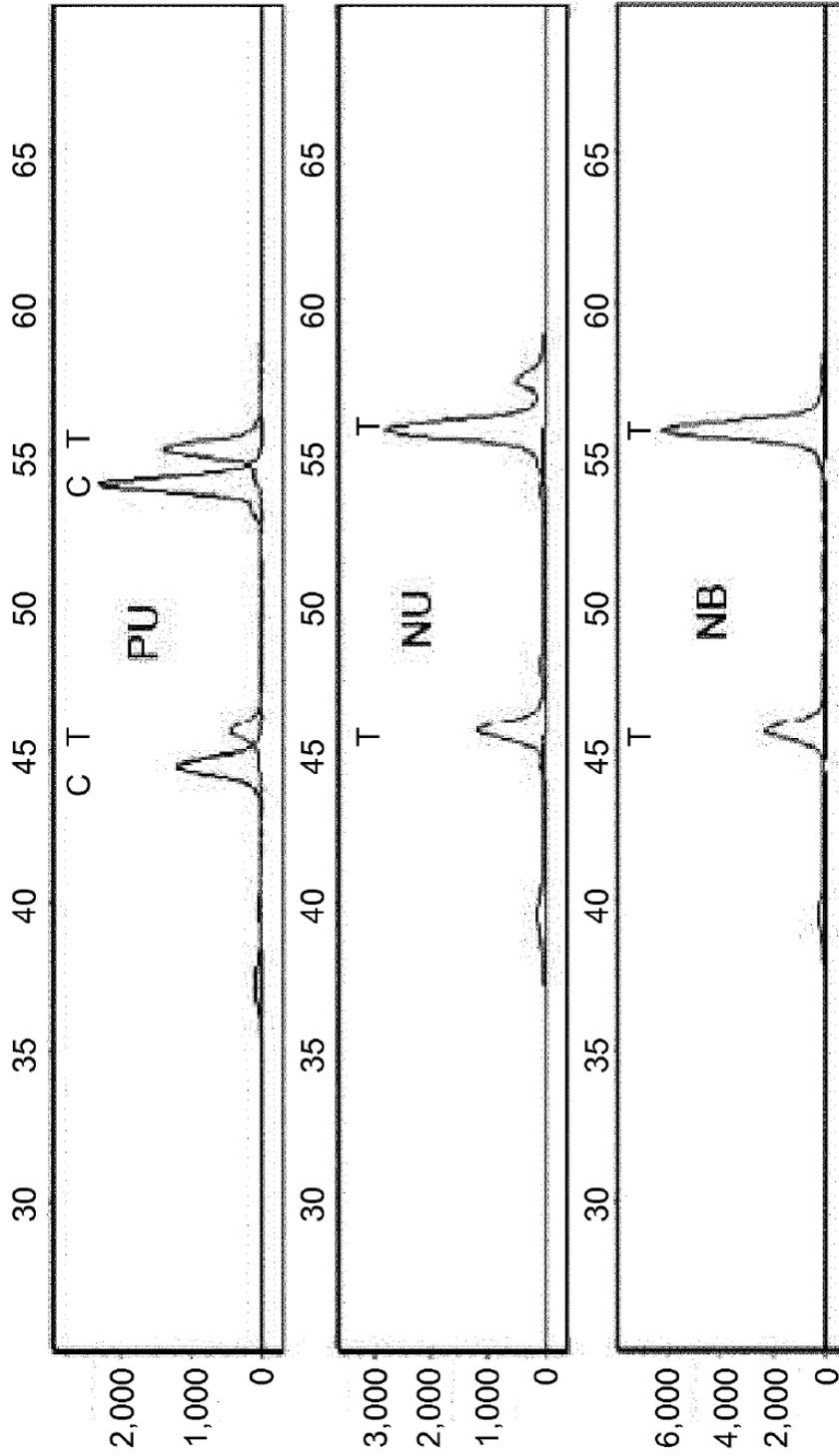


Fig. 5C, continuación

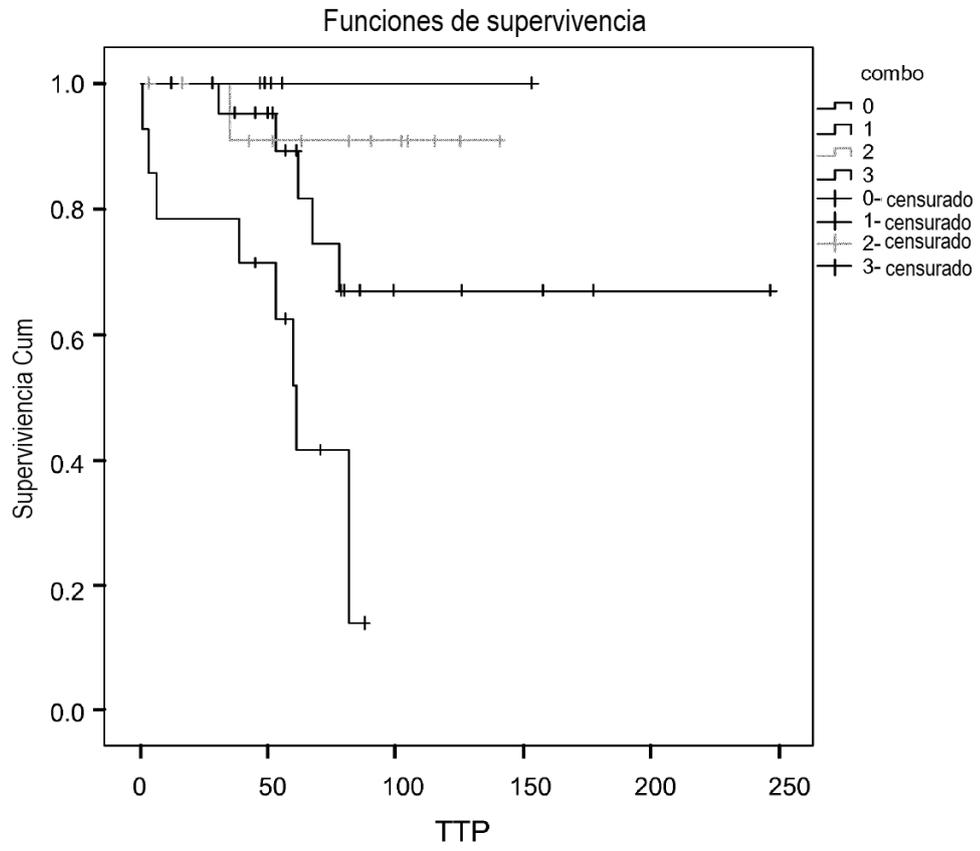


Fig. 5D