

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 729**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06254777 .3**
96 Fecha de presentación: **14.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1764419**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54 Título: **Detección de metilación genica para el diagnostico de un trastorno proliferativo**

30 Prioridad:
15.09.2005 US 717790 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.08.2012

73 Titular/es:
**VERIDEX, LLC
33 TECHNOLOGY DR.
WARREN, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:
**Vener, Tatiana;
Mehrotra, Jyoti;
Varde, Shobha;
Mazumder, Abhijit;
Baden, Jon y
Backus, John**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 386 729 T3

DESCRIPCIÓN

Detección de metilación génica para el diagnóstico de un trastorno proliferativo

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a la interrogación de genes metilados en ensayos diagnósticos y pronósticos para trastornos proliferativos celulares tales como el cáncer. Los genes implicados incluyen el gen de la glutatión-S-transferasa (GSTP1) o porciones del mismo.

10 En los eucariotas de orden superior el ADN está metilado únicamente en las citosinas ubicadas en 5' con respecto a guanosina en el dinucleótido CpG. Esta modificación tiene importantes efectos reguladores sobre la expresión génica, especialmente cuando implica áreas ricas en CpG (islas de CpG) ubicadas en las regiones promotoras de muchos genes. La metilación aberrante de islas de CpG normalmente no metiladas se ha descrito como un suceso frecuente en células inmortalizadas y transformadas, y se ha asociado con la inactivación de la transcripción de ciertos genes supresores de tumores o genes de otro modo asociados con la mejora de ciertos cánceres humanos

15 La glutatión-S-transferasa (GST) cataliza las reacciones de destoxificación intracelulares, incluida la inactivación de carcinógenos electrofílicos, mediante conjugación de electrófilos químicamente reactivos al glutatión (C. B. Pickett, y col., Annu. Rev. Biochem., 58:743, 1989; B. Coles, y col., CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 25:47, 1990; T. H. Rushmore, y col., J. Biol. Chem. 268:11475, 1993). Las GST humanas codificadas por varios genes diferentes a loci diferentes se han clasificado en cuatro familias denominadas alfa, mu, pi y teta (B. Mannervik, y col., Biochem. J., 282:305, 1992). Muchos cánceres humanos, tales como los cánceres de próstata y hepáticos, exhiben disminución de la expresión de GSTP1 respecto a sus tejidos de origen.

20 Los documentos WO2004087957 y WO2004067777 divulgan procedimientos para predecir la evolución de un trastorno proliferativo en el que el estado de metilación del marcador GSTP1 se determina usando un reactivo que consiste en la secuencia gccccaataactaaatcagcagc. El documento WO2004113567 se refiere a procedimientos en los que parte de la GSTP1 se amplifica para evaluar el estado de metilación.

25 En el caso del cáncer de próstata, en concreto, se ha demostrado que el diseño de cebadores y sondas para PCR específicos de metilación ("MSP") que discriminen entre la hiperplasia prostática benigna y el adenocarcinoma prostático es complejo. Los mejores conjuntos de cebador/sonda publicados normalmente muestran una sensibilidad de hasta aproximadamente un 75 % si se ajustan los ensayos a una especificidad del 100 % y una especificidad menor del 60 % si se ajustan los ensayos a una sensibilidad del 100 %. Se podría obtener un ensayo más sólido y consistente con nuevas combinaciones de cebador y sonda. La presente invención cumple dicha necesidad.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de la presencia o predecir el curso de un trastorno proliferativo, que comprende determinar el estado de metilación de un marcador para GSTP1 en una muestra biológica con el uso de una sonda de ácido nucleico y cebadores codificados por las SEC ID N° 23-25.

35 En un aspecto de la divulgación, un procedimiento para detectar un trastorno de proliferación celular en tejido prostático u otra muestra de un sujeto implica poner en contacto un componente celular con un reactivo útil en la amplificación y detección de regiones hipermetiladas de ciertos genes.

En otro aspecto de la divulgación, al menos uno de estos genes hipermetilados es GSTP1 I, que se puede analizar en combinación con uno o más de otros genes.

40 En otro aspecto de la divulgación se obtiene una muestra de ácido nucleico que se sospecha que tiene secuencias diana metiladas de una muestra biológica, tratar la muestra con un reactivo que puede cebar una porción de la diana, amplificar el ácido nucleico diana y comparar el grado de metilación de la muestra amplificada con el de una muestra normal conocida. En otro aspecto más, una secuencia que no es probable que esté metilada se amplifica y detecta por comparación con la secuencia metilada amplificada.

45 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para detectar un trastorno proliferativo celular. Esto se realiza amplificando un gen cuyo estado de metilación es indicativo del trastorno proliferativo celular. El procedimiento de detección puede incluir poner en contacto una muestra o fluido biológico que contiene ácido nucleico con un agente que modifica la citosina no metilada, amplificar el ácido nucleico en la muestra con cebadores oligonucleotídicos o cebar las secuencias que distinguen entre ácido nucleico modificado metilado y no metilado, y detectar el ácido nucleico metilado en base a la presencia o ausencia de productos de amplificación producidos durante la amplificación.

50

Los procedimientos de la invención abarcan determinar una proporción de metilación en una muestra. La proporción de metilación es la proporción entre el nivel de metilación de un Marcador (o una región de un Marcador) que está hipermetilado en un estado de enfermedad con respecto al nivel de metilación de un Marcador que no está hipermetilado en la misma condición (o respecto a una región del mismo Marcador que no está hipermetilada en la misma condición). Cuando se determina la proporción de metilación mediante comparación de la metilación de un Marcador que está hipermetilado en un estado de enfermedad con otro marcador que no lo está, el segundo Marcador se puede denominar Marcador de referencia.

En otro aspecto de la divulgación, las proporciones de metilación se determinan mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

En otro aspecto de la divulgación se proporcionan moléculas indicadoras para ensayos diagnósticos y/o pronósticos.

En otra realización, la divulgación proporciona un kit útil para realiza un ensayo de acuerdo con la reivindicación 1. El kit incluye uno o más contenedores; un primer contenedor que contiene un reactivo que modifica la citosina no metilada y un segundo contenedor que contiene un reactivo que ceba la amplificación de un ácido nucleico con contienen CpG, en el que el reactivo distingue entre ácido nucleico modificado metilado y no metilado.

En otro aspecto más, la secuencia de ácido nucleico que se detecta en los procedimientos de la invención o los kits para practicarlos incluye un promotor o una porción de un promotor.

En otro aspecto más de la invención, procedimientos y kits usados para detectar porciones metiladas de ciertos genes de acuerdo con las reivindicaciones también incluyen etapas y/o componentes para analizar la presencia de otro ácido nucleico. EL grado hasta el cual el gen metilado intencionadamente se ve afectado por el tratamiento (p. ej., amplificación) se compara con el de otro ácido nucleico para determinar la extensión de metilación del Marcador.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de los resultados de ensayos MSPCR usando sondas y cebadores de la técnica anterior.

La Fig. 2 es un gráfico de los resultados de ensayos MSPCR usando sondas y cebadores de hidrólisis de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de la invención

La hipermetilación de ciertos genes se correlaciona con la carcinogénesis prostática. Las secuencias de ácido nucleico que comprenden dichos genes o porciones de dichos genes se denominan Marcadores en esta memoria. Los Marcadores incluyen ácidos nucleicos que comprenden los genes siguientes o porciones de dichos genes: GSTP1 (SEC ID N° 54), RARB2 (SEC ID N° 57), RASSF1A (SEC ID N° 64), TIMP3 (SEC ID N° 58), APC (Promotor= SEC ID N° 59, Gene= SEC ID N° 60), beta-Actina (SEC ID N° 55 y 56) , PTGS2 (Promotor SEC ID N° 61, Gen= SEC ID N° 62) y 14-3-3 sigma (SEC ID N° 63).

Los ensayos para detectar dicha hipermetilación incluyen técnicas tales como MSP y análisis con endonucleasas de restricción. La región promotora es una diana particularmente importante para detectar dicho análisis de hipermetilación. El análisis de la secuencia de la región promotora de GSTP I muestra que casi el 72 % de los nucleótidos son CG y aproximadamente el 10 % son dinucleótidos de CpG.

La divulgación proporciona un procedimiento para determinar el estado de metilación de ciertas regiones de los Marcadores en un tejido u otra muestra biológica de un sujeto en el que el ADN asociado con la enfermedad proliferativa se amplifica y detecta. Dado que un nivel menor de la proteína codificada por el Marcador (es decir, menos transcripción) a menudo es el resultado de la hipermetilación de una región concreta, tal como el promotor, es deseable determinar si dichas regiones están hipermetiladas. Esto se puede demostrar en el caso del gen de GSTP1. Las regiones hipermetiladas son aquellas que están metiladas en un grado estadísticamente significativo mayor en muestras de tejido enfermo en comparación con el tejido normal.

Para los fines de la invención, una sonda de ácido nucleico o indicador específico para ciertas regiones Marcador se usa para detectar la presencia de regiones metiladas del gen del Marcador en fluidos o tejidos biológicos. Los cebadores oligonucleotídicos basados en ciertas porciones de la secuencia del Marcador son particularmente útiles para amplificar ADN mediante técnicas como la PCR. Se puede usar cualquier muestra que contenga una cantidad detectable del polinucleótido relevante. Una muestra preferida de la presente invención es tejido de origen urogenital, específicamente tejido de próstata. Preferentemente, la muestra contiene células epiteliales.

Algunos de los cebadores/sondas o reactivos indicadores de la divulgación se usan para detectar metilación del las secuencias de control de la expresión. Estas son secuencias de ácido nucleico que regulan la transcripción y, en algunos casos, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por tanto, las secuencias de control de la expresión

pueden incluir secuencias implicadas con promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, codones de iniciación (es decir, ATG), señales de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen que permita la traducción adecuada del ARNm y codones de terminación.

5 El promotor de GSTP1 es un ejemplo de una secuencia de control de la expresión de un Marcador útil. Es una secuencia polinucleotídica que puede dirigir la transcripción del gen para producir una proteína de glutatión-S-transferasa. La región promotora se localiza cadena arriba, o 5', del gen estructural. Puede incluir elementos que son suficientes para hacer controlable la expresión génica dependiente de promotor específica del tipo de célula, específica del tejido, o inducible por señales o agentes externos; dichos electos se pueden localizar en las regiones 5' o 3' de la secuencia polinucleotídica.

10 Un procedimiento de la divulgación incluye poner en contacto una célula diana que contiene un Marcador con un reactivo que se une al ácido nucleico. El componente de la célula diana es un ácido nucleico tal como ADN o ARN. Los reactivos pueden incluir sondas y cebadores tales como cebadores para PCR o MSP u otras moléculas configuradas para amplificar y detectar la secuencia diana. Por ejemplo, los reactivos pueden incluir secuencias de cebado combinadas o unidas a sus propios segmentos indicadores, tales como los denominados reactivos Escorpión o indicadores Escorpión y se describen en las patentes de EE.UU. 6.326.145 y 6.270.967 de Whitcombe y col. 15 (incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad). Aunque No es lo mismo, los términos "cebadores" y "secuencias de cebado" se pueden usar en la presente memoria para hacer referencia a moléculas o porciones de moléculas que ceban la amplificación de secuencias de ácido nucleico.

20 Un procedimiento sensible de detección de patrones de metilación implica combinar el uso de enzimas sensibles a la metilación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tras la digestión de ADN con la enzima, la PCR amplificará a partir de los cebadores que flanquean el sitio de restricción solo si la escisión del ADN se evitó mediante metilación. Ejemplos de regiones diana para los que están diseñados los cebadores de PCR de la invención incluyen cebadores que flanquean la región que se encuentra aproximadamente entre -71 y +59 pb de acuerdo con el número de posición genómica M24485 (Genbank) desde el sitio de inicio de la transcripción GSTP1.

25 El procedimiento de la divulgación puede también incluir poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico con un agente que modifica la citosina no metilada; amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en la muestra por medio de cebadores oligonucleotídicos específicos de CpG; y detectar el ácido nucleico metilado. La modificación preferida es la conversión de citosinas no metiladas en otro nucleótido que distinguirá la citosina no metilada de la metilada. Preferentemente, el agente modifica la citosina no metilada en uracilo y es bisulfito sódico, no obstante, 30 también se pueden usar otros agentes que modifican la citosina no metilada pero no la citosina metilada. La modificación con bisulfito sódico (NaHSO₃) es la más preferida y reacciona con facilidad con el doble enlace en 5,6 de la citosina, pero mal con la citosina metilada. La citosina reacciona con el ion bisulfito para formar una reacción de citosina sulfonada intermedia susceptible de desaminación, lo que da lugar a un uracilo sulfonado. El grupo sulfota se puede eliminar en condiciones alcalinas, lo que da como resultado la formación de uracilo. El uracilo es reconocido como una timina por la Taq polimerasa y, por tanto, tras PCR, el producto resultante contiene citosina solo en la 35 posición en la que hay 5-metilcitosina en el molde inicial. Los indicadores y reactivos Escorpión y otros sistemas de detección distinguen de forma similar las especies modificadas de las no modificadas tratadas de este modo.

Los cebadores usados en la invención para la amplificación de un ácido nucleico que contiene CpG en la muestra, tras codificación (p. ej., con bisulfito) distinguen específicamente entre ADN no tratado y ADN metilado y no metilado. En la 40 PCR específica de metilación (MSPCR), los cebadores o secuencias de cebado para el ADN no metilado tienen, preferentemente, una T en el par CG en 3' para distinguirlo del C conservado en el ADN metilado y el complementario está diseñado para el cebador antisentido. Los cebadores o secuencias de cebado de MSP para el ADN no metilado normalmente contienen relativamente pocas C o G en la secuencia, ya que las C estarán ausentes en el cebador sentido y las G están ausentes en el cebador antisentido (C se modifica a U (uracilo), que se amplifica como T (timidina) en el producto de amplificación). 45

Los cebadores de la invención son oligonucleótidos de suficiente longitud y secuencia adecuada para proporcionar un inicio específico de la polimerización sobre un número significativo de ácidos nucleicos en el locus polimórfico. Cuando se exponen a las sondas o indicadores de la invención, las secuencias que son amplificadas por los cebadores de la invención revelan el estado de metilación y, por tanto, información diagnóstica. Son más sensibles y específicos que los 50 de la técnica anterior.

Los cebadores de la invención son, más preferentemente, ocho o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos capaces de iniciar la síntesis de un producto de extensión de un cebador, que es sustancialmente complementario a una hebra del locus polimórfico. Las condiciones ambientales que conducen a la síntesis incluyen la presencia de nucleósido trifosfatos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y una temperatura y un pH 55 adecuados. El segmento de cebado del cebador o secuencia de cebado es, preferentemente, monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación, pero puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para

separar las hebras antes de usar para preparar productos de extensión. El cebador debe ser lo bastante largo como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor de la polimerización. La longitud exacta del cebador dependerá de factores tales como la temperatura, el tampón y la composición nucleotídica. Los cebadores oligonucleotídicos contienen, más preferentemente, aproximadamente 12-20 nucleótidos, aunque pueden contener más o menos nucleótidos, preferentemente de acuerdo con guías o normas de diseño bien conocidas.

Los cebadores de la invención se han diseñado para que sean sustancialmente complementarios a cada hebra del locus genómico que se va a amplificar e incluyen los nucleótidos G o C adecuados como se ha tratado anteriormente. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras en las condiciones que permitan el funcionamiento del agente de polimerización. En otras palabras, los cebadores deberán tener suficiente complementariedad como la(s) secuencias flanqueantes 5' y 3' para hibridar y permitir la amplificación del locus genómico.

Los cebadores de la invención se usan en el procedimiento de amplificación. Es decir, reacciones (preferentemente, una reacción de cadena enzimática) que producen cantidades mayores del locus diana respecto al número de etapas de reacción implicadas. En una realización más preferida, la reacción produce cantidades exponencialmente mayores del locus diana. Reacciones como estas incluyen la reacción de PCR. Normalmente, un cebador es complementario a la hebra negativa (-) del locus y el otro es complementario a la hebra positiva (+). La hibridación de los cebadores con el ácido nucleico desnaturizado seguida de la extensión con una enzima, como el fragmento grande de la ADN polimerasa I (Klenow) y nucleótidos, tiene como resultado hebras + y - recién sintetizadas que contienen la secuencia del locus diana. El producto de la reacción en cadena es un pequeño dúplex de ácido nucleico en el que los extremos corresponden a los extremos de los cebadores específicos usados.

Los cebadores de la invención se pueden preparar usando cualquier procedimiento adecuado, tal como procedimientos de fosfotriéster y fosfodiéster convencionales, incluidos procedimientos automáticos. En una de estas realizaciones automáticas, se usan dietilfosforoamiditas como materiales de partida y pueden sintetizarse como han descrito Beaucage, y col. 22, 1859, -1862; 1981) Tetrahedron Lett. Un procedimiento para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido codificado se describe en la patente de EE.UU. Nº 4.458.066.

Cualquier muestra de ácido nucleico, en forma purificada o no purificada, se puede usar como ácido o ácidos nucleicos de partida, siempre que contenta, o se sospeche que contiene, la secuencia de ácido nucleico específica que contiene el locus diana (p. ej., CpG). Por tanto, el procedimiento puede usar, por ejemplo, ADN o ARN, incluido el ARN mensajero. El ADN o ARN puede ser bicatenario o monocatenario. En caso de que el ARN se vaya a usar como molde, se utilizarían enzimas y/o condiciones óptimas para la transcripción inversa del molde en ADN. Además, se puede usar un híbrido ADN-ARN que contiene una hebra de cada uno. También se puede usar una mezcla de ácidos nucleicos producida en la reacción de amplificación anterior en el presente documento, usando los mismos o diferentes cebadores. La secuencia de ácido nucleico específica que se va a amplificar, es decir el locus diana, puede ser una fracción de una molécula más grande o puede estar presente inicialmente como una molécula pequeña de modo que la secuencia específica constituye todo el ácido nucleico.

La muestra que contiene ácido nucleico usada para detección de CpG metilada puede proceder de cualquier fuente, tal como un tejido (en particular tejido de próstata y tejido linfático), sangre, linfa, orina y eyaculado, y se puede extraer mediante diversas técnicas, tales como las descritas por Maniatis y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 280, 281, 1982).

Si la muestra extraída es impura, se puede tratar antes de la amplificación con una cantidad de un reactivo eficaz para abrir las células, fluidos, tejidos o membranas de células animales de la muestra y para exponer y/o separar la(s) hebra(s) del o los ácidos nucleicos. Esta etapa de lisado y desnaturización de ácido nucleico para exponer y separar las hebras permitirá que se produzca la amplificación con mucha mayor facilidad.

Cuando la secuencia del ácido nucleico diana de la muestra contiene dos hebras, es necesario separar las hebras del ácido nucleico antes de que se pueda usar como molde. La separación de las hebras se puede realizar como una etapa aparte o simultáneamente a la síntesis de los productos de extensión del cebador. Esta separación de hebras se puede conseguir usando varias condiciones de desnaturización adecuadas, incluidos medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento físico de separar las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturaliza. La típica desnaturización térmica puede implicar temperaturas que varían desde aproximadamente 80 a 105 °C durante hasta 10 minutos. La separación de las hebras también se puede inducir mediante una enzima de la clase de enzimas conocidas como helicasas o mediante la enzima RecA, que tiene actividad helicasa, y, en presencia de riboATP, se sabe que desnaturaliza el ADN. Las condiciones de reacción que son adecuadas para separar las hebras de ácidos nucleicos usando helicasas se describen en Kuhn Hoffmann-Berling (CSH-Quantitative Biology, 43:63, 1978). Las técnicas para usar RecA se revisan en C. Radding (Ann. Rev. Genetics, 16:405-437, 1982). También se conocen bien perfeccionamientos de estas técnicas.

Cuando se separan las hebras complementarias de los ácidos o ácido nucleico, con independencia de si el ácido nucleico era inicialmente bi o monocatenario, es fácil usar las hebras separadas como molde para la síntesis de hebras adicionales de ácido nucleico. Esta síntesis se realiza en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores a los moldes. En general, la síntesis se produce en una solución acuosa tamponada, preferentemente a un pH de 7-9, más preferentemente de aproximadamente 8. Preferentemente, al tampón que contiene las hebras molde separadas se añade un exceso molar (para el ácido nucleico genómico, normalmente 10^8 :1, cebador:molde) de los dos cebadores oligonucleotídicos. La cantidad de hebra complementaria puede no ser conocida si el procedimiento de la invención se usa para aplicaciones diagnósticas, de modo que la cantidad de cebador relativa a la cantidad de la hebra complementaria no siempre se puede determinar con certeza. No obstante, como materia práctica, la cantidad de cebador añadido estará, en general, en exceso molar sobre la cantidad de la hebra complementaria (molde), cuando la secuencia que se va a amplificar está contenida en una mezcla de hebras de ácido nucleicos de cadena larga complicadas. Se prefiere un exceso molar grande para mejorar la eficiencia del procedimiento.

Los desoxirribonucleósidos trifosfatos, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, se añaden a la mezcla de síntesis, bien por separado o junto con los cebadores, en cantidades adecuadas y la solución resultante se calienta hasta aproximadamente 90-100 °C durante hasta 10 minutos, preferentemente de 1 a 4 minutos. Después de este periodo de calentamiento, se deja enfriar la solución hasta la temperatura ambiente, que es preferible para la hibridación del cebador. A la mezcla enfriada se añade un agente adecuado para efectuar la reacción de extensión del cebador (el "agente para polimerización") y se deja que progrese la reacción en condiciones conocidas en la técnica. El agente para polimerización también se puede añadir con los otros reactivos si es termoestable. Esta reacción de síntesis (o amplificación) se puede producir a temperatura ambiente hasta una temperatura a la que el agente de polimerización ya no funciona.

El agente de polimerización puede ser cualquier compuesto o sistema que funcione para conseguir la síntesis de los productos de extensión del cebador, preferentemente enzimas. Enzimas adecuadas para este fin incluye, entre otros, ADN polimerasa 1 de E. coli, fragmento Klenow de la polimerasa 1 de E. coli, ADN polimerasa de T4, otras ADN polimerasas disponibles, muteínas de polimerasa, transcriptasa inversa y otras enzimas, incluidas enzimas termoestables (p. ej., las enzimas que realizan la extensión del cebador después de someterse a temperaturas suficientemente elevadas como para producir desnaturalización). Un agente preferido es la Taq polimerasa. Enzimas adecuadas facilitarán la combinación de los nucleótidos del modo adecuado para formar los productos de extensión del cebador complementarios de cada hebra del ácido nucleico del locus. En general, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y procederá en dirección 5' a lo largo de la hebra molde, hasta que la síntesis termina, produciendo moléculas de diferentes longitudes. No obstante, puede haber agentes de polimerización que inicien la síntesis en el extremo 5' y que procedan en la otra dirección, usando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

Más preferentemente, el procedimiento de amplificación es mediante PCR. También se pueden usar procedimientos alternativos de amplificación, siempre que los loci meritados y no metilados amplificados mediante PCR usando los cebadores de la invención se amplifiquen de un modo similar mediante los medios alternativos.

Los productos amplificados se identifican, preferentemente, como metilado o no metilado con una sonda o indicador específico del producto, como se describe en la patente de EE.UU. 4,683,195 de Mullis y col., incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. Avances en el campo de las sondas e indicadores para detectar polinucleótidos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Opcionalmente, el patrón de metilación del ácido nucleico se puede confirmar mediante otras técnicas, tal como digestión con enzimas de restricción y análisis de transferencia Southern. Ejemplos de endonucleasas de restricción sensibles a metilación que se pueden usar para detectar metilación en 5'CpG incluyen SmaI, SacII, EagI, MspI, HpaII, BstUI y BssHII.

El procedimiento de la invención más preferido implica establecer una proporción de metilación de acuerdo con las reivindicaciones. Esto se puede realizar estableciendo una proporción entre la cantidad de especies metiladas amplificadas del Marcador obtenido y la cantidad del Marcador de referencia amplificado o una región Marcador no metilada amplificada. Esto se realiza mejor usando PCR cuantitativa en tiempo real. Las proporciones por encima de un valor de corte establecido o predeterminado se consideran hipermetiladas e indicativo de tener un trastorno proliferativo, tal como cáncer (cáncer de próstata en el caso de la GSTP1). Los valores de corte se establecen de acuerdo con procedimientos conocidos en los que dichos procedimientos se usan para al menos dos conjuntos de muestras: aquéllos con enfermedades conocidas y aquéllos con estados normales conocidos. Los Marcadores de referencia de la invención también se pueden usar como controles internos. El Marcador de referencia es, preferentemente, un gen que se expresa de forma constitutiva en las células de las muestras tales como B actina.

Los procedimientos y kits de la invención pueden incluir etapas y reactivos para multiplexación. Es decir, se puede analizar más de un Marcador a la vez.

Dado que un menor nivel de transcripción del gen asociado con el Marcador a menudo es el resultado de hipermetilación de la secuencia polinucleotídica y/o de elementos concretos de las secuencias de control de la

expresión (p. ej., la secuencia promotora), se prepararon los cebadores preparados para corresponder con dichas secuencias. De acuerdo con esto, la invención proporciona procedimientos de detección o diagnóstico de un trastorno proliferativo celular detectando la metilación de áreas concretas dentro de la región de control de la expresión o promotora de los Marcadores, como se especifica en las reivindicaciones, Sondas útiles para detectar metilación de estas áreas son útiles en dichos procedimientos diagnósticos o pronósticos. Moléculas preferidas para la detección de Marcadores se muestran a continuación. El nombre corto para el gen Marcador se muestra entre paréntesis, junto con el tipo de sistema de detección usado. Antisentido solo se refiere a la orientación del cebador que está designado de este modo en relación con la secuencia de cebado del otro miembro del par con el que se asocia. No es necesariamente antisentido con respecto al ADN genómico.

SEC ID N° 1 (GSTP1 ESCORPIÓN):

CCCCGAACGTCGACCGCTCGGGG-BHQ-HEG-CGATTTCGGGGATTTAGGGCGT

SEC ID N° 2 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

AAAATCCCGCGAACTCCCGCC

SEC ID N° 3 (GSTP1 ESCORPIÓN):

CCCGAACGTCGACCGCTTTCGGG-BHQ-HEG-CGATTTCGGGGATTTAGGGCGT

SEC ID N° 4 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

AAAATCCCGCGAACTCCCGCC

SEC ID N° 5 (GSTP1 SCORPIONESCORPIÓN):

CCGCGGGAGTTCGCGGGCGCCG BHQ-HEG-ACTAAATCACGACGCCGACCGC

SEC ID N° 6 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

CGGTTAGTTGCGCGGCGATTTC

SEC ID N° 7 (GSTP1 ESCORPIÓN):

CGGGAGTTCGCGGGTCCCG-BHQ-HEG-ACTAAATCACGACGCCGACCGC

SEQ 10 NO. 8 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

CGGTTAGTTGCGCGGCGATTTC

SEC ID N° 9 (GSTP1 ESCORPIÓN):

GTGGTTGATGTTTGGGGTATCAACCAC-BHQ-HEG_AATCCCAAACTCCCAACCAACC

SEC ID N° 10 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

GTGGTGATTTTGGGGATTTAGGGTGT

SEC ID Nº 11 (GSTP1 ESCORPIÓN):

ACCCCAGTGGTTGATGTTTGGGGT-BHQ-HEG-AATCCCACAAACTCCCACCAACC

5 **SEC ID Nº 12 (GSTPI ESCORPIÓN Cebador antisentido):**

GTGGTGATTTTGGGGATTTTAGGGTGT

SEC ID Nº 13 (GSTP1 ESCORPIÓN):

CCCCACAGGTTGGTGGGAGTTTGTGGGG-BHQ-HEG-
CCCAATACTAAATCACAACACCAACCAC

10

SEC ID Nº 14 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

TGGTTAGTTGTGTGGTGATTTTGGGGA

SEC ID Nº 15 (GSTP1 ESCORPIÓN):

15 CCCCCGAACGTCGACCGCTCGGGG-BHQ-HEG- CGATTTCGGGGATTTTAGGGCGT

SEC ID Nº 16 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

AAAATCCCGCGAACTCCCGCC

20 **SEC ID Nº 17 (GSTP1 ESCORPIÓN):**

CGCACGCCGAACGTCGACCGCAAACGTGCG-BHQ-HEG-
CGATTTCGGGGATTTTAGGGCGT

SEC ID Nº 18 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

AAAATCCCGCGAACTCCCGCC

25

SEC ID Nº 19 (GSTP1 ESCORPIÓN):

CGCACGGCGAACTCCCGCCGACGTGCG BHQ-HEG-TGTAGCGGTCGTCGGGGTTG

SEC ID Nº 20 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

30 GCCCCAATACTAAATCACGACG

SEC ID Nº 21 (GSTP1 ESCORPIÓN):

CCGACGCACAAAAAACACCCTAAAATCCGTGCG-BHQ-HEG-
GGTTAGTTGTGTGGTGATTTT

SEC ID N° 22 (GSTP1 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

CACAACACCAACCACTCTTC

5 **SEC ID N° 23(GSTP1 CEBADOR TAQMAN):**

CGTGATTTAGTATTGGGGCGGAGCGGGGC

SEC ID N° 24 (GSTP1 CEBADOR TAQMAN):

ATCCCCGAAAAACGAACCGCGCGTA

10

SEC ID N° 25 (GSTP1 SONDA TAQMAN):

TCGGAGGTCGCGAGGTTTTCTGTTGGA

SEC ID N° 26 (RARB2 ESCORPIÓN):

15

GCCGCCGTCGAGAACGCGAGCGGGCGGC-BHQ-HEG-TACCCCGACGATACCCAAAC

SEC ID N° 27 (RARB2 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

GGGATTAGAATTTTTTATGCGAGTTGT

20

SEC ID N° 28 (RARB2 ESCORPIÓN):

CGGCAGGATTGGGATGTCGAGCTGCCG-B>-IQ-HEG-TACCCCGACGATACCCAAAC

SEC ID N° 29 (RARB2 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

GGCATTAGAATTTTTTATGCGAGTTGT

25

SEC ID N° 30 (RASSF1A ESCORPIÓN):

GCCGCGGTTTCGTTTCGGTTCGCGGC-BHQ-HEG-CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG

SEC ID N° 31 (RASSF1A ESCORPIÓN Cebador antisentido):

30

GCGTTGAAGTCGGGGTTC

SEC ID N° 32 (TIMP3 ESCORPIÓN):

GCGGCGAGTTCGGGTTGTAGCGCCGC-BHQ-HEG-CGCCTCTCCAAAATTACCGTAC

SEC ID N° 33 (TIMP3 ESCORPIÓN Cebador antisentido):

GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT

SEC ID N° 34 (APC ESCORPIÓN):

5 GCCGGCGGGTTTTGACGGGCCGGC-BHQ-HEG-CGAACCAAACGCTCCCCA

SEC ID N° 35 (APC ESCORPIÓN Cebador antisentido):

GTCGGTTACGTGCGTTTATATTTAG

10 **SEC ID N° 36 (ACTINA ESCORPIÓN):**

GCGCCCAACCGCACAAAGGGCGC-BHQ-HEG-GGGTATATTTTCGAGGGGTACG

SEC ID N° 37 (ACTINA ESCORPIÓN Cebador antisentido):

CGACCCGCACTCCGCAAT

15

SEC ID N° 38 (ACTINA ESCORPIÓN):

CCGCGCATCACCAACCCACACGCGCGG-BHQ-HEG-GGAGTATATAGGTTGGGGAAGTTTG

SEC ID N° 39 (ACTINA ESCORPIÓN Cebador antisentido):

20 AACACACAATAACAAACACAAATTCAC

SEC ID N° 40 (ACTINA ESCORPIÓN):

CCCGGCTAAACCCACCATCCAGCCGGG-BHQ-HEG-GGGAGGGTAGTTTAGTTGTGGTT

25 **SEC ID N° 41 (ACTINA ESCORPIÓN Cebador antisentido):**

CAAAACAAAAAACTAAATCTACACAACC

SEC ID N° 42 (ACTINA ESCORPIÓN):

CCGCGGAACA ITCAACTCAACCGCGG-BHQ-HEG-GGAGGAGGAAGGTAGGTTTTT

30

SEQ 10 NO. 43 (ACTINA ESCORPIÓN Cebador antisentido):

ACATACAACAATCAATAACATAAAACCAC

SEQ 10 NO. 44 (PTGS2/COX2 ESCORPIÓN):

CACGCCGCCGTATCTAGGCGTG-BHQ-HEG-GTTTGTTCGACGTGATTTTTTCGA

SEQ 10 NO. 45 (PTGS2/COX2 Cebador antisentido):

GCAAAAAATCCCCTCTCCCGC

5

SEC ID N° 46 (PTGS2/COX2 ESCORPIÓN):

GCCGCGCACAAATTTCCGCGGC-BHQ-HEG-GAATTGGTTTTCGGAAGCGTTCG

SEC ID N° 47 (PTGS2/COX2 Cebador antisentido):

10 CCCGAATTCCACCGCC

SEC ID N° 48 (PTGS2/COX2 ESCORPIÓN):

GGCGGAACGCACAAATTTCCGCC-BHQ-HEG-GAATTCCTTTTCGCAAGCGTTCG

15 **SEC ID N° 49 (PTGS2/COX2 Cebador antisentido):**

CCCGAATTCCACCGCC

SEC ID N° 50 (PTGS2/COX2 ESCORPIÓN):

TGCCGCCGCCGTATCTAATGGCGGCA-BHQ-HEG-GTTTGTTCGACGTGATTTTTTCGA

20

SEC ID N° 51 (PTGS2/COX2 Cebador antisentido):

GCAAAAAATCCCCTCTCCCGC

SEC ID N° 52 (14-3-3 ESCORPIÓN):

25 CGGCCTTCGCTCTTCGCAAAAGGCCG-BHQ-HEG-GGTAGTTTTTATGAAAGGCGTCGTG

SEC ID N° 53 (14-3-3 Cebador antisentido):

CTAACCGCCCACCACGT

30 BHQ= Inactivador de agujero negro (BioSearch Technologies, San Fransisco, CA)

HEG= Hexaetilenglicol

Los kits de la divulgación se pueden configurar con diversos componentes, siempre que todos contengan al menos un cebador o sonda de la invención o una molécula de detección (p. ej., indicador Escorpión). En una realización, el kit incluye reactivos para amplificar y detectar segmentos Marcadores hipermetilados. Opcionalmente, el kit incluye reactivos de preparación de muestras y/o artículos (p. ej., tubos) para extraer ácidos nucleicos de las muestras.

35

En un kit preferido se incluyen los reactivos necesarios para MSP en un tubo tal como, un conjunto de cebadores para PCR, una ADN polimerasa termoestable, tal como la Taq polimerasa, y un(os) reactivo(s) de detección adecuados tales

como una sonda de hidrólisis o una baliza molecular. En kits opcionalmente preferidos, los reactivos de detección son indicadores o reactivos Escorpión. También se puede usar un único cebador pigmento o un pigmento fluorescente específico del ADN bicatenario, tal como bromuro de etidio. Los cebadores están, preferentemente, en cantidades que dan concentraciones altas. Materiales adicionales en el kit pueden incluir: Tubos o viales de reacción adecuados, una composición de barrera, normalmente una perla de cera que opcionalmente incluye magnesio; tampones y reactivos necesarios, tales como dNTP; ácido(s) nucleico(s) control y/o tampones adicionales, compuestos, cofactores, constituyentes iónicos, proteínas y enzimas, polímeros y similares, que se pueden usar en las reacciones de MSP. Opcionalmente, los kits incluyen reactivos y materiales de extracción de ácido nucleico.

Ejemplos

Ejemplo 1: Comparativo

Se diseñó un ensayo de sonda para hidrólisis basado en los cebadores y sondas de la literatura y dirigidos al ensayo cuantitativo para detectar cáncer de próstata en pacientes con enfermedad clínicamente localizada. Este ensayo incluye una región promotora central de CpG usada para discriminar entre tejido de próstata neoplásico o no neoplásico.

Las secuencias del cebador y de la sonda para hidrólisis con marcaje doble analizadas para este diseño fueron las siguientes:

Cebador directo -GSTP1;(-192)MU17 AGTTGCGCGGCGATTTC (SEC ID N° 65)

Cebador inverso GSTP1;(-74)ML22 GCCCAATACTAAATCACGACG (SEC ID N° 20)

Sonda (5'FAM/3'TAMRA)GSTP1;(-152)MP23 CGGTGACGTTGGGGTGTAGCG (SEC ID N° 66)

Los niveles de metilación de GSTP1 se analizaron en 12 muestras de hiperplasia prostática benigna (HPB), 12 muestras de adenocarcinoma de próstata clínicamente localizado (Tumor) y 2 muestras normales. Los datos se presentan en copias totales de GSTP1 detectada y se muestran en la Fig. 1. Se encontró que el ensayo mostrará un 75 % de sensibilidad para detectar adenocarcinoma de próstata cuando se estableció un valor de corte en el número de copias más alto exhibido por una muestra benigna. La distribución moderada de los niveles de metilación con GSTP1 e tejidos de próstata que muestran hiperplasia prostática benigna y adenocarcinoma de próstata clínicamente localizado sugiere un ensayo que no sería clínicamente relevante sin estar complementado con otro marcador.

Ejemplo 2 (Ensayo de sonda de hidrólisis de acuerdo con la invención)

Los cebadores y la sonda para MSP se diseñaron para mejorar adicionalmente la sensibilidad y la especificidad para el ensayo con GSTP1 y se analizaron en el mismo grupo de muestras que en el Ejemplo 1. Este diseño se localizó cadena debajo de la isla de CpG y abarcó parte del promotor central y del exón 1. Las secuencias del cebador y de la sonda para hidrólisis con marcaje doble analizadas para este ejemplo son las siguientes:

Cebador directo: (-71)MU29 CGTGATTAGTATTGGGGCGGAGCGGGGC (SEC. ID N° 23)

Cebador inverso: (+59)ML25 ATCCCCGAAAAACGAACCGCGCGTA (SEC ID N° 24)

Sonda (5'FAM/3'TAMRA)GSTP1;(-23)MP26 TCGGAGGTCGCGAGGTTTCGTTGGA (SEC ID N° 25)

Los datos se presentan en copias totales de GSTP1 detectada y se muestran en la Fig. 2. Se encontró que el ensayo mostrará un 100% de sensibilidad y un 100 % de especificidad para detectar adenocarcinoma de próstata cuando se estableció un valor de corte en el número de copias más alto exhibido por una muestra benigna.

La isla de CpG de 1,5 kb de GSTP1 abarca desde el promotor hasta el exón 3 y se ha demostrado que está extensamente metilada. Dos sitios de unión para la transcripción, AP1 y Sp1, se localizan justo cadena arriba del exón 1 y fueron el centro del diseño de las sondas y cebadores usados en este ejemplo debido al elevado contenido de CpG dentro de SP1. Se ha demostrado que esta es una buena región para el diseño del ensayo debido a la competición entre los factores de transcripción y las proteínas de unión a metil-CpG que se unen a los sitios AP1 y Sp1 con el fin de inducir la condensación de la cromatina y la silenciamiento génica.

Ejemplo 3: MSP Escorpión

Los reactivos Escorpión se diseñaron para los Marcadores siguientes y los Marcadores de referencia:

SEC ID N° 19, 20 (GSTP1)

SEC ID Nº 38, 39 (Actin)

SEC ID Nº 28, 29 (RAR2)

SEC ID Nº 30, 31 (RASSF1A)

SEC ID Nº 32, 33 (TIMP3)

5 SEC ID Nº 34, 35 (APC)

SEC ID Nº 50, 51 (PTGS2)

SEC ID Nº 52, 53 (14-3-3 sigma)

10 Los diseños se analizaron para observar sus estructuras secundarias y las dimerizaciones inadecuadas usando el software de diseño de cebadores Oligo6 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) y Visual OMP (DNA Software, Inc., 120' West Washington Street Ann Arbor, MI, EE.UU.). Los diseños se analizaron para observar sus estructuras secundarias y las dimerizaciones inadecuadas usando el software de diseño de cebadores Oligo6 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) y Visual OMP (DNA Software, Inc., 120' West Washington Street Ann Arbor, MI, EE.UU.). Los reactivos y cebadores Escorpión se sintetizaron en un sintetizador de ADN automático usando química de fosforoamidita estándar (Scandinavian Gene Synthesis AB, Koping, Suecia) y Biosearch Technologies (Novato, CA, EE.UU.).

Ejemplo 3 Análisis con el reactivo Escorpión:

20 Los reactivos descritos en el Ejemplo 2 se analizaron en varias muestras de ADN humano. Estas muestras incluyeron ADN genómico humano metilado (todas las citosinas precedentes a la guanina están metiladas en la posición 5) y no metilado disponible comercialmente (Chemicon, Temecula, CA, USA) como molde positivo y negativo, respectivamente. El ADN genómico de la línea de células de cáncer de mama humano, MCF-7 y línea celular de cáncer colorrectal, HCT116, como controles positivos y negativos para la metilación de GSTP1 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, EE.UU.).

25 El ADN genómico se modificó usando un kit de reactivos de conversión con bisulfito sódico disponible comercialmente (Zymo Research, Orange, CA, EE.UU.). Este tratamiento convirtió todas las citosinas en el ADN no metilado en Uracilo, mientras que en el ADN metilado solo las citosinas que no preceden a la guanina se convirtieron en Uracilo. Todas las citosinas precedentes a la guanina (en un dinucleótido CpG) siguió siendo citosina.

30 El ADN genómico modificado con bisulfito sódico (100-150 ng) se amplificó en una reacción de 25 µl que contiene los componentes siguientes: Tris 67mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16,6mM, MgCl₂ 6,7mM, beta mercaptoetanol 10mM, 1,25mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 U de ADN polimerasa Hot start de Taq, sonda Escorpión 250 nM, cebador inverso o directo 250 nM (en función del diseño escorpión), 625 nM de pigmento de referencia pasivo, ROX (solo para ciclos ABI7900).

Después se analizaron las muestras en un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real en un sistema de detección de secuencia ABI 7900HT y/o instrumento Cepheid SmartCycler® PCR-

Las condiciones de PCR usadas fueron:

35 Para los ciclos en ABI 7900:

95 °C durante 5 minutos; después, 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos y una extensión final

A 72 °C durante 5 minutos Los datos ópticos se recogieron a 59 °C para cada ciclo.

Para los ciclos en Cepheid smart cycler:

40 95 °C durante 60 segundos; después, 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los datos ópticos se recogieron a 59 °C para cada ciclo.

Los reactivos Escorpión mostraron una eficiencia de PCR de 91,2 % en el caso de los reactivos de GSTP1 y 95,2 % en el caso de los reactivos de Actina. Los valores medios de Ct fueron:

GSTP1	28
B Actina	30
APC	29
TIMP3	30
RASSF1A	29
RARB2	29
PTGS2	33
14-3-3S	32

Ejemplo 4: Comparación con balizas moleculares.

Se obtuvieron balizas moleculares para detectar hipermetilación de GSTP1 a lo largo de la porción del gen descrito en el Ejemplo 1. Las balizas se aplicaron a reacciones de PCR con muestras como se describe en el ejemplo 2. En cada caso, se coamplificó la B Actina de modo que se pudieron obtener las proporciones de metilación. Los conjuntos de sonda-cebador de GSTP1 y B-actina Escorpión mostraron un mejor rendimiento en la detección del ADN metilado de GSTP1 y el ADN no metilado de B actina. Los valores umbral de Ct para los conjuntos Escorpión diseñados fueron más de 1,5 Ct mejores que para las sondas de balizas moleculares (Ct medio de 28,82 para las balizas frente a 27,30 para los indicadores Escorpión).

Los resultados fueron los siguientes.

ADN metilado universal, ng	500	250	100	50	10	5
Escorpión (proporción nº de copias GSTP1/B-actina)	272	310	285	296	339	288
Baliza Molecular (proporción nº de copias GSTP1/B-actina)	759	735	758	767	797	814

Ejemplo 5 Valores de corte de las proporciones de metilación

Muestras de tejido prostático de pacientes con afecciones clínicas conocidas se sometieron a PCR como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las proporciones de metilación se calcularon y se muestran a continuación. Los datos se analizaron usando el siguiente procedimiento. Antes de usar un algoritmo, se siguieron los siguientes requisitos previos. Para Actina: Valores CT < 40 para ambos duplicados (como se ha definido mediante el equipo de PCR en tiempo real. Para el resultado de GSTP1 "metilado": Valores CT < 40 para ambos duplicados (como se ha definido mediante el equipo de PCR. La pendiente de ambas curvas estándar superiores a -4 (eficiencia de la PCR > 80 %)

R2: 0,99, 4 puntos de datos relevantes sobre la curva estándar

El control de ensayo positivo tiene que generar un resultado positivo

Los controles que no son molde incluidos de forma rutinaria (curvas estándar) tienen que ser negativos sin se han cumplido los requisitos previos. Se calcularon los números de copias APRA cada uno de los genes (GSTP1 y Actina) en base a las curvas estándar y se calculó una proporción para cada muestra (incluido el control positivo) usando la siguiente formula: (Número de copia de GSTP1/Número de copia de β -Actina) * 1000. Después se estableció un corte usando una proporción que generó una especificidad alta y una sensibilidad alta. El corte fue 10 para GSTP1 para proporcionar una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 100 % para 142 tejidos prostáticos incluidos en parafina fijada en formalina. Las proporciones generadas se usaron para determinar el estado de metilación de una muestra dada usando los criterios siguientes:

Resultados	Nº de copia (mGSTP1)	Nº de copia (B-actina)	Proporción x 1000
GSTP1 Metilada	>2	>2	>10
GSTP1 No Metilada	cualquiera	>200	<10
Sin determinar	<2	<200	

Un experto en la técnica reconocerá que se puede ajustar el corte, preferentemente para fijar los valores de sensibilidad y especificidad a los adecuados para el objetivo para el cual se usarán (p. ej., detección selectiva, monitorización de la terapia, ensayos de reflejo de diagnósticos ambiguos).

5 Ejemplo 6- Marcadores de combinación (Profético)

Los reactivos escorpión para las siguientes combinaciones se preparan como se ha descrito en el Ejemplo 1: Marcador GSTP1 y RAR β 2, GSTP1 y APC, y GSTP1 y PTGS2. Los Marcadores funcionan en combinación como PCR multiplexada de acuerdo con el Ejemplo 2 usando ciclos repetidos de 50 muestras de tejido prostático con condiciones conocidas (es decir, normal, hiperplasia benigna, cáncer de próstata). Los resultados esperados se muestran a continuación.

Marcador(es)	SEC ID Nº	Sensibilidad	Especificidad
GSTP1 + RAR β 2		90%	100%
GSTP1 + APC		96,2%	92,9
GSTP1 + PTGS2		96,2	100

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VENER, Tatiana

MEHROTRA, Jyoti

VARDE, Shobha

MAZUMDER, Abhijit

BADEN, Jon

BACKUS, John

<120> DETECCIÓN DE METILACIÓN GÉNICA

<130> VDX5027USNP

<140> 60/717790

<141> > 2005-09-15

<160> 66

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> GSTP1 Escorpión

<220>

10 <221 > base modificada

<222> (23)..(23)

<223> -BHQ-HEG-

<220>

15 <221> base modificada

<222> (23)..(23)

<223> -BHQ (Inactivador de agujero negro) -HEG (Hexaetilglicol) -

<400> 1

20 ccccgaaacgt cgaccgctcg gggcgatttc ggggatttta gggcgt 46

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

30 <400> 2

aaaatcccg c gaactcccg c 21

<210> 3

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> GSTP1 Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (23)..(23)

10 <223> -BHQ-HEG-

<400> 3

cccgaaacgtc gaccgcttc gggcgatttc ggggatttta gggcgt 46

15 <210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 4

aaaatcccg c gaactccgc c 21

25

<210> 5

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> GSTP1 Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (22)..(22)

<223> -BHQ-HEG-

5 <400> 5

cggcgggagtg tcgcggggcgc cgactaaatc acgacgccga ccgc 44

<210> 6

<211> 22

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

15

<400> 6

cggttagttg cgcggcgatt tc 22

<210> 7

20 <211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> GSTP1 Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (19)..(19)

30 <223> -BHQ-HEG-

<220>

<221> base modificada

<222> (25)..(25)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 7

cgggagttcg cgggtcccga ctaaatacag acgccgaccg c 41

5

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 8

cggtagttg cgccgagatt tc 22

15

<210> 9

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> GSTP1 Scorpion

<220>

25

<221> base modificada

<222> (27)..(27)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 9

30

gtgggtgatg ttgggggtat caaccacaat cccacaaact cccaccaacc 50

<210> 10

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

5

<400> 10

gtggtgattt tggggatttt aggggtgt 27

<210> 11

10

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> GSTP1 Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (24)..(24)

20

<223> -BHQ-HEG-

<400> 11

accccagtggtg ttgatgtttg gggtaatccc acaaactccc accaacc 47

25

<210> 12

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> GSTP1 Scorpion

<400> 12

gtggtgattt tggggatttt aggggtgt 27

<210> 13
 <211> 56
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> GSTP1 Scorpion

 10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (28)..(28)
 <223> -BHQ-HEGEP

 15 <400> 13
 cccacacaggt tgggtgggagt ttgtggggcc caatactaaa tcacaacacc aaccac 56

 <210> 14
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido
 25
 <400> 14
 tggtagttg tgggtgatt ttgggga 27

 <210> 15
 30 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>

<223> GSTP1 Scorpion

<220>

<221> base modificada

5 <222> (23)..(23)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 15

ccccgaacgt cgaccgctcg gggcgatttc ggggatttta gggcgt 46

10

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 16

20 aaaatcccg c gaactccgc c 21

<210> 17

<211> 53

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Scorpion

30 <220>

<221> base modificada

<222> (30)..(30)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 17

cgcacgccga acgtcgaccg caaacgtgcg cgatttcggg gatttaggg cgt 53

<210> 18

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 18

aaaatcccg c gaactcccg c 21

15 <210> 19

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> GSTP1 Scorpion

<220>

<221> base modificada

25 <222> (27)..(27)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 19

cgcacggcga actcccgccg acgtgcgtgt agcggtcgtc ggggttg 47

30

<210> 20

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

5 <400> 20

gcccccaatac taaatcacga cg 22

<210> 21

<211> 55

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Scorpion

15

<220>

<221> base modificada

<222> (34)..(34)

<223> -BHQ-HEG-

20

<400> 21

ccgacgcaca aaaaaacacc ctaaaatccg tcggggtag ttgtgtgtg atttt 55

<210> 22

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> GSTP1 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 22

cacaacacca accactcttc 20

<210> 23

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> GSTP1 Cebador de Taqman

<400> 23

10 cgtgatttag tattggggcg gagcggggc 29

<210> 24

<211> 25

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Cebador de Taqman

20 <400> 24

atccccgaaa aacgaaccgc gcgta 25

<210> 25

<211> 26

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Sonda de Taqman

30

<400> 25

tccgaggtcg cgaggtttc gttgga 26

<210> 26

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> RARB2 Scorpion

<220>

<221> base modificada

10 <222> (28)..(28)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 26

gccgccgtcg agaacgcgag cgggcggcta ccccgacgat acccaaac 48

15

<210> 27

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> RARB2 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 27

25 gggattagaa tttttatgc gagttgt 27

<210> 28

<211> 47

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> RARB2 Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (27)..(27)

<223> -BHQ-HEG-

5

<400> 28

cggcaggatt gggatgtcga gctgccgtac cccgacgata cccaaac 47

<210> 29

10

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> RARB2 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 29

gggattagaa tttttatgc gagttgt 27

20

<210> 30

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> RASSFIA Scorpion

<220>

<221> base modificada

30

<222> (25)..(25)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 30

gccgcgggtt cggtcggttc gcggcccggt acttcgctaa cttaaacg 49

<210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> RASSF1A Escorpión Cebador Antisentido

 10 <400> 31
 gcgttgaagt cggggttc 18

 <210> 32
 <211> 48
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> TIMP3 Scorpion
 20
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (26)..(26)
 <223> -BHQ-HEG-
 25
 <400> 32
 gcggcgagtt cggttgtag cgccgccgcc tctccaaaat taccgtac 48

 <210> 33
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>

<223> TIMP3 Escorpión Cebador Antisentido

<400> 33

gcgtcggagg ttaaggtgt t 21

5

<210> 34

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> APC Scorpion

<220>

15

<221> base modificada

<222> (25)..(25)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 34

20

gccggcgggt ttctgacggg ccggccgaac caaaacgctc ccca 44

<210> 35

<211> 25

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> APC Escorpión Cebador Antisentido

30

<400> 35

gtcggttacg tgcgtttata tttag 25

<210> 36

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Actina Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (22)..(22)

10 <223> -BHQ-HEG-

<400> 36

gcgccaacc gcacaagggc gcgggtatat ttcgagggg tacg 44

15 <210> 37

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> ACTINA Escorpión Cebador Antisentido

<400> 37

cgacccgcac tccgcaat 18

25

<210> 38

<211> 52

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> ACTINA Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (27)..(27)

<223> -BHQ-HEG-

5 <400> 38

ccgcgcatca ccacccaca cgcgcgggga gtatataggt tggggaagtt tg 52

<210> 39

<211> 27

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ACTIN Escorpión Cebador Antisentido

15

<400> 39

aacacacaat aacaaacaca aattcac 27

<210> 40

20 <211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> ACTINA Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (27)..(27)

30 <223> -BHQ-HEG-

<400> 40

cccggctaaa ccacacatcc agccgggggg aggtagttt agttgtggtt 50

<210> 41

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> ACTIN Escorpión Cebador Antisentido

<400> 41

10 caaaacaaaa aaactaaatc tacacaacc 29

<210> 42

<211> 47

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> ACTINA Scorpion

20 <220>

<221> base modificada

<222> (26)..(26)

<223> -BHQ-HEG-

25 <400> 42

ccgcggaaca ttaactcaa ccgcggggag gaggaaggta ggtttt 47

<210> 43

<211> 29

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ACTINA Escorpión Cebador Antisentido

<400> 43

acatacaaca atcaataaca taaaaccac 29

5 <210> 44

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> PTGS2/COX2 Scorpion

<220>

<221> base modificada

15 <222> (22)..(22)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 44

cacgccgccg tatctaggcg tggtttggtt cgacgtgatt tttcga 47

20

<210> 45

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> PTGS2/COX2 Antisense Primer

<400> 45

30 gcaaaaaatc ccctctcccg c 21

<210> 46

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> PTGS2/COX2 Scorpion

5

<220>

<221> base modificada

<222> (22)..(22)

<223> -BHQ-HEG-

10

<400> 46

gccgcgcaca aattccgcg gcgaattggt ttcggaagc gttcg 45

<210> 47

15

<211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20

<223> PTGS2/COX2 Cebador Antisentido

<400> 47

cccgaattcc accgcc 16

25

<210> 48

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> PTGS2/COX2 Scorpion

<220>

<221> base modificada

<222> (23)..(23)

<223> -BHQ-HEG

<400> 48

5 gccggaacgc acaaattcc gccgaattgg ttctcgaag cgttcg 46

<210> 49

<211> 16

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> PTGS2/COX2 Cebador Antisentido

15 <400> 49

cccgaattcc accgcc 16

<210> 50

<211> 51

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> PTGS2/COX2 Scorpion

25

<220>

<221> base modificada

<222> (26)..(26)

<223> -BHQ-HEG-

30

<400> 50

tgccgccgcc gtatctaag gcggcagtt gttcgacgt gatttttcg a 51

<210> 51

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> PTGS2/COX2 Cebador Antisentido

<400> 51

gcaaaaaatc ccctctcccg c 21

10

<210> 52

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> 14-3-3 Scorpion

<220>

20 <221> base modificada

<222> (26)..(26)

<223> -BHQ-HEG-

<400> 52

25 cggccttcgc tcttcgaaa aggccgggta gttttatga aaggcgtcgt 51

<210> 53

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> 14-3-3 Cebador Antisentido

<400> 53

ctaaccgccc accacgtt 18

<210> 54

5 <211> 4260

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> misc_feature

<223> >gi|341173|gb|M24485.1|HUMGSTP1G Homo sapiens (clon pHGST-pi) glutatión S-transferasa pi
(GSTP1) gen, cds completa

<400> 54

aacaagagat caatatctag aataaalgga gatctgcaaa tcaacagaaa gtaggcagca 60
aagccaaaga aaatagccta aggcacagcc actaaaagga acgtgatcat gtcctttgca 120
gggacatggg tggagctgga agccgttagc ctacagcaaac tcacacagga acagaaaacc 180
agcgagaccg catggtctca cttataagtg ggagctgaac aatgagaaca catgggcaca 240
tggcggcgat caacacacac tggcgctgt tgagcggggt gctggggagg gagagtacca 300
ggaagaatag ctaaggata ctgggcttaa tacctgggtg atgggatgat ctgtacagca 360

15

aaccatcaig gcgcacacac ctatgtaaca aacctgcaca tcctgcacat glaccccaga 420
acttcaaata aaagtggac ggccaggcgt ggtggctcac gcctgtaac ccagcacitt 480
gggaagccga ggcgtgcaga tcacclaagg tcaggagltc gagaccagcc cggccaacat 540
ggtgaaaccc cgctctact aaaaatacaa aaalcagcca gatlggcac gcacctataa 600
ttccacctac tggggaggct gaagcagaat tgcitgaacc cgagaggcgg aggtgcagt 660
gagccgccga galcgcgcca ctgcactcca gcctgggcca cagcgtgaga ctacgtcata 720
aaataaaata aaataacaca aaataaaata aaataaaata aaataaaata aaataataaa 780
ataaaataaa ataaaataaa ataaaataaa ataaagcaat ttctttctt ctaagcggcc 840
tcacccctc tccctgccc tgaagcgg gtgtgaagc tccgggatcg cagcgtctt 900
aggaatttc ccccgcgat gtcggcgc gccagltcg tgcgcacact tgcgtcgggt 960
cctctctcg ctgtctgtt actccctagg ccccgctggg gacctggga agagggaaag 1020
gcttccccg ccagctcgc ggcgactcc ggcactccag ggcgcccctc tgcggccgac 1080
gccccgggtg cagcggcgc cggggctggg gccggcgga glccgaggga cctccagaa 1140
gagcggccg cgccgtgact cagcactgg gccggagcgg gcgggaccac cctataag 1200
ctcggaggcc gcgaggcctt cgctggagt tgcggcgc agtctcgc accagtagt 1260
acgcgcggcc cgctccccg ggalgggct cagagctcc agcatgggc caaccgcag 1320
calcaggccc gggctcccg cagggtcctt cggccactc gagaccggg acgggggcct 1380
aggggaccca ggagctccc agtgcgltt gcggcttca gggggcccg agcgctcgg 1440
ggagggatg gacccgggg gcggggagg ggggcaggct gcgtcaccg cgccttgga 1500
tcctccccg ggtccagca aactttctt tctcgtgc agtccgccc tacaccgtg 1560
tctattccc agtgcaggt aggagcatg gctggcagg gaaggaggc aggggctgg 1620
gctgcagccc acagcccctc gccacccg agagatcca accccttat cctccgtc 1680
tgtgctttt acccgggcc tcttctgt tcccgcctc tccgccaat cctgctccc 1740
gccccagtg tgttgaaat ctccggagga acctgttac ctgtccctc cctgcactc 1800
tgaccctcc cgggtgtct gcgaggcga gtcggcccg tcccacatc tctacttct 1860
cctccccgc aggcgctgc gcggccctc gcatgctgt ggcagatcag ggccagagct 1920
ggaaggagga ggtggtgacc gtggagacgt ggcaggagg ctacacaaa gcctcctgc 1980
taagtacca tgcggggca aggggaggg gtgctggcc ttgggggct gtgactagga 2040

tcgggggacg cccaagctca gtgcccctcc ctgagccatg cctcccccaa cagctatagc 2100
 ggcagctccc caagttccag gacggagacc tcacctgta ccagtccaat accatcctgc 2160
 gtcacctggg ccgcaccctt ggtgagictt gaacctcaa gtccagggca ggcattggca 2220
 agcctctgcc ccggagccc ttgtttta atcagctgcc ccgcagccct ctggagtga 2280
 ggaaactgag acccactgag gttacgtagt ttgccaagg tcaagcctgg gtgcctgcaa 2340
 tcctgccct gtgccaggct gcctcccagg tgcaggta gctctgagca cctgctgtgt 2400
 ggcagctct catccttcca cgcacatct ctccccctcc tcccaggctg gggctcacag 2460
 acagccccct ggttgccca tcccagta ctgtgtgt atcaggcgc cagtcacgcg 2520
 gcctgtccc ctccaccaa cccagggt ctatgggaag gaccagcagg aggcagccct 2580
 ggtggacatg gtgaatgacg gcgtggagga cctccgtgc aaatacatct cctcatcta 2640
 caccaactat gtgagcatct gcaccagggt tgggactgg gggctgaaca aagaaagggg 2700
 ctctgtgc cctaccccc ctacccctc aggtggcttg ggctgacccc ttctgggtc 2760
 aggggtcagg ggcctggta gctcgggccc aggggccag ggcctggga caagacaaa 2820
 cctgcacct tattgcttg gacatcaacc agccaagtaa cgggtcatgg ggcgagtc 2880
 aaggacagag acctccagca actgggtt tctgctcc tgggtggcg agggcttct 2940
 ggagtagcca gaggtggagg aggtttgc gccagttct ggtggagggt gctggcactt 3000
 ttgctgagg aaaatatga gacacagagc acattgggg acctgggacc agtcagcag 3060
 aggcagcgtg tgtgcgctg cgtgtcgtg tgtgtcgtg tgtgtgtga cgcttcatt 3120
 tgtgtcgggt gggtaaggag atagagatgg gcgggcagta ggcccaggtc ccgaaggcct 3180
 tgaaccact ggttgaggt ctctaagg caatggggc cattgagaag tctgaacagg 3240
 gctgtgtctg aatgtagggt ctagaaggat cctccagaga agccagctct aaagctttg 3300
 caatcatctg gtgagagaac ccagcaagga tggacaggca gaatggaata gagatgagtt 3360
 ggcagctgaa gtggacagga ttggtacta gcctggtgt ggggagcaag cagaggagaa 3420
 tctgggactc tgggtcttg cctggggcag acgggggtgt ctacgggct gggagggatg 3480
 agagtaggat gatcatggt ggtgtctggc aggaggcggg caaggatgac tatgtgaagg 3540
 cactgcccgg gcaactgaag cctttgaga ccctgctgc ccagaaccag ggaggcaaga 3600
 ccttcattgt gggagaccag gtgagcatct ggccccatgc tgtccttc tcgccacct 3660
 ctgctccag atggacacag gtgtgagcca ttgttttagc aaagcagagc agacctaggg 3720

gatgggctta ggccctctgc ccccaattcc tccagcctgc tcccgtggc tgagtccta 3780
 gccccctgc cctgcagatc tcttcgctg actacaacct gctggacttg ctgctgatcc 3840
 atgaggctct agccccctggc tgcttgatg cgltccccct gctctcagca tatgtggggc 3900
 gcctcagtgc ccggcccaag ctcaaggcct tcttggcctc ccctgagtac gtgaacctcc 3960
 ccatcaatgg caacgggaaa cagtgagggg tggggggact ctgagcggga ggcagagttt 4020
 gccttccttt ctccaggacc aataaaattt ctaagagagc tactatgagc actgtgtttc 4080
 ctgggacggg gcttaggggt tctcagcctc gaggtcggg ggagggcaga gcagaggact 4140
 agaaaacagc tctccagca cagtcatggg ctctctggag ccctcagcct ggctgtgttt 4200
 actgaacctc acaaactaga agaggaagaa aaaaaaagag agagagaaac aaagagaaat 4260

<210> 55

<211> 2011

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> B-Actin

10 >gi|28337|emb|Y00474.1|HSACTBPR región flanqueante en 5' del gen de la beta-actina humana, Isla de CpG 1656 a 1955

<400> 55

gagctctgtc tcttggccag ctgaatggag gcccagcggc aacacaggtc ctgcctgggg 60
 atcaggtctg ctctgcaccc caccttgctg cctggagccg cccacctgac aacctctcat 120
 ccctgctctg tagatccggt cccatcccca ctgcccaccc cccccccca gcactccacc 180
 cagttcaacg ttccacgaac cccagaacc agccctcatc aacaggcagc aagaagggcc 240
 ccccgcccat cgccccacaa cgccagccgg gtgaactgta gcgttggcag gtcctgaggc 300
 agctgaaaga tacaaggcca gggacaggac agtcccatcc ccaggaggca gggagltatac 360
 aggcctggga agttgccct tgcgtggggt ggtgatggag gaggctcagc aagtcctctg 420
 gactgtgaac ctgtgtctgc cactgtgtgc tgggtgggtg tcatcttcc caccaggctg 480
 tggcctctgc aaccttcaag ggaggagcag gtcccatlgt ctgagcacag cctgtlacgt 540
 gaactgaaca agcagccctc ttcttgcca caggttccat gtccttatat ggactcatct 600
 ttgcctattg cgacacacac tcaatgaaca cctactacgc gctgcaaaga gccccgcagg 660
 cctgagggtgc cccacctca ccactcttcc tattttctg taaaaatcca gcttctgtc 720

accacclicca aggaggggga ggaggaggaa ggcaggltcc tctaggciga gccgaalgcc 780
 cclctlggt cccacgccac lgalcgcigc algcccacca cctgggtaca cacagltgt 840
 gattcccgga gcagaacgga cctgcccac ccggtctgt gigtactca gtggacagac 900
 ccaaggcaag aaaggggtgac aaggacaggg tcttcccagg ctggcttga gttcctagca 960
 ccgccccgcc cccaatcctc tgtggcacat ggagtcttg tcccagagt ccccagcgg 1020
 cclccagatg gtctgggagg gcagtlcagc tgtggcigcg catagcagac atacaacgga 1080
 cggltggccc agaccaggc tgttagacc cagcccccc gccccgcagt gcctaggta 1140
 cccactaacg cccaggcct ggtctggct gggcgtgact gttaccctca aaagcaggca 1200
 gctccagggt aaaaggigcc ctgccctga gagccactt ccttcccagg gctgcggctg 1260
 ggtaggltt tagcctcat cacgggccac ctccagccac tggaccgtg gccctgccc 1320
 tglctgggg agtgtggcc tgcgactca atggccgca gccacctgac tcccccaaca 1380
 ccacactca ccttcaagc ccaggtctt cctagtac ccaccagca cattagcta 1440
 gctgagcccc acagccagag gtctcaggc cctgcttca gggcagttg tctgaagtcg 1500
 gcaaggggga gtgactgcct ggccactcca tgccttcaa gagtcctt tgcaggagcg 1560
 tacagaacc agggccctg caccgtgca gacctggcc caccacct gggcgctcag 1620
 tgccaagag atgtccacac ctaggatgc ccgcggtgg tggggggccc gagagacggg 1680
 caggccgggg gcaggcctg ccatgcgggg ccgaaccggg cactgcccag cgtggggcgc 1740
 gggggccacg gcgcgcgccc ccagcccccg ggcccagcac cccaaggcgg ccaacgcca 1800
 aactctcct cctccttc ctcaatctc ctctcgctt tttttttt cgcaaaagga 1860
 ggggagaggg ggtaaaaaa tctgcactg tcggcgaagc cgtgagtga gcggcgcggg 1920
 gccaatcgc tgcgccgtc cgaaagtgc ctttatggc tcgagcggcc gcggcgcggc 1980
 cctataaac ccagcggcgc gacgcgccac c 2011

<210> 56

<211> 1792

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

5 <223> >gi|5016088|ref|NM_001101.2| beta-actina de Homo sapiens (ACTB), ARNm

<400> 56

cgcgccgcc ccgcgagcac agagcctcgc cttgccgat ccgccgcccg tccacacccc 60
 ccgccagctc accatggatg atgatalcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gctccggcat 120
 gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc cccccgggcc gcttccct ccatcgtggg 180
 gcgccccagg caccagggcg tgaaggggg catgggtcag aaggattcct atgtgggca 240
 cgaggcccag agcaagagag gcalccac cctgaaglac ccatcgagc acggcatcgt 300
 caccaactgg gacgacatgg agaaaatcgc gcaccacacc ttclacaatg agctgcgtgt 360
 ggctcccgag gagcaccocg tgcgtgcgac cgaggcccc cigaaccca aggccaaccg 420
 cgagaagaig acccagatca tgttgagac ctcaacacc ccagccatgt acgttgctat 480
 ccaggctgtg clatccctgt acgcctcgg ccgtaccact ggcatcgtga tggactccgg 540
 tgacggggc acccacatg tgcctatca cgaggggtat gccclcccc atgcatcct 600
 gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg 660
 cggctacagc ttaccacca cggccgagcg ggaaatcgtg cgtgacatta aggagaagct 720
 gtgctacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctctccct 780
 ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggtcatcacc attggcaatg agcggttccg 840
 ctgcccagag gactcttcc agccttctt cctgggcatg gactcctgtg gcatccacga 900
 aactacctc aactccatca tgaagtgga cgtggacatc cgaaagacc tgtacgcaa 960
 cacagtgtg tctggcgga ccacatga cctggcatt gccgacagga tgcagaagga 1020
 gatcactgcc ctggcaccca gcacaatgaa gatcaagatc atgctctc ctgagcgcaa 1080
 gtactccgtg tggatcgcg gctccatcct ggctcgtg tccacctcc agcagatgtg 1140
 gatcagcaag caggagtatg acgagtcgg cccctccatc gtccaccgca aatgcttca 1200
 ggcggactat gactagtgt cgttacacc ttcttgaca aaacctaaact tgcgcagaaa 1260
 acaagatgag attggcatgg cttatttgt ttttttgt tgttttgt ttttttt 1320
 ttttggctt gactcaggat taaaaactg gaacggtgaa ggtgacagca gtcggttga 1380
 gcgagcatcc ccaaagtc acaatgtggc cgaggacttt gattgcacat tgtgtttt 1440
 ttaatagta ttcaaatat gagatgcatt gtacaggaa gtccctgcc atcctaaaag 1500
 ccacccact tctcttaag gagaatggcc cagtctctc ccaagtcac acaggggagg 1560
 tgalagcatt gcttcgtgt aaattaigta atgcaaaatt ttttaatct tgccttaat 1620

cgcgtccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgccgcccg tccacacccg 60
 ccgccagctc accatggatg atgatalcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gtcctggcat 120
 gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc cccccgggcc gtcttcccct ccatcgtggg 180
 gcgccccagg caccagggcg tgalggggg catgggtcag aaggaticct atgtgggcga 240
 cgaggcccag agcaagagag gcalcctcac cctgaaglac cccatcgagc acggcatcgt 300
 caccaactgg gacgacatgg agaaaatcgt gcaccacacc ttclacaatg agctgcgtgt 360
 ggctcccagag gagcaccccg tgctgtgac cgaggcccc cigaaccca aggccaaccg 420
 cgagaagatg acccagatca tgttgagac cttaacacc ccagccatgt acgttgctat 480
 ccaggctgtg clatccctgt acgcctcgtg ccgtaccact ggcatcgtga tggactccgg 540
 tgacgggggc acccacactg tgcccatcta cgaggggtat gccctcccc atgccatcct 600
 gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg 660
 cggctacagc ttaccacca cggccgagcg ggaaalcgtg cgtgacatta aggagaagct 720
 gtgctacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctcctccct 780
 ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggtcatcacc attggcaatg agcggttccg 840
 ctgcccigag gactcttcc agccttcctt cctgggcatg gagtccctgt gcatccacga 900
 aactacctc aactccatca tgaagtgtga cgtggacatc cgcaaagacc tgtacgcaa 960
 cacagtgtg tctggcgga ccacatgta ccttggcatt gccgacagga tgcagaagga 1020
 gatcactgcc ctggcaccca gcacaatgaa gatcaagatc attgctctc ctgagcgcaa 1080
 glactccgtg tggalcggcg gctccalcct ggctcgtc tccacctcc agcagatgtg 1140
 galcagcaag caggagtatg acgagtcgg cccctccatc gtccaccgca aatgcttcta 1200
 ggcggactat gacttagttg cgttacaccc ttcttgaca aaacctaact tgcgcagaaa 1260
 acaagatgag attggcatgg ctttattgt ttttttgtt ttgtttggg tttttttt 1320
 ttttggctt gactcaggat taaaaactg gaacggtgaa ggtgacagca gtcggttga 1380
 gcgagcatcc ccaaagttc acaatgtggc cgaggacttt gatgcacat tgtgtttt 1440
 ttaatagta ttcaaatat gagatgcatt gttacaggaa gtcccttgc atcctaaaag 1500
 ccacccact tctcttaag gagaatggcc cagtctctc ccaagtcac acaggggagg 1560
 tgalagcatt gcttcgtgt aaattaigta atgcaaaatt ttttaatct lgccttaat 1620

actttttat ttgttttat ttgaaatgat gagccttcgt gccccccctt ccccttttt 1680
 gtcccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggctccctt gggaglgggg ggaggcagcc 1740
 agggcttacc tgtacactga ctgagacca gttgaataaa agtgcacacc tt 1792

<210> 57

<211> 2762

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RARB2

10 >gi|14916495|ref|NM_016152.2| receptor beta del ácido retinoico de Homo sapiens, (RARB), variante de transcripción 2, ARNm

<400> 57

gtgacagaag tagtaggaag tgagctgttc agaggcagga gggctattc ttgccaaag 60
 gggggaccag aattcccat gcgagctgtt tgaggactgg gatgccgaga acgcgagcga 120
 tccgagcagg gtttgtctgg gcaccgtcgg ggtaggatcc ggaacgcatt cggaaggctt 180
 ttgcaagca ttacttgga aggagaactt gggatcttc tgggaacccc ccgccccggc 240
 tggattggcc gagcaagcct ggaaaatgca attgaaacac agagcaccag ctctgaggaa 300
 ctctgccaa gcccccatc tccacttct cccctctgag tglacaaacc ctgcttcgtc 360
 tgccaggaca aatcatcagg gtaccactat ggggtcagcg cctgtgaggg atgtaagggc 420
 ttttccgca gaagtattca gaagaalatg attacactt gtcaccgaga taagaactgt 480
 gttattaata aagtcaccag gaatcgaigc caatactgtc gacccagaa gtgcttgaa 540
 gtgggaatgt ccaaagaatc tgcaggaat gacaggaaca agaaaaagaa ggagacttcg 600
 aagcaagaat gcacagagag ctatgaaatg acagctgagt tggacgatct cacagagaag 660
 atccgaaaag ctaccagga aactttccct tcactctgcc agctgggtaa atacaccacg 720
 aattccagt ctgaccatcg agtccgactg gacctgggcc tctgggacaa attcagtga 780
 ctggccacca agtgcattat taagatcgtg gagtttgcta aacgtctgcc tggtttact 840
 ggcttgacca tgcagacca aattaccctg ctgaaggccg cctgccctga catcctgatt 900
 cttagaattt gcaccaggta taccacagaa caagacacca tgactttctc agacggcctt 960
 accctaaatc gaactcagat gcacaatgct ggatttggtc ctctgactga ccttgtgttc 1020
 accttgcca accagctcct gccttggaa atggatgaca cagaaacagg ccttctcagt 1080

gccatctgct taatctgtgg agaccgccag gacctgagg aaccgacaaa aglagalaag 1140
 ctacaagaac callgctgga agcactaaaa atttatalca gaaaaagacg acccagcaag 1200
 cctcacatgt ttcaaagat cttaatgaaa atcacagatc tccgtagcat cagtgcctaaa 1260
 ggtgcagagc gtgtaattac ctgaaaaag gaaattccg gatcaatgcc acctctcatt 1320
 caagaaatgc tggagaattc tgaaggacat gaacccctga cccaagttc aagtgggaac 1380
 acagcagagc acagtcctag catctcacc agctcagtgg aaaacagtgg ggtcagtcag 1440
 tcaccactcg tgcaataaga cattttctag ctacttcaaa cattccccag taccttcagt 1500
 tccaggattt aaaatgcaag aaaaaacatt ttactgctg cttagtttt ggactgaaaa 1560
 gatattaaaa ctcaagaagg accaagaagt ttcalatgt atcaatalat atactcctca 1620
 ctgtgtaact tacctagaaa tacaacatt tccaatttta aaaaatcagc cattlcatgc 1680
 aaccagaaac tagttaaag ctctatttt cctcttgaa cactcaagal gcatggcaaa 1740
 gaccagtc aaatgattta cccctggta agttctgaa gactttgtac atacagaagt 1800
 alggctcgt tcttctata ctgtatgtt ggtgcttcc ttgtcttg catactcaaa 1860
 ataaccatga caccaagggt atgaaataga ctactgtaca cgtctaccta ggttcaaaaa 1920
 gataactgtc ttgcttcat ggaatagica agacatcaag glaaggaaac aggactattg 1980
 acaggactat tgtacagtat gacaagataa ggctgaagat attctacttt agltaglatg 2040
 gaagctgtc ttgtcttt ctgatgctt caaactgcat ctttatttc atgtgcca 2100
 gtaaaagtat acaaattccc tgcactagca gaagagaatt ctglatcagt gtaactgcca 2160
 gttcagttaa lcaaatgca ttgttcaat tgttaatgtc actttaaat aaaagtgggt 2220
 tattactgt ttaatgacat aactacacag ttagtlaaaa aaaattttt tacagtaatg 2280
 atagcctcca aggcagaaac acttttcagt gtaagtttt tgttacttg ttacaagcc 2340
 attaggga aa ttcatggga taattagcag gctggtctac cactggacca tgaactcta 2400
 gtgtccctcc tgattcatgc ctgalattgg gatttttt cagcccttct tgalccaag 2460
 ggctaattat attacatccc aaagaaacag gcatagaatc tgccctctt gacctgttc 2520
 aatcactatg aagcagagtg aaagctgtg tagagtgggt aacagatata agtgcagtt 2580
 tcttagttct catttaagca ctactggaat tttttttt gatatttag caagtcgtg 2640
 atgtacttic actggctcgt ttgtacatt gagattgtt gttaacaat gcttctatg 2700
 ttcatatact gttaccctt ttccatggac tctcctggca aagaataaaa tatatttatt 2760

tt

2762

<210> 58

<211> 5487

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> TIMP3

10 >gi|21536431|ref|NM_000362.3| inhibidor tisular de la metaloproteinasa 3 de Homo sapiens (distrofia pseudoinflamatoria del fondo de Sorsby,) (TIMP3), ARNm

<400> 58

tctgtcgact tgccccagag ctgaccttg tctttgccca ctctcagcg aggalggcac 60
 ttcagggagc ccttccctta ctatcgaga gagagcaggc cctccccagt catgtccaac 120
 ccagaactct gttttgttt ctcatagcc ctagcatcac agaaaatcac cctgtgcatt 180
 catggatgc cacgggggca agggctttgt gttgcttaac ccagcatcct gaaccgtgtt 240
 tgttgaatga atacagaacc ccgtttgctc tgggagagca cagaaaacag tcttclalca 300
 tatatcatag ccagctgcaa acagcagatg gcttccata tcccagagag taagaaccag 360
 agagagagag aaagagagag agtttgggic ttctcctct gtgcctgctc tctccagaga 420
 aactggaggg glagcagtta gcattcccc gctggttcca ccaagcacag tcaaggctc 480
 taggacatgg ccacccctca cctgtggaag cggctctgct ggggtgggtg ggtgttagtt 540
 ggttctggtt tgggtcagag acaccagtg gccaggttg gcgtggggcc agggcgagca 600
 cgagaagggg cacgagggct ccgctccgag gaccagcgg caagcaccgg tccggggcg 660
 gccccagccc acccactcgc gtgccacgg cggcattatt ccctataagg atctgaacga 720
 tccggggggcg gccccgccc gtlaccctt gccccggcc ccgccccctt ttggagggc 780
 cgatgaggtat atgcggctct gccattggtc tgagggggcg ggcccaaca gcccgaggcg 840
 ggggtccccgg gggcccagcg ctatatcact cggccgccc ggcagcggcg cagagcggcg 900
 agcaggcagg cggcggggcg tcagacggct tctctcctc ctctgctcc tccagctcct 960
 gctcctcgc cgggaggccg cccgccgag cctgcgccag cgccgaggca gcctcgctgc 1020
 gccccatccc glcccggcg gcactcggag ggcagcgcgc cggaggccaa ggttggcccc 1080
 cacggccccg cgggcgagcg agctcgggct gcagcagccc cgccggcggc gcgcacggca 1140

acattggaga ggcgagcagc agccccggca gcggcggcag cagcggcaat gaccccttgg 1200
 clcgggctca lcgltcctt gggcagcttg agcctggggg actggggcgc cgaggcgtgc 1260
 acatgctgc ccagccaccc ccaggacgcc ttctgcaact ccgacatcgt gatccgggcc 1320
 aagggtggg ggaagaagct ggtaaaggag gggcccttcg gcacgttgt ctacaccatc 1380
 aagcagaiga agatgtaccg aggcctcacc aagatgcccc atgtgcagta catccacacg 1440
 gaagcttcg agagtcttg tggccttaag ctggagggtca acaagtacca gtacctgtg 1500
 acaggctcg tctatgatg caagatgtac acggggctgt gcaacttcgt ggagagggtg 1560
 gaccagctca cctctccca gcgcaagggg ctgaactatc ggtatcacct gggttgtaac 1620
 tgcaagatca agtctgtca ctacctgcct tgccttga cttcaagaa cgagtgtc 1680
 tggaccgaca tgcctccaa ttctgggtac cctggctacc agtccaaaca ctacgcctgc 1740
 atccggcaga agggcggcta ctgcagctg taccgaggat gggccccccc ggataaaagc 1800
 alcatcaatg ccacagaccc ctgagcgcca gacccgtccc cacctcactt cctcccttc 1860
 ccgtgagct tccctggac actaactctt ccagatgat gacaatgaa ttagtgctg 1920
 ttcttgca aatttagcac ttgaacatt taaagaaagg tctatgctgt catatgggt 1980
 ttattggaa ctatcctct ggccccaccc tggccctct tttggttt gacatcttc 2040
 attccacct ggaattctt ggtgccatgc cagaaagaat gaggaacctg tatctctt 2100
 ctctgata atataatct ttttttta ggaaaacaaa aatgaaaaac tactccatt 2160
 gaggattga attccaccc ctctgctt tccccacct caccatctcc cagacctct 2220
 tcccttgcc ctctcctcc aatacataaa ggacacagac aaggaacttg ctgaaaggcc 2280
 aaccattca ggalcagta aaggcagcaa gcagatagac tcaagggtg tgaaagatgt 2340
 tatacaccag gagctgccac tgcattccc aaccagactg tctgtctg tctgtcatg 2400
 taagagtga ggagggaagg aaggaactac aagagagtcg gagatgatgc agcacacaca 2460
 caattccca gccagtgat gctgtgtg accagatgtt cctgagtcg gagcaagcac 2520
 ccaggccaga ataacagagc ttcttagt ggtgaagact taaacatct cctgaggta 2580
 ggaggcaatt tgcctgcct glacaaaagc tcagggtgaaa gactgagatg aatgtcttc 2640
 ctctccctgc ctccaccag acttctctt ggaaaacgct ttgtagatt tggccaggag 2700
 cttcttta tgaaattgg ataaatacac acaccataca ctatccacag atagacca 2760
 glagattgg gtagaggata ctattccag aatagtgtt agctcaccta gggggatag 2820

ttgtatata catttgata taccacata gggacataag ctaattttt tacaggacac 2880
 agaattctgt tcaatgctgt taaalatgcc aalatgttaa tctctctat ttgtgtcg 2940
 ttgctgttt gaagaaaaatc atgacattcc aagttagacat ttttttca llllaaltaa 3000
 aattgaaat tctgaacacc gtcagcacc tctctccct atcatgggtc atcgacccc 3060
 tgccgtctc ctgtccctg ctcatgttt gggggccttt cttaactgc ctctggct 3120
 tagctcagat ggcagatgag agttagtca agggcctggg cacaggaggg agagctgcag 3180
 agtgtctgc ctgcctggc tggagggaca cctctcctgg gtgtggagac agcttggtc 3240
 ccttcccta gctccctggg ggtgaatgc cactcctga gatcctcacc tcttgaatt 3300
 aaaattgtg gtcactggg aaagcctgag ttgcaacca gtgtagggt ttctgtgtg 3360
 tttttttt ttttttga ataaaactat aatataaatt ctctaltaa ataaaattat 3420
 ttaagtltt agtgcacaaa gtgagatgct gagagtaggt gataatgtat atttacaga 3480
 gtgggggtg gcaggatggt gacattgaac atgattgctc tctgtcttt tttcagctt 3540
 atgggtatt atctctatt agtatttga tcttcagtc attccactt aggaacaga 3600
 gctgccaatt gaaacagaag aagaaaaaaa aaaaagcag cagacaacac acttagagt 3660
 ctgcacaca cacaagtgc caggcaaggt gcttggcaga accgcagagt gggaagagag 3720
 taccggcatc gggtttctt gggatcaatt tcattaccgt gtaccttcc cattgtggtc 3780
 atgccattg gcagggggag aatgggaggc ttggccttct ttgtaggca gtgtgagcag 3840
 aagctgatgc cagcatgca ctggtttga agggatgagc ccagactga tgtttggga 3900
 ttgtcttat ttaacctca aggtctgca tgggtgggccc cctgaccaac ctacacaagt 3960
 tccctccac aagtggacat cagtgtctc tctgtaggc atctggcat tgcactccc 4020
 tgggtgggc agcctctc acacaaggag gaactgggt gaaggctgag tgtaggcac 4080
 ctgaagttc cctgcggagt cgataaatta gcagaaccac atccccatct gttaggcctt 4140
 ggtgaggagg ccctgggcaa agaagggct tctgcaaagc gatgtcagag ggcggtttg 4200
 agcttctat aagctatagc ttgttatt tcacccgtc acttactga taattaaaa 4260
 tcattatgt agctgagaca ctctgtatt tcaatcatat catgaacatt ttatttgct 4320
 aaatctgtg tcatgttag gctgtaalat gtgtacattg tgttaagag aaaaatgaaa 4380
 cccacatgcc gccatttcc tgaatcaaat tctgcagtg aatggagagg aaaatactc 4440
 taggcaagca gctagactg tgaattggg gaaatagaag gaactagtaa ctgagactcc 4500

tccagcctcc tccctattgg aatcccaatg gctccctggag taggaaaaaa gtttaaacta 4560
 caitcatgtt ctgttctgt gtcactcggc cctgggtagt ctaccattta cttcacccca 4620
 agtccctgctg cccalccagt tgggaagcca tgattttcct aagaatccag ggccatggga 4680
 galacaattc caagtctcgt ctctctcctt tgggcatctc ttctgcctcc caatcaagga 4740
 agtccatgc tcaggctctc agctctcggg ccagtgctct gctctgtcca gggtaggtaa 4800
 tactgggaga ctctgtctt ttaccctccc ctggtccag acctgcctca tggtggaac 4860
 atggttcttg aacaattaaa gaaacaaatg actttttgga atagccctgt clagggcaaa 4920
 ctgtggcccc caggagacac tacccttcca tgcctcagac ctctgtcttg catgtgaaa 4980
 ttgacaatct ggactacccc aagatggcac ccaagtggtt ggcttctggc tacctaaggt 5040
 taacatgta ctagaglatt ttatgagag acaaacatta taaaaatctg atggcaaaag 5100
 caaaacaaaa tggaaagtag gggagggtga tgtgacaaca acttccaaat tggctctttg 5160
 gaggcgagag gaaggggaga acttgagaga tagttttgc ttgggggta gaggttctt 5220
 agattctccc agcatccgcc ttcccttta gccagctcgc tgcctgaaa cccagaagtg 5280
 atggagagaa accaacaaga gatctgaac cctgtctaga aggaatgtat ttgttgctaa 5340
 atttcgtagc actgttaca gtttccctcc atgtattta tgaatttat attccgtgaa 5400
 tgtatattgt ctgtaatgt tgcataatgt tcactttta tagtgtgcc ttattctaa 5460
 acagtaaagt ggtttattt ctatcac 5487

<210> 59

<211> 866

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10

<223> APC

>gi|551463|gb|U02509.1|HSU02509 Gen de la poliposis adenomatosa del colon humano (APC), secuencia del promotor

<220>

<221> misc_feature

<222> (315)..(315)

<223> n es a, c, g, o t

5

<400> 59

acttatatat ctgacagttg attgtcctc accictaaat tgggaatttaa gcatcacctg 60

gttcgattta atgcaatgia gaatttgcac taaaatacta caltaaagcc tcagatttgt 120

aglagctaac agcacttcta tgtatgtgtc agggactgct claaatactt calatatatt 180

aactcctcta ttctgtactt cgttcccggt ttatacagc aggaaattga aacactgaga 240

ggtaagtaa ctaaagttac agagctagag tgacaggagc aaagcttcaa ctcaggcaac 300

ccagacgtcc agagnictga tctccactac taagctgcta gcatagcttt tctgglaact 360

attttaatt caatataatt cgaatgatct atctaacaag tcalcactct gacaactcag 420

tgacttgtaa tglaaaatta ttcatgttaa ttactttaat attattgttt ctctgtgtg 480

caaaaalcat agcaatcgag atglaattta ttactctccc tcccacctcc ggcacttgtt 540

gctaactcct ctgccctgcg gacctcccc gactctttac tatgcgtgtc aactgccatc 600

aacttccttg ctgtctgggg actggggccg tgagggcata ccccgaggg gtacggggct 660

agggctaggc aggtctgtcg gttgggcggg gccctgtgcc cactgtcgga gtgcgggtcg 720

ggaagcggag agagaagcag ctgtgtaac cgctggatgc ggaccagggc gctccccatt 780

cccgtcggga gcccgccgat tggctgggtg tgggcgcacg tgaccgacat gtggctgtat 840

tggtcagacc cgccaggggtg tcatctg 866

<210> 60

10

<211> 10386

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> >gi|21626462|ref|NM_000038.2| Poloposis adenomatosa del colon de Homo sapiens (APC), ARNm

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (9521)..(9521)

<223> n es a, c, g, o t

10 <400> 60

atlgaggact cggaaalgag gtccaagggt agccaaggat ggctgcagct tcatatgac 60
agltgttaaa gcaagltgag gcactgaaga tggagaactc aaatcttcga caagagctag 120
aagataaltc caatcatctt acaaaactgg aaactgaggc atctaataatg aaggaagtac 180
ttaaacaact acaaggaagt attgaagatg aagctatggc ttcttctgga cagattgatt 240
tattagagcg tcttaaagag ctaacttag atagcagtaa ttccctgga glaaaactgc 300

ggicaaaaat gtcctccgt tctatggaa gccgggaagg atctgtatca agccgttctg 360
 gagagtgcag tctgttct atgggttcat ttccaagaag agggtttgta aatggaagca 420
 gagaaaglac tggatatta gaagaacttg agaaagagag gtcattgctt ctgtctgac 480
 ttgacaaaga agaaaaggaa aaagactggg attacgtca acttcagaat ctactaaaa 540
 gaatagatag tcttcttta actgaaaatt ttctttaca aacagatatg accagaaggc 600
 aattggaata tgaagcaagg caaatcagag ttgcgatgga agaacaacta ggtacctgcc 660
 aggatatgga aaaacgagca cagcgaagaa tagccagaat tcagcaaact gaaaaggaca 720
 tacttctat acgacagctt ttacagtccc aagcaacaga agcagagagg tcalctcaga 780
 acaagcatga aaccggctca catgatgctg agcggcagaa tgaaggltca ggagtgggag 840
 aatcaacat ggcaacttct ggtaatggc agggttcaac tacacgaatg gacctgaaa 900
 cagccagtg ttgagttct agtagcacac actctgcacc tgaaggctg acaagtcac 960
 tgggaaccaa ggtggaaatg gtgtattcat tgtgtcaat gcttggtact catgataagg 1020
 atgatatgc gcgaacttg ctagtatgt ctagtccca agacagctgt atatccatgc 1080
 gacagtctgg atgttctt ctctcatcc agctttaca tggcaatgac aaagactctg 1140
 tattgttgg aaattcccgg ggcagtaaag aggtcgggc cagggccagt gcagcactcc 1200
 acaacatcat tcatcacag cctgatgaca agagaggcag gcgtgaaac cgagtcctt 1260
 atctttgga acagatacgc gcttactgtg aaacctgtg ggagtggcag gaagctcatg 1320
 aaccaggcat ggaccaggac aaaaatccaa tgccagctcc tgtgaacat cagatctgtc 1380
 ctgtctgtg tgttctaag aaactttcat ttgatgaaga gcatagacat gcaatgaatg 1440
 aactagggg actacaggcc atgcagaat tattgcaagt ggactgtgaa atgtacgggc 1500
 ttactaatga ccactacagt attacactaa gacgatatgc tggaaatggct ttgacaaact 1560
 tgacttttg agatlagcc aacaaggcta cgctatgtc talgaaaggc tcatgagag 1620
 cacttgtgc ccaactaaaa tctgaaagt aagacttaca gcaggttatt gcaagtgtt 1680
 tgaggaatt gtctggcga gcagatgtaa ataglaaaaa gacgttgcga gaagtggaa 1740
 gtgtgaaagc atgatggaa tgtgcttag aagttaaaaa ggaalcaacc ctcaaagcg 1800
 latlgagtgc ctatggaat ttgtcagcac atgcactga gaataaagct gatatatgtg 1860
 ctgtatagg tgcactgca ttttggttg gcactctac ttaccggagc cagacaaaca 1920
 ctttagccat tattgaaagt ggagggtgga tattacggaa tgtgtccagc ttgatagcta 1980

caaatgagga ccacaggcaa atcctaagag agaacaactg tctacaaact ttattacaac 2040
 acttaaaatc tcatagttg acaatagica gtaatgcatg tggaacttg tggaalctct 2100
 cagcaagaaa tcctaaagac caggaagcat tatgggacat gggggcagtt agcatgctca 2160
 agaacctcat tcatcaaag cacaaaatga ttgctatggg aagtgcigca gcttlaagga 2220
 atctcatggc aaataggcct gcgaagtaca aggatgccaa tattatgtct cctggcctaa 2280
 gcttgccatc tcttcatgtt aggaaacaaa aagccctaga agcagaatta gatgctcagc 2340
 acttatcaga aactttgac aatatagaca atttaagtc caaggcatct catcgtagta 2400
 agcagagaca caagcaaagt ctctatggg attatgttt tgacaccaat cgacatgatg 2460
 ataataggic agacaatttt aatactggca acatgactgt ccttcacca tattgaata 2520
 ctacagtgtt acccagctcc tctcatcaa gaggaagctt agatagtct cgttctgaaa 2580
 aagatagaag ttggagaga gaacgcggaa ttggtctagg caactacat ccagcaacag 2640
 aaaatccagg aacttctca aagcgaggtt tgcagatct caccactgca gccagattg 2700
 ccaaagtc at ggaagaagtg tcagccatc atacctctca ggaagacaga agttctgggt 2760
 ctaccactga attacattgt gtgacagatg agagaaatgc acttagaaga agctctgctg 2820
 cccatacaca tcaaacact tacaattca ctaagtcgga aaattcaaat aggacatgtt 2880
 ctatgcctta tgccaaatta gaatacaaga gatcttcaaa tgatagtta aatagtgta 2940
 glagtagtga tggttatgtt aaaagagggtc aaatgaaacc ctcgattgaa tcctattctg 3000
 aagatgatga aagtaagttt tgcatgtatg gtcaatacc agccgacctg gcccalaaaa 3060
 tacatagtgc aaatcatatg gatgataatg atggagaact agatacacca ataaattata 3120
 gtcttaataa tcagatgag cagttgaact ctggaaggca aagtcctca cagaatgaaa 3180
 galgggcaag acccaaacac ataatagaag atgaaataaa acaaagtga caaagacaat 3240
 caaggaatca aagtacaact tatctgttt atactgagag cactgatgat aaacacctca 3300
 agttccaacc acatttggga cagcaggaat gtgttctcc atacaggta cggggagcca 3360
 atgggtcaga aacaaatcga gtgggttcta atcatggaat taatcaaaaat gtaagccagt 3420
 ctttgtgta agaagatgac tatgaagatg ataagcctac caattatagt gaacgttact 3480
 ctgaagaaga acagcatgaa gaagaagaga gaccaacaaa ttatagcata aaatataatg 3540
 aagagaaacg tcatgtggat cagcctattg attatagttt aaaatatgcc acagatattc 3600
 ctctatcaca gaaacagtca ttctattct caaagagttc atctggacaa agcagtaaaa 3660

ccgaacalat glcttcaagc agtgagaata cgtccacacc ttcatctaal gccaagaggc 3720
 agaalcagct ccatccaagt tctgcacaga gtagaagtg ttagccitcaa aaggctgcca 3780
 ctgtcaaagt ttctctatt aaccaagaaa caatacagac ttattgtgta gaagatactc 3840
 caataigtt ttcaagatgt agttcattat catcttgtc atcagctgaa gatgaaatag 3900
 gatgtaatca gacgacacag gaagcagatt ctgctaatac cctgcaaata gcagaaataa 3960
 aagaaaagat tggaactagg ttagctgaag atcctgtgag cgaagttcca gcagtgctac 4020
 agcaccctag aaccaaattc agcagactgc agggttctag ttatcttca gaatcagcca 4080
 ggcacaaaagc tgtgaattt tcttcaggag cgaatctcc ctcaaaaagt ggtgctcaga 4140
 caccacaaaag tccactgaa cactatgtc aggagacccc actcatgitt agcagatgta 4200
 ctctgtcag ttacttgat agtttgaga gtcgttcgat tgccagctcc gttcagagt 4260
 aacctgcag tggaatggta agtggcatta taagccccag tgatcttcca gatagccctg 4320
 gacaaacct gccaccaagc agaagtaaaa cactccacc acctctcaa acagctcaaa 4380
 ccaagcgaga agtacctaaa aataaagcac ctactgtga aaagagagag agtggacct 4440
 agcaagctgc agtaaatgt gcagttcaga gggctcagg tcttcagat gctgatactt 4500
 tattacatt tgccacggaa agtactccag atggatttc ttgtcatcc agctgagt 4560
 ctctgagcct cgatgagcca ttatacaga aagatgtga attaagaata atgcctccag 4620
 tttaggaaaa tgacaatggg aatgaaacag aatcagagca gcctaaagaa tcaaatgaaa 4680
 accaagagaa agaggcagaa aaaactattg attctgaaaa ggacctatta gatgattcag 4740
 atgatgatga tattgaaata ctagaagaat glattattc tgccatgcca acaaagtcat 4800
 cactgaaagc aaaaaagcca gccagactg ctcaaaaatt acctccacct gtggcaagga 4860
 aaccaagtca gctgcctgtg tacaacttc taccatcaca aaacaggttg caaccccaaa 4920
 agcatgttag ttctacacc ggggatgata tgccacgggt gtattgtgt gaaggacac 4980
 ctataaact ttccacagct acatctctaa gtgatctaac aatcgaatcc cctccaatg 5040
 agttagctgc tggagaagga gttagaggag gagcacagtc aggtgaattt gaaaaacgag 5100
 ataccattcc tacagaaggc agaagtacag atgaggctca aggaggaaaa acctcatctg 5160
 taaccatacc tgaattgat gacaataaag cagaggaagg tgatattct gcagaatgca 5220
 ttaattctgc tatgcccataa gggaaaagtc acaagcctt ccgtgtgaaa aagataatgg 5280
 accaggctca gcaagcatct gcgtctctt ctgcacccaa caaaaatcag tttagtgga 5340

agaaaaagaa accaacttca ccagtaaaac ctataccaca aaatactgaa lataggacac 5400
 glglaagaaa aaatgcagac tcaaaaaata atttaaalgc lgagagagtt ttctcagaca 5460
 acaaagattc aaagaaacag aatttgaaaa ataattccaa ggacttcaat galaagctcc 5520
 caaataatga agatagagtc agaggaagtt ttgcttttga ttcacctcat cattacacgc 5580
 clattgaagg aactccttac tglttttcac gaaatgattc ttgagttct clagattttg 5640
 algalgalga tgttgacctt tccaggggaaa aggctgaatt aagaaaggca aaagaaaata 5700
 aggaalcaga ggctaaagtt accagccaca cagaacaaac ctccaaccaa caatcagcta 5760
 ataagacaca agctatttga aagcagccaa laaatcgagg tcagcctaaa cccatacttc 5820
 agaaacaatc cacttttccc cagtcattca aagacatacc agacagaggg gcagcaactg 5880
 atgaaaagtt acagaatttt gctattgaaa atactccagt ttgcttttct cataattcct 5940
 ctctgagttc tctcagtgac attgaccaag aaaacaacaa taaagaaaat gaacctatca 6000
 aagagactga gccccctgac tcacagggag aaccaagtaa acctcaagca tcaggctatg 6060
 ctctaaatc atttcaigtg gaagataccc cagtttggtt ctcaagaaac agttctctca 6120
 gttctcttag tattgactct gaagatgacc tgttgacgga atgtataagc tccgcaatgc 6180
 caaaaaagaa aaagccttca agactcaagg gtgataatga aaaacatagt cccagaaata 6240
 tgggtggcat attaggtgaa galctgacac ttgatttgaa agatatacag agaccagatt 6300
 cagaacatgg tctatcccct gattcagaaa attttgattg gaaagctatt caggaagggtg 6360
 caaattccat agtaagtagt ttacatcaag ctgctgctgc tgcattttta tctagacaag 6420
 cttcgtctga ttcagattcc atcctttccc tgaaatcagg aatctctctg ggalcaccat 6480
 ttcatcttac acctgatcaa gaagaaaaac cctttacaag taataaaggc ccacgaattc 6540
 taaaaccagg ggagaaaagt acattggaaa ctaaaaagat agaattcgaa agtaaaggaa 6600
 tcaaaggagg aaaaaaagtt tataaaagtt tgattactgg aaaagttcga tclaattcag 6660
 aaatttcagg ccaaataaaa cagccccttc aagcaaacat gccttcaatc tctcagggca 6720
 ggacaatgat tcatattcca ggagttcgaa atagctcctc aagtacaagt cctgtttcta 6780
 aaaaaggccc accccttaag atccagcct ccaaaaggccc tagtgaaggt caaacagcca 6840
 ccacttctcc tagaggagcc aagccatctg tgaaatcaga attaaagcct gttgccaggc 6900
 agacatccca aatagggtgg tcaagtaaag cacttcttag atcaggatct agagattcga 6960
 ccccttcaag acctgcccag caaccattaa gtagacctat acagtctcct ggccgaaact 7020

caatticccc tggtagaaat ggaataagtc cccctaacaa attatctcaa ctccaagga 7080
 catcatcccc tagtactgct tcaactaagt cctcagggtc tggaaaaatg tcatatacat 7140
 ctccaggtag acagatgagc caacagaacc ttaccaacaa aacagggtta tccaagaatg 7200
 ccagtagtat tccaagaagt gagctgcct ccaaaggact aaatcagatg aataatggta 7260
 atggagccaa taaaaaggta gaactttcta gaatgtcttc aactaaatca agtggaagtg 7320
 aatctgatag atcagaaaga cctgtattag tacgccagtc aactttcatc aaagaagctc 7380
 caagcccaac cttaagaaga aaattggagg aatctgcttc attigaatct ctttcccat 7440
 catctagacc agctticccc actaggctcc aggcacaaac tccagtttta agtccttccc 7500
 ttctgatat gtctctatcc acacatttgt ctgttcaggc tggtagatgg cgaaaactcc 7560
 cacctaattc cagtcctact atagagtata atgatggaag accagcaaag cgccatgata 7620
 ttgcacggtc tcattctgaa agtccttcta gacttccaat caataggica ggaacctgga 7680
 aacgtgagca cagcaaacat tcatcatccc ttctcgagt aagcacttg agaagaactg 7740
 gaagttcatc tcaattctt tctgttcat cagaatccag tgaaaaagca aaaagtgagg 7800
 atgaaaaaca tgtgaactct attcaggaa ccaaacaag taaagaaaac caagtatccg 7860
 caaaaggaa atggagaaaa ataaaagaaa atgaatttc tcccacaaat agtacttctc 7920
 agaccgttc ctcagggtgt acaaatggg ctgaatcaaa gactctaatt tatcaaatgg 7980
 cacctgtctt ttctaaaaca gaggatgtt gggtagaat tgaggactgt cccattaaca 8040
 atcctagatc tggaagatct cccacaggta atactcccc ggtgattgac agtgtttcag 8100
 aaaaggcaaa tccaaacatt aaagattcaa aagataatca ggcaaaacaa aatgtgggta 8160
 atggcagtg tccatgctg accgtgggtt tggaaaatcg cctgaactcc ttattcagg 8220
 tggatgcccc tgacaaaaa ggaactgaga taaaaccagg aaaaaataat cctgtccctg 8280
 tatcagagac taatgaaagt tctatagtgg aacgtacccc attcagttct agcagctcaa 8340
 gcaaacacag ttacctagt gggactgtg ctgccagagt gactccttt aattacaacc 8400
 caagccctag gaaaagcagc gcagalagca cticagctcg gccatctcag atcccaactc 8460
 cagtgaataa caacacaaag aagcgagatt ccaaaactga cagcacagaa tccagtggaa 8520
 cccaaagtcc taagcgccat tctgggtctt acctgtgac atctgttaa aagagaggaa 8580
 gaatgaaact aagaaaattc tatgttaatt acaactgcta tatagacatt ttgttcaaa 8640
 tgaaacttta aaagactgaa aaatttgta aalagggttg attctgtta gaggggtttt 8700

gttctggaag ccatattlga tagtalactt tgtcttact ggtcttatt tgggaggcac 8760
 tcttgatggt taggaaaaaa ataglaaagc caaglatgtt tgtacaglat gttttacatg 8820
 tatltaaagt agcatcccat cccaacttcc ttaattatt gcttgictta aaataatgaa 8880
 cactacagat agaaaatag atalattgct gttatcaatc atttctagat tataaaciga 8940
 claaacttac atcaggggaaa aattggatatt tatgcaaaaa aaaatgtttt tgccttctg 9000
 agtccatcta acatcataat taalcatgtg gctgtgaaat tcacagtaat atgggtcccg 9060
 atgaacaagc ttaccaccagc ctgtttgctt tactgcatga algaaactga tgggtcaatt 9120
 tcagaagtaa tgattaacag ttatgtggtc acatgatgtg calagagata gctacagtgt 9180
 aataatttac actattttgt gctccaaaca aaacaaaaat ctgtgtaact gtaaaacatt 9240
 gaatgaaact attttacctg aactagattt tatctgaaag taggtagaat ttttctatg 9300
 ctgtaatttg ttgtatattc tggatattga ggtgagatgg ctgctctttt attaatgaga 9360
 calgaattgt gttcaacag aaactaaatg aacatttcag aataaattat tgcgtatgt 9420
 aaactgttac tgaaattggt attgtttga agggctctgt ttacatttg tattaataat 9480
 tgtttaaaat gcctctttta aaagcttata taaattttt ncttcagctt ctatgcatta 9540
 agagtaaaat tctcttact gtaataaaaa caattgaaga agactgttc cacitacca 9600
 ttccatgcgt tggcacttat ctattcciga aattctttta tgtgattagc tcatctgat 9660
 tttaacatt ttccactta aactttttt tcttactcca ctggagctca gtaaaagtaa 9720
 attcatgtaa tagcaatgca agcagcctag cacagactaa gcattgagca taataggccc 9780
 acataatttc cttttctta atattataga aattctgtac ttgaaattga ttcttagaca 9840
 ttgcagtcic ttgaggctt tacagtgtaa actgtcttgc ccttcaict tctgttgca 9900
 actgggtctg acatgaacac ttttatcac cctgtatgtt agggcaagat ctacagcagt 9960
 aagtataatc agcactttgc catgctcaga aaattcaaat cacatggaac tttagaggta 10020
 gattaatac gattaagata ttcagaagta tattttagaa tccctgcctg ttaaggaaac 10080
 ttattttgtg gtaggtacag ttctggggta catgttaagt gtccccctat acagtggagg 10140
 gaagtctcc ttctgaagg aaaataaact gacacttatt aactaagata atttacttaa 10200
 tatatctcc ctgatttgtt taaaagatc agaggggtgac tgatgataca tgcatacata 10260
 ttgttgaat aaatgaaaat ttatttttag tgataagatt catacacict gtattgggg 10320
 agagaaaacc tttaagca tgggtggggca ctacagatagg agtgaataca cctacctggt 10380

ggtcat

10386

<210> 61

<211> 7273

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> PTGS2

10 >gi|3282785|gb|AF044206.1| gen de la ciclooxigenasa de Homo sapiens (COX-2), promotor y exón 1

<400> 61

ggtacccagg ctggagtgca ctgggtgat catagctcac taacctcgaa ctctgggct 60
 taggcaatcc tctgccttg gcctcccaaa gtgccaggat tacaggcatg agccaccaca 120
 gtggagctct caattcigt actaataatt tgtgtcttct cttttttcc ttgacctgac 180
 tagagtaatt aactttaigt cttttaaag aaccacctt ttggttttac ccattttct 240
 tttgatttt ctgttttga ttgattgat atctactcta atttttatt attcttttc 300
 ctctgtttac ttgaattta attactttc tttttgtag tctcctaaaa tagaagctta 360
 tattattgat tttagatctt tctctttc tattacagca ctcaatgcta taaatttccc 420
 tctaagcatt gctttactg catctacaa tatttcaact ctattgttat ttgctcaaa 480
 agaggttctt aatttctatt gggatttctc ttgacccat gtgtattca gaagtgttcc 540
 gtgtgactc caaatattg ggagttttc agctatctt ctattaatca ttcttgttt 600
 aattctattg tggcctgaga gcataattg tatgattat attcttgtaa atgtgttaag 660
 gtgtgtctta tgggtcagaa tgcggtttat ctgtctatat gttccttaga gaalaatgta 720
 tgtctgctg ttattggala aagtagtcta tagatgtcag ttacatctcg ttgattaatg 780
 gtgctgtga gttcagctat gtcctaaatg atttctgtc tgcgtatct gtctatttct 840
 gacacaaggc tgtgaagtc tccaaccata alaaatgaatt aatctatttt tcttgcagt 900
 ttatcaatt ttgtcttata tatattgatg ctccattgt ttgcacatac acattaagaa 960
 ttgtatgtc ttctggaga atttacctt ccataacatg taacatttcc cttatttct 1020
 gataatttt ctgtcctaaa agtttgcct gtgggaaatt accagaacta ctctggcttt 1080
 attgattag tgttagcatg ctctctctt ctctattctt acacttttaa tgtatcttg 1140

acitgtatt taaagtgagg ttctataga aaacatatac ttggtagggg gggaaglaaa 1200
 ataaaaagaa atacttggtt attggttga tccactctaa caatctctat gtttaattg 1260
 atgtatttag accattgata ctatttttt tatctcalt cclgtgalla cccagagagc 1320
 tgcttaaatt gattattgat atagacaaat taataattaa tatctaccgt ttgttactgt 1380
 ttctatttt tcatggccct tactttctgc tcctatttt tgcctcttt tctgttaatt 1440
 taggtttga gttattttat atcattctat ttctctccc ttctcagcat atgaattatc 1500
 ttctttttg acttttttag tggctgccct gaagggtgca atgtacattt acaaccagtc 1560
 ccaatctct tcaaaaaaac acaatactgt ttcatggcta gtgcaagtac ctaataataa 1620
 gaagtcactc ctaatttctt tctctattc ttgtatctt tactgttatt catttcactt 1680
 gtacalaagc tgaatcttt caatacatta ttgctattat tattcaaaa catgttatct 1740
 attatactta tttaaaataa gaaaaatagg ccagggtgag ttgcttactc atgtaatccc 1800
 agcactttgg gagaccgatg gattgctaga gctcaggaat tggagaccag cctgggcaac 1860
 atagtgaac cclgtctcta ctaaaaatac aaaaaaaaaa attgctgggc atggtggcat 1920
 gggcclgtgg tcacagctac tggggaggct gaggtgagag gattgcttga gccggggagg 1980
 cagagggtgc agtgaaccaa aatcaagcta ctgcactcca gcctaagta cagagtgaga 2040
 ccctgtctca aaaaaaaaaa gaaagaatta ttttattta tcttcactta ttcttctct 2100
 aatgccttt gttcttttag tatgtatgc caagttcta acctgtatca ttttcttat 2160
 ctcaataact tctttaaca ttctcaca agcagatcta ctggccacag aatgccicaa 2220
 ttctattg tctgagaaaa ccttattct ccttcacttt tgaagataa tttgtaggg 2280
 tacagaatc taggtttag gttttccc ctcaaagta aatattcat tccactctt 2340
 tctcttgi atggtatctg agaagaagtc agatgtaatt ctatcatta ttacttaaaa 2400
 gatgtctct gttccttct ctctctcct tccctctt ccttctct atattacacc 2460
 ttlatagtt gccccatatt tcttagatat tatgtttgg ttcttctg tgtttttc 2520
 ttgatctc agtttagaa gtctctatt atatatctgc aatcgaggg attcttct 2580
 ctgccatgc cagtctacta ataagccct acagacattg ttgactctg ttccagtgt 2640
 ttgatctct agcattctc tgattattc ttgaattgc catctgtcta ctacattac 2700
 caacctatc ttgtgtgtg tctatcata gtaattgcag ttgtttaat ttcataggta 2760
 ttgaattc aacatctcta ccatattga cattgattct gatgcttct ctgtctatc 2820

aagctatgtt ttgtcttt agtgtgactt claatTTTT gttgaaagcc aggcattgat 2880
tactgagtga aagaaactca atacattgta atgtgacgat aagagttcag gggaagtga 2940
gcattctata gtcctatagc aggtctcggc ctttagtga gccgtgcct atgaacggig 3000
acttcaaca agtgctttc attccactct ttctgtcc ttaagtggga caagatcact 3060
gggggggggc tagaattggg tatttccctt ctccaatga gaagctaaag agagggctgg 3120
agtggggtat tttcttccc ctgatggaa agctagaggc agttaaattt ggatatttc 3180
cttctclaa ttcagttagg ctgcgacaaa aatcccgaca gtttaggcic taalattata 3240
aaataatttc tctgagtat aggccttatt aagaacacta tactctgatg gagctgagg 3300
ggagtttct ctgalattca ctgcgagaac ctgtagagc tccaggaagc aaaactcaca 3360
aaagtgtgg agtcttccag aatttttctt ttgcagactt atctgcactg aacctccaga 3420
aattcatcaa ttacagtca ggttttccca cccaggtaact ggttttcatg gaggtttctg 3480
cctgtgcatt tctgtccag taagtgttc ttctgtatg gctgtcttt caaattttt 3540
aagtaggggt atgaccigtg gccicacttc tctgacagti ctgagagtgt tgattttca 3600
gtttgcttag attttactt gtttttagga tgaagtgaaca attccaagc tcttccctga 3660
catgccagat cagaaactga aagtcctaag cctcatattc tgtgcgtggg tatgttcaca 3720
tctgcctgc tccagtgcct ccacctcaca ctctcttcc ctctctgtc ccctgtgag 3780
atttctaggt ccaalacaaa gactgtgttc aactcattca actactggc lcatctgagt 3840
attataatga acaatcaca aaaaaaatga agtaaaagaa aaalccatca aagaattgag 3900
atatttgaga aaaagaaagg agatcagtgt ttataaaaac ttgaaatag atttttaag 3960
tgtttctca ttgacttatg tgaaggact ttcttaatt taacaaatta tgtgcttcg 4020
ttatagcct caaaactct tgtgtagcta agaattggga aataatcagg ctttactaaa 4080
ggactaacgt aaagatcttc tgaagtaac atttctgcta ctcaaggaag agataaactt 4140
catggcataa ccttgccaaa gtatactaag aataaccctg acacaaagct ctttticag 4200
ccaacatgcc atgaaagaaa gaagacaagg ggtgatctcc actctctaag tgaaccacta 4260
aaccaccaa agaagaaacg agggaaatag aaagaggacc ctgacctgag ataattgatc 4320
tgtatgtatg agtagtagaa cctgtctcaa agtacaagga agggaaaaaa aagtagttt 4380
atttgaatt ttggacattt agagicttta ttgtcattt tctttaact cacatgaatg 4440
gctatcact tcaatttata aatatttcat ttctttcaa tctatattca tgaacaaat 4500

ctgaaatgaa cagtgcaca tgtgaatgt tagaacatta taaaattaaa cacaaaatct 4560
 gtctggcaat ctctctagca tcttaggaaa aaagttgaca aaatttcaag cagcagaagg 4620
 gggcaglaaa actcaacaga aagctctgga agatttttaa gattcttctt tattttctt 4680
 tcaigttagag tatttccaa caaatttcag acgctaataa aaattttgta caacagatcc 4740
 atatatttgc ctaaaataga cacagaaaca ttgatataag caaacatgag agctataagt 4800
 ttacatgat caaaacctt ttttatggt acacaatagt cacagtactt ttcatataa 4860
 aacaggttta gtggtcttaa tttagtttg cacattaat acactcccat gaccagcatc 4920
 ccaaattgac ctatccgtt tatttatgt tctcagaatt gtcagttatt taataaatta 4980
 tgaactttt ttcttatgc tcagattgc acttcttct aaaactctgc ccatccttaa 5040
 agtcccagat tctcttgaa cttttttt tgactttcca agtacaatga actcttact 5100
 ctatcctgct atataagtga cagaatttc actatgggat agatggagtt caattcctt 5160
 gagtttaaaa taatctaat ataattatc ctatgccct gttttccct cacttttga 5220
 tccaaatctc ttctcagaca acagaacaat taatgtctga taaggaagac aatgatgatg 5280
 atcacttcaa aataagctg aattcaggat tgaatgtaa aattttagta ctctctcaca 5340
 gtagggattc taacatggct tctaaccba actaacatta glagctctaa ctataaactt 5400
 caaatttcag tagatgcaac ctactcctt aaaatgaaac agaagattga aattattaaa 5460
 ttatcaaaaa gaaaatgatc cagcctcta gtgaaattt catgtaagat tccatgcaat 5520
 aaataggagt gccataaatg gaatgatgaa atatgactag aggaggagaa aggccttcta 5580
 gatgagatgg aattttagtc atccgtgtc catgaagaat cagatgtgta cactaagcaa 5640
 aacagttaaa aaaaaaacct ccaagtgagt ctctattta tttttctt ataagactc 5700
 taaaaattga ggtacctggt gtagtttat tttaggttt atgcgtcat ttctctgtaa 5760
 tgctaaggac ttaggacata actgaattt ctattttcca ctcttttct ggtgtgtgtg 5820
 tatatatata tgtatatata cacacacaca tatacatata tatatttta gtatctcacc 5880
 ctcatatgct cctccctgag cactacccat gatagatgtt aaacaaaagc aaagatgaaa 5940
 ttccaactgt taaaatctcc ctccatcta attaatcct catccaacta tgttcaaaa 6000
 cgagaataga aaattagccc caataagccc aggcaactga aaagtaaatg ctatgttga 6060
 ctttgatcca tggtcacaac tcataatctt ggaaaagtgg acagaaaaga caaaagagtg 6120
 aactttaaaa ctgaattta ttaccagt atctctatg aagggtagt aacaaaaata 6180

atccacgcat caggagaga aatgccttaa ggcatacggt ttggacattt agcgccctg 6240
 caaattctgg ccatcgccgc ttctttgtc calcagaagg caggaaactt tatattgtg 6300
 acccgtaggag ctacattaa clatttacag ggtaactgct taggaccagt attatgagga 6360
 gaattlacct tccccgctc tcttccaag aaacaaggag ggggtgaagg tacggagaac 6420
 agtatttctt ctgttgaaag caacttagct acaaagataa attacagcta tgtacactga 6480
 aggtagctat ttattccac aaaataagag tttttaaaa agctatgtat gtatgtcctg 6540
 catatagagc agatatacag cclattaagc gtcgtcacta aaacataaaa catgtcagcc 6600
 ttcttaacc ttactgccc cagtcgtcc cgacgtgact tctcgaccc tctaaagacg 6660
 tacagaccag acacggcggc ggcggcggga gaggggattc cctgcgcccc cggacctcag 6720
 ggccgctcag attcctggag aggaagccaa gtgtccttct gccctcccc ggtatcccat 6780
 ccaaggcgat cagtcagaa ctggctctcg gaagcgctcg ggcaaagact gcgaagaaga 6840
 aaagacatct ggcggaaacc tgtgcgcctg gggcggtgga actcggggag gagagggagg 6900
 gatcagacag gagagtgggg actacccctt ctgtcccaa attggggcag ctctctgggt 6960
 ttccgatttt ctatttccg tgggtaaaaa accctgcccc caccgggctt acgcaattt 7020
 ttaagggga gaggaggga aaatttgtg ggggtacgaa aaggcggaaa gaaacagtca 7080
 ttctgcaca tgggcttggg tttagtctt ataaaaagga aggttcttc ggtagcgac 7140
 caattgtcat acgacttgca gtgagcgta ggagcacgtc caggaaactc tcagcagcgc 7200
 ctcttcagc tccacagcca gacgccctca gacagcaaag cclaccccc gcgccgcgcc 7260
 ctgcccgaag ctt 7273

<210> 62

<211> 4465

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> >gi|4506264|ref|NM_000963.1| Prostaglandina-endoperoxida sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxygenasa) (PTGS2) de Homo sapiens, ARNm

<400> 62

caattgtcat acgacttgca gtgagcgtca ggagcacgtc caggaactcc tcagcagcgc 60

ctccttcagc tccacagcca gacgccctca gacagcaaag cctacccccg cgccgcgccc 120

tgcccgccgc tggatgclc gcccgcgcc tgcgtcgtg cgcggtcctg gcgctcagcc 180
 atacagcaaa tccitgclgt tcccacccat gtcaaaaccg aggtgatgt atgagtgtg 240
 gattlgacca gtataagtc gattglaccc ggacaggatt ctatggagaa aactgclcaa 300
 caccggaatt ttgacaaga ataaaattat ttctgaaacc cactccaaac acagtgcact 360
 acatacltac ccactcaag ggatttggga acgtgtgaa taacatcccc ttcttcgaa 420
 atgcaattat gagttatgt ttgacatcca gatcacattt gattgacagt ccaccaactt 480
 acaatgctga ctatggctac aaaagctggg aagcctctc taacctctcc tattatacta 540
 gagccctcc tctgtgcct gatgattgcc cgactccctt ggggtcaaa ggtaaaaagc 600
 agcttctga ttcaatgag atgttgaaa aattgcttct aagaagaaag ttcatccctg 660
 atccccaggg ctcaaactg atgtttgcat tcttgccca gcacttcacg catcagtttt 720
 tcaagacaga tcataagcga gggccagctt tcaccaacgg gctgggcat ggggtggact 780
 taaatcatat ttacggtgaa actctggcta gacagcgtaa actgcgcctt ttcaaggatg 840
 gaaaaatgaa atalcagata atgatggag agatgtatcc tcccacagtc aaagatactc 900
 aggagagat gatclaccc cctcaagtc ctgagcatct acggttgcgt gtggggcagg 960
 aggtcttgg tctgggcct ggtctgata tgtatgccac aatctggctg cggaacaca 1020
 acagagtatg cgalgtgctt aaacaggagc atcctgaatg gggtagatg cagtgttcc 1080
 agacaagcag gctaactg ataggagaga ctattaagat tgtatlgaa gattatgtc 1140
 aacactgag tggctatcac ttcaaactga aattgaccc agaactactt ttacaacaac 1200
 aattccagta ccaaatcgt atgtctgctg aatttaacac cctctatcac tggcatcccc 1260
 ttctgcctga caccttcaa attatgacc agaaatacaa ctatcaacag ttatclaca 1320
 acaactctat atgtctgaa catggaatta cccagttgt tgaatcattc accaggcaaa 1380
 ttgtggcag ggtgtcgtt ggtaggaatg ttccaccgc agtacagaaa gtatcacagg 1440
 ctccaltga ccagagcagg cagatgaaat accagtctt taatgaglac cgcaaacgct 1500
 ttatgctgaa gccclatgaa tcattgaag aacttacagg agaaaaggaa atgtctgag 1560
 agttggaagc actctatgtt gacatcgatg ctgtggagct gatactgcc ctctggtag 1620
 aaaagcctc gccagatgcc atcttgggt aaacctggt agaagtggga gcaccattct 1680
 ccttgaaagg acttatgggt aatgtatat gtctcctgc ctactggaag ccaagcattt 1740
 ttgtggaga agtgggttt caaatcatca acactgcctc aattcagtct ctatctgca 1800

ataacgigaa gggctgtccc ttacttcal tcagtggtcc agatccagag ctcaataaaa 1860
 cagtcacat caatgcaagt tcttcccgct ccggactaga tgalatcaat cccacagtac 1920
 tactaaaaa acgttcgact gaacigtaga agtctaata tcatatttat ttatttatat 1980
 gaaccatgic tattaattta attatttaal aatatttata ttaaactcct talgttactt 2040
 aacatcttct glaacagaag tcagtlactc tgttgcggag aaaggagica tacttgtaga 2100
 gacttttatg tcactactct aaagatttg cgttgctgt taagtttga aaacagtttt 2160
 taltctgttt lataaaccag agagaaalga gtttgacgt cltttactt gaatttcaac 2220
 ttatattata agaacgaaag taaagatgt tgaatactta aacactatca caagatggca 2280
 aaatgctgaa agttttaca ctgtcgatgt ttcaaatgca tcttcatga tgcattagaa 2340
 gtaactaalg ttgaaattt taaagtlactt ttggtattt ttctgicac aaacaaaaac 2400
 aggtatcagt gcattattaa atgaalatit aaattagaca ttaccagtaa ttcatgtct 2460
 actttttaa atcagcaatg aaacaataat ttgaaattc taaattcata gggtagaatc 2520
 accigtaaaa gcttgtttga ttcttaaag ttattaaact tgtacatata ccaaaaagaa 2580
 gctgtcttgg atttaaatct gtaaaatcag atgaaattt actacaattg ctigttaaaa 2640
 tattttataa gtgatgttcc ttctcacca agagtataa ccttttagt gtgactgtta 2700
 aaacttcctt taaatcaaa atgccaaatt tattaagggt gggagccac tgcagtgtta 2760
 tctcaaaaata agaataattt gttagatat tccagaattt gtttatatgg ctggtaacat 2820
 glaaaaatcia talcagcaaa agggcttacc tttaaaataa gcaataacaa agaagaaaac 2880
 caaattatg ttcaattta gggttaaact ttgaagcaa actttttt atccttgtgc 2940
 atcgcaggcc tggactcag atttgctat gaggttaatg aagtaaccaag ctgtgcttga 3000
 ataacgatat gtttctcag atttctgtt glacagtta atttagcagt ccatacaca 3060
 ttgcaaaagt agcaatgacc tcaataaata cccttcaaa atgcttaaat tcatttcaca 3120
 cattaattt atctcagtct tgaagccaat tcagtaggtg catlgaatc aagccgtgct 3180
 acctgcagtc tgttctttt ctttcttct tttagccatt ttgctaagag acacagtcct 3240
 ctcatcactt cgttctcct atttgttt actagtitta agatcagagt tcacttctt 3300
 tggactctgc clataatttc ttaccigaac ttgcaagt tttaggtta acctcagctc 3360
 aggactgcta tttagctcct cttaagaaga taaaagaga aaaaaaagg cccttttaa 3420
 aatagtalac acttatttta agtgaagaag agagaattt atttatagct aatttagct 3480

atctgtaacc aagatggatg caaagaggct agtgcctcag agagaactgt acgggggttg 3540
 tgactggaaa aagttacgtt cccattctaa ttaatgccct ttctattta aaaacaaaac 3600
 caaatgatat ctaagtagtt ctacagcaata ataataatga cgataatact tctttccac 3660
 atctcattgt cactgacatt taatggtagt gtatattact taatttattg aagattatta 3720
 ttatgtctt attaggacac tatgggtata aactgtgtt aagcctacaa tcattgattt 3780
 tttttgta tgtcacaatc agtatattt ctttgggggt accctctga atattatga 3840
 aacaatccaa agaatgatt gattaagat ttgtgaataa attttagaa atctgattgg 3900
 catattgaga tatttaaggt tgaatgttg tccttaggat aggcctatgt gctagccac 3960
 aaagaatatt gtctcattag cctgaatgtg ccataagact gacctttaa aatgtttga 4020
 gggatctgtg gatgcttctg taattgttc agccacaatt tattgagaaa atattctgtg 4080
 tcaagcactg tgggttttaa tatttttaa tcaaacgtg attacagata atagtattta 4140
 tataaataat tgaaaaaat ttcttttg gaagaggag aaaaatgaaat aaatatcatt 4200
 aaagataact caggagaatc ttctttacaa ttctacgtt agaatgttta aggttaagaa 4260
 agaaatagtc aatatgcttg tataaaacac tgttactgt ttttttaa aaaaaaactt 4320
 gattgttat taacattgat ctgctgacaa aacctgggaa ttgggtgt gtatgcgaat 4380
 gttcagtc ctacagacaaa tgtgtattta acttatgtaa aagataagtc tggaaataaa 4440
 tgtctgtta ttttgtact attta 4465

<210> 63

<211> 1336

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> 14-3-3-Sigma

10 >gi|45238846|ref|NM-006142.3| Estratifina (SFN) de Homo sapiens, ARNm

<400> 63

gagagacaca gagtccggca ttggtcccag gcagcagtta gcccgccgcc cgcctgtgtg 60
tcccagagc catggagaga gccagtcga tccagaaggc caagctggca gagcaggccg 120
aacgctatga ggacatggca gccttcata aaggcgccgt ggagaagggc gaggagctct 180
cctgcgaaga gcgaaacctg ctctcagtag cctataagaa cgtgggtgggc ggccagaggg 240

ctgccctggag ggtgcgtcc aglaltgagc agaaaagcaa cgaggagggc tcggaggaga 300
 aggggcccga ggtgcgtgag taccgggaga aggtggagac tgagctccag ggcgtgtgcg 360
 acaccgtgct gggcctgctg gacagccacc tcatcaagga ggccggggac gccgagagcc 420
 gggcttcta cctgaagatg aagggtgact actaccgcta cctggccgag gtggccaccg 480
 gtgacgacaa gaagcgcac attgactcag cccggtcagc claccaggag gccatggaca 540
 tcagcaagaa ggagatgccg cccaccaacc ccatccgcct gggcctggcc ctgaactttt 600
 ccgtcttcca ctacgagatc gccaacagcc ccgaggaggc catctctctg gccaagacca 660
 ctttcgacga ggccatggct gatctgcaca ccctcagcga ggactcctac aaagacagca 720
 ccctcatcat gcagctgctg cgagacaacc tgacactgtg gacggccgac aacgccgggg 780
 aagagggggg cgaggctccc caggagcccc agagctgagt gttgcccgcc accgccccgc 840
 cctgccccct ccagtcccc accctgccga gaggactagt atgggggtggg agggcccacc 900
 ctctcccct aggcgctgtt ctgtctcaa agggctccgt ggagagggac tggcagagct 960
 gaggccacct ggggctgggg atcccactct tcttcagct gttgagcgca cctaaccact 1020
 ggtcatgccc ccacccctgc tctccgacc cgcttctcc cgaccccagg accaggctac 1080
 ttctcccctc ctctgcctc cctcctgcc ctgctgcctc tgatcgtagg aattgaggag 1140
 tgtcccgct tgtggctgag aactggacag tggcaggggc tggagatggg tgtgtgtgtg 1200
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tglcgcgcg cgccagtga agaccgagat tgagggaag 1260
 catgtctgt ggggtgacc atgttctc tcaataaagt tccccttga cactcaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aaaaaa 1336

<210> 64

<211> 1968

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> RASSF1A

>gi|25777678|ref|NM_007182.4| Dominio de la familia 1 de asociación con Ras (RaIGDS/AF-6) (RASSF1) de Homo sapiens, variante de transcripción A, ARNm

5 <400> 64

tctcctcagc tcctcccgc cgcccagctt ggalcctggg ggaggcgctg aagtcggggc 60

ccgcccctgtg gccccgcccg gcccgcgctt gctagcgccc aaagccagcg aagcacgggc 120

ccaaccgggc calgtcgggg gagcctgagc lcattgagct gcgggagctg gcacccgctg 180
 ggcgcgctgg gaagggccgc acccggtcgg agcgtgccaa cgcgctgcgc atcgcgcggg 240
 gcacccgctg caaccccaca cggcagctgg tccctggccg tggccaccgc ttccagcccg 300
 cggggcccg cagcacacg tggcgacc tctgtggcga ctcaatctgg ggcgtcgtgc 360
 gcaaaggcct gcagtgcgcg cattgcaagt tcacctgcca ctaccgctgc cgcgcgctgc 420
 tctgcctgga ctgttcggg ccccgggacc tgggtggga acccgcggtg gagcgggaca 480
 cgaacgtgga cgagcctgtg gagtgggaga cacctgacct ttctcaagct gagattgagc 540
 agaagatcaa ggagtacaat gccagatca acagcaacct ctcatgagc tgaacaagg 600
 acggttcta cacaggcttc atcaaggctc agctgaagct ggtgcgccct gtctctgtgc 660
 cctccagcaa gaagccacc tcctgcagg atccccggcg gggcccagga cggggcacia 720
 gtgtcaggcg ccgcacttc ttctacgtc ccaaggatgc tgtcaagcac ctgcatgtgc 780
 tgtcacgcac aagggcacgt gaagtcattg aggccctgct gcgaaagttc ttggtggtgg 840
 atgacccccg caagtttga ctcttgagc gcgtgagcg tcacggccaa gtgtacttgc 900
 ggaagctgtt ggaatgatgag cagccccgc ggtgcggct cctggcaggg cccagtga 960
 aggccctgag cttgtcctg aaggaaaatg actctgggga ggtgaactgg gacgccttca 1020
 gcatgcctga actacataac ttctacgta tctgcagcg ggaggaggag gagcacctcc 1080
 gccagatcct gcagaagtac tcctattgcc gccagaagat ccaagaggcc ctgcacgcct 1140
 gccccctgg gtgacctt gtacccccag gtggaaggca gacagcaggc agcgccaagt 1200
 gcgtgccgtg tgagtgtgac agggccagtg gggcctgtgg aatgagtgtg catggaggcc 1260
 ctctgtgct gggggaatga gccagagaa cagcgaagta gctgtctcc tgtgtccacc 1320
 tgggtgtg gccaggtatg gtctgcacc cctctgccct cattactggg cctagtggg 1380
 ccagggtgc cctgagaagc gtctccaggc ctgcagcagg agtggtgcag acagaagtct 1440
 ccicaattt tgtctcagaa gtgaaaatct tggagaccct gcaaacagaa cagggtcag 1500
 ttgcagggg tgacggccct catctatgag gaaaggttt ggaatctgaa tgggtctca 1560
 ggatacctt atcagagcta aggggggtg ctgagaataa ggcaggcatt gaggaagagt 1620
 ctggttct ctctacagtg ccaactctc acacacctg aggtcaggga gtgctggctc 1680
 acaglacagc atgtgcctta atgttcata tgaggaggat gtccctgggc cagggtctgt 1740
 tgaatgtgg gcactggccc aggttcatac ctatttgc taaatcaagcc aggtctctc 1800

cctcaggtgt ttttatgaa gtgcgtgaat giatgtaatg tlggtggcc tcagctgaat 1860

gcctcctgtg gggaaagggg ttggggtgac agtcatcatc agggcctggg gcctgagaga 1920

attggctcaa taaagatttc aagatcctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1968

<210> 65

<211> 17

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> GSTP1 Cebador

10 <400> 65

agttgcgcgg cgatttc 17

<210> 66

<211> 23

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda (5'FAM/3'TAMRA) GSTP1

20

<400> 66

cggtcgacgt tcggggtgta gcg 23

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico de la presencia o predecir el curso de un trastorno proliferativo, que comprende determinar el estado de metilación de un marcador para GSTP1 en una muestra biológica usando una sonda de ácido nucleico y cebadores oligonucleotídicos, en el que la sonda oligonucleotídica está codificada por la SEC ID N° 25 y los cebadores oligonucleotídicos están codificados por las SEC ID N° 23 y 24.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende medir la presencia de un Marcador de referencia.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el Marcador de referencia está seleccionado del grupo que consiste en B Actina.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usan uno o más Marcadores.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el uno o más Marcadores adicionales incluye un Marcador por APC, TIMP, RASSF1A, RARB2, PTGS2 o 14-3-3.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los reactivos para el uno o más Marcadores adicionales incluyen un miembro del grupo que consiste en las SEC ID N° 26-35 y 44-53.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es tejido prostático.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es de orina, suero, plasma o células circulantes.
9. Una composición que comprende todos los miembros del grupo que consiste en SEC ID N° 23-25.
10. Un kit para realizar un ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende: amplificación de ácido nucleico y que comprenden todos los miembros del grupo que consiste en por las SEC ID N° 23-25.
11. El Kit de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los reactivos de amplificación y detección son las SEC ID N° 23-25 junto con los reactivos seleccionados del grupo que consiste en las SEC ID N° 36-43.
12. El Kit de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los reactivos detectan la hipermetilación de GSTP1.
13. El Kit de acuerdo con la reivindicación 10, que además comprende reactivos para amplificar y detectar la presencia de un gen expresado de forma constitutiva.
14. El Kit de acuerdo con la reivindicación 10, que además comprende reactivos para amplificar y detectar la presencia de genes expresados de forma constitutiva.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende establecer una proporción de metilación y determinar si la proporción de metilación supera un valor de corte.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en monitorización de terapia.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en detección selectiva.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en resolver resultados ambiguos o indeterminados de ensayos de cáncer obtenidos usando procedimientos diferentes a los de la reivindicación 1.

Fig.1 Ensayo de MSP para GSTP1 de la técnica anterior

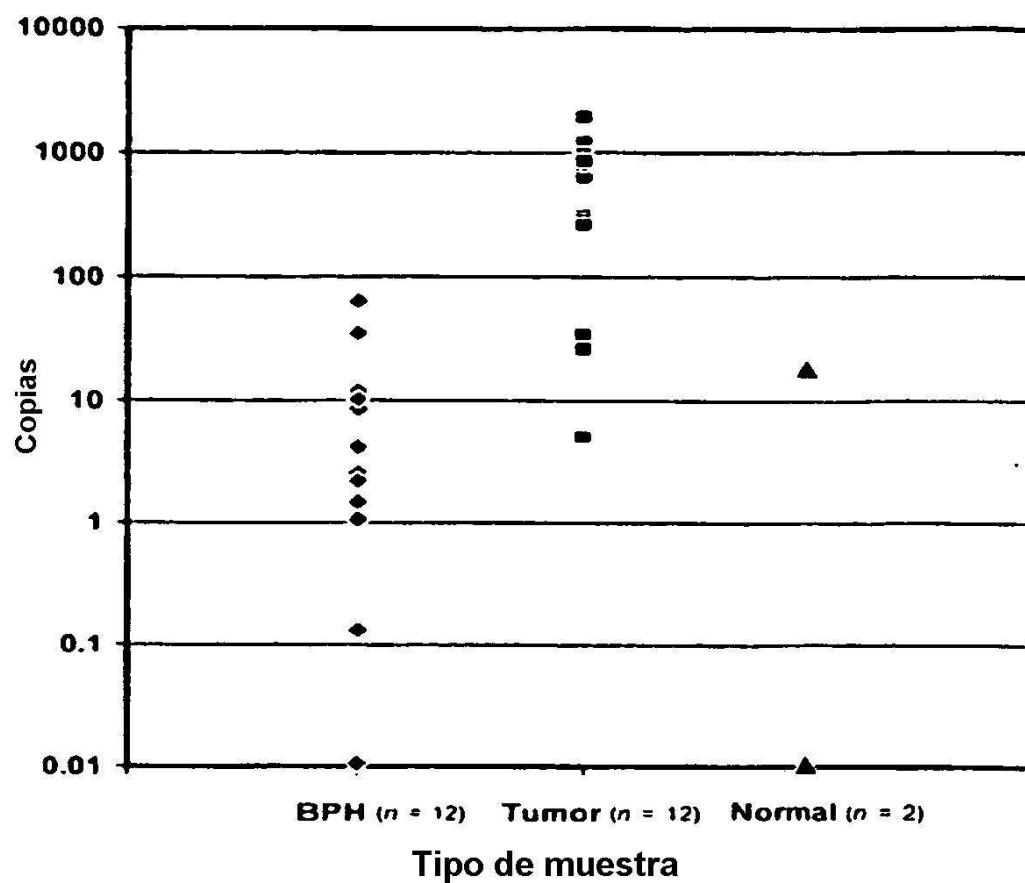


Fig. 2 Ensayo MSP para GSTP1 de acuerdo con la invención

