

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 802**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2009 E 09821644 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2350316**

54 Título: **Métodos y usos que implican aberraciones genéticas de NAV 3 y expresión aberrante de múltiples genes**

30 Prioridad:

**20.10.2008 US 196761 P**

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

**20.06.2014**

73 Titular/es:

**VALIPHARMA (100.0%)  
24 Greville Street  
London EC1N 8SS, GB**

72 Inventor/es:

**KROHN, KAI;  
RANKI, ANNAMARI;  
CARLSSON, EMILIA;  
OVASKA, KRISTIAN;  
HÄYRY, VALTTERI y  
HAUTANIEMI, SAMPSA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 469 802 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos y usos que implican aberraciones genéticas de NAV 3 y expresión aberrante de múltiples genes

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la genética y la oncología y proporciona métodos para detectar tumores así como métodos para predecir el pronóstico de un paciente.

- 10 Específicamente, la presente invención se refiere a un método para demostrar el carácter maligno de un tumor o de una subpoblación celular de un sujeto y a un método para predecir un pronóstico de un sujeto que tiene un tumor con un cambio en el número de copias y con sobreexpresión de al menos un gen o de un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR y beta-catenina. La presente invención también se refiere a los usos del gen NAV3 o de su producto génico y al menos un gen y/o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR y
- 15 beta-catenina para demostrar el carácter maligno de un tumor o subpoblación celular, prediciendo un pronóstico de un sujeto que tiene un tumor con un cambio del número de copias de NAV3. Además se describe el uso de un antagonista, un anticuerpo o una molécula inhibidora de al menos un gen y/o de un producto génico seleccionados de listas específicas para terapia contra el cáncer en un sujeto.
- 20 Además, se describe un kit de diagnóstico que comprende herramientas para detectar el cambio en el número de copias en una muestra biológica y herramientas para detectar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionado de listas específicas en una muestra biológica. La presente invención también se refiere al uso de un gen NAV3 o un producto génico y al menos un gen y/o producto génico seleccionado de IL23R o beta-catenina para demostrar el carácter maligno de un tumor o una subpoblación celular, para predecir un pronóstico de
- 25 un sujeto con un tumor colorrectal, tumor cerebral o tumor de queratinocitos epidérmicos y para seleccionar un tratamiento para un sujeto con un tumor colorrectal, tumor cerebral o tumor de queratinocitos epidérmicos.

**Descripción**

- 30 La progresión del cáncer se caracteriza por el desarrollo de inestabilidad cromosómica, aneuploidía, y una serie de aberraciones genéticas adquiridas que afectan genes importantes para el crecimiento celular y la supervivencia. Un único gen puede afectar varias rutas críticas y contribuir a la conversión de una célula normal en una célula cancerosa, que implica un proceso en etapas que requiere la activación de oncogenes y la inactivación de los genes supresores de tumores. La tecnología reciente ha posibilitado la identificación de incluso mutaciones raras que contribuyen al desarrollo del cáncer.
- 35

El desarrollo del cáncer colorrectal (CRC) por medio de lesiones precursoras benignas, pólipos adenomatosos, junto con la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos es uno de los ejemplos mejor conocidos de la carcinogénesis multietapa. Las pruebas recientes también sugieren que el microambiente tisular es de una gran

40 importancia en el crecimiento potencial y diseminación de las células tumorales (Kim B.G. y col. 2006, Nature 441: 1015-9; Reuter J.A. y col. 2009, Cancer Cell 15: 477-88) y tal efecto puede estar impulsado por la inflamación crónica. Se sabe que el CRC está ligado a la enfermedad inflamatoria del intestino grueso (IBD).

- 45 La inmensa mayoría de los cánceres colorrectales muestra uno de los dos fenotipos principales de inestabilidad genómica, la inestabilidad microsatélite (MSI) o la inestabilidad cromosómica (CIN), también llamada microsatélite estable (MSS). Aproximadamente el 85 % de los CRC se relacionan con MSS y muestran aneuploidía y pérdida de heterocigosidad (LOH), y la poliposis adenomatosa cólica (APC) o mutaciones beta-catenina son las aberraciones moleculares precoces más comunes en este fenotipo. Estas mutaciones dan lugar a la activación de la ruta Wnt aberrante, de la que se piensa que inicia la formación del adenoma de colon. Varias rutas de señalización están implicadas en el desarrollo de cánceres de colon esporádicos. Por tanto, son necesarios varios años o décadas para desarrollar un cáncer de colon incluso si están presentes mutaciones del gen de la poliposis adenomatosa cólica (APC). También es necesaria la activación de KRAS para la progresión de adenomas en carcinomas como una segunda etapa (Phelps R.A. y col. 2009, Cell 37: 623-34). También se ha demostrado que la pérdida de APC funcional induce la aneuploidía *in vivo* por medio de una tetraploidía transitoria (Caldwell C.M. y col. 2007, J Cell Biol 178: 1109-20), lo que puede potenciar la idoneidad de células que contienen cromosomas rotos o reorganizados.
- 50
- 55

- Hemos mostrado previamente que las aberraciones en el cromosoma 12q21, específicamente la pérdida alélica en el gen navegador neuronal 3 (NAV3), se asocian con varios subtipos de linfoma de células T cutáneo (CTCL) (Karenko L. y col. 2005, Cancer Res 65: 8101-10; Hahtola S y col. 2008, J Invest Dermatology 128: 2304-9; WO2008059112 A1) y cánceres de pulmón asociados a CTCL (Hahtola S y col. 2008, Genes Chromosomes Cancer 47: 107-17). Más recientemente, se han descrito mutaciones de NAV3 o cambios en el número de copias, respectivamente, en el melanoma (Bleeker F. y col. 2008, Human Mutation 29: E451-59), cáncer pancreático (Bleeker F. y col. 2009, Hum Mutat 30(2): E451-9) y en glioblastomas humanos (Nord H. y col. 2009, Neuro Oncol Mar20). Además, se ha encontrado que el NAV3 es el único gen que estaba expresado diferencialmente de forma significativa (regulado negativamente) en el carcinoma adrenal al compararse con los adenomas adrenocorticales (Soon P.H. y col. 2009, ERC). En el panorama de genes del cáncer, el NAV3 pertenece a los genes candidatos de
- 60
- 65

cáncer “tipo colina” (CAN) que comúnmente mutan en cánceres de mama y colon (Wood L. y col. 2007, Science 318: 1108-13).

Se considera cada vez más importante concentrar los esfuerzos de investigación en la identificación de las rutas que están afectadas por las aberraciones genéticas, y de esta manera se proporcionan además herramientas para diagnosticar enfermedades y para diseñar fármacos específicos para tratamientos individualizados. Ahora, hemos encontrado correlaciones sorprendentes y anteriormente desconocidas entre las aberraciones de NAV3 con rutas específicas y genes relacionados con las mismas. Por tanto, proporcionamos nuevos medios y métodos para diagnosticar o hacer un seguimiento del cáncer.

Están justificados nuevos biomarcadores o combinaciones de biomarcadores que proporcionen diagnósticos más eficaces y precoces de tumores potencialmente agresivos así como la identificación de tumores susceptibles de terapias dirigidas. La presente invención proporciona una solución específica para predecir o identificar un tumor y la progresión del carcinoma. La presente invención también desvela una herramienta para evaluar la agresividad clínica de los tumores y la supervivencia del paciente.

### Breve descripción de la invención

El objetivo de la invención, por tanto, es proporcionar métodos nuevos y medios para demostrar el carácter maligno de un tumor y para estadificar y hacer un seguimiento de un cáncer, tales métodos y medios permiten un diagnóstico preciso de la enfermedad.

Otros objetivos de la invención son proporcionar métodos y medios para predecir el inicio del tumor o la progresión del tumor así como para predecir el pronóstico de un paciente. Los métodos y medios de la presente invención son específicos y fiables. Los métodos y medios permiten una buena intervención terapéutica dirigida, que puede salvar vidas.

Otro objetivo más de la invención es proporcionar nuevos biomarcadores y combinaciones de biomarcadores útiles en la detección del cáncer así como en las evaluaciones pronósticas.

Demostrando las aberraciones del NAV3, ligadas a metástasis en los ganglios linfáticos y a la inflamación relevante y las rutas de proliferación celular, se proporcionará una herramienta relativamente simple y asequible para hacer un seguimiento del cáncer, específicamente un cáncer del colon-recto, cerebro o de queratinocitos epidérmicos. El NAV3 regula la expresión de otros genes y rutas de señalización que tienen un efecto en la transformación maligna y/o en el comportamiento biológico del tumor maligno. Por lo tanto, las rutas afectadas por NAV3 así como las diferentes combinaciones de las mismas también son dianas para diseñar terapias contra el cáncer.

Los cambios en el número de copias de NAV3, especialmente la delección de NAV3, está implicada directamente en la carcinogénesis precoz y abre nuevas posibilidades para diagnosticar más precisamente pero también para estrategias terapéuticas racionales.

La presente invención se refiere a un método de demostración del carácter maligno de un tumor o de una subpoblación celular de un sujeto, comprendiendo el método:

- i) determinar el cambio en el número de copias en una muestra biológica del sujeto; y
- ii) determinar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR y beta-catenina en la muestra biológica u otra muestra biológica del sujeto;
- iii) demostrar el carácter maligno de un tumor o subpoblación celular de un sujeto, cuando tanto el cambio en el número de copias del NAV3 como la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR y beta-catenina están presentes en la(s) muestra(s) del sujeto.

También se describe un método de tratamiento para un sujeto que tiene un tumor con un cambio en el número de copias del NAV3 y con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR y beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12, que comprenden una etapa, en la que está afectado al menos un gen o un producto génico con sobreexpresión.

La presente invención además se refiere a un método para predecir un pronóstico que comprende:

- i) determinar el cambio de número de copias de NAV3 en una muestra biológica de un sujeto;
- ii) determinar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionado de entre IL23R y beta-catenina, en la muestra biológica u otra muestra biológica del sujeto; y
- iii) predecir un pronóstico para el sujeto que tiene tanto un cambio en el número de copias del NAV3 como la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R o beta-catenina en la(s) muestra(s).

También se describe un método para seleccionar un tratamiento para un paciente, que comprende:

- i) determinar un cambio en el número en las copias de NAV3 en una muestra biológica de un sujeto;
- ii) determinar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12, en la muestra biológica o en otra muestra biológica del sujeto; y
- iii) seleccionar un tratamiento para el sujeto que tiene tanto un cambio en el número de copias de NAV3 como sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12 en la(s) muestras(s).

La presente invención además se refiere al uso del gen NAV3 o producto génico y de al menos un gen y/o producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina para demostrar el carácter maligno de un tumor o subpoblación de células con un cambio en el número de copias de NAV3 y con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR y beta-catenina, en un sujeto.

La presente invención además se refiere al uso del gen NAV3 o un producto génico y al menos un gen y/o un producto génico seleccionado de entre IL23R o beta-catenina para predecir el pronóstico de un sujeto.

Además se describe el uso de un gen NAV3 o un producto génico y al menos un gen y/o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12 para seleccionar un tratamiento para un sujeto.

Además se describe el uso de al menos un gen y/o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12 como terapia contra el cáncer en un sujeto que tiene un tumor con un cambio en el número de copias del NAV3.

También se desvela el uso de un antagonista, anticuerpo o molécula inhibidora de al menos un gen o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12 para la terapia contra el cáncer en un sujeto que tiene un tumor con un cambio en el número de copias de NAV3 y con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionado de entre el IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12.

Además se desvela un kit de diagnóstico que comprende herramientas para detectar un cambio en el número de copias de NAV3 en una muestra biológica y herramientas para detectar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionado de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12 en una muestra biológica.

Además se desvela el uso de un kit de diagnóstico para demostrar el carácter maligno de un tumor o una subpoblación celular.

Además se desvela el uso de un kit de diagnóstico de la invención para predecir el pronóstico de un sujeto con un tumor colorrectal, tumor cerebral o tumor de queratinocitos epidérmicos.

Además se desvela el uso de un kit de diagnóstico de la invención para seleccionar un tratamiento para un sujeto con un tumor colorrectal, tumor cerebral o tumor de queratinocitos epidérmicos.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación la invención se describirá en mayor detalle por medio de las realizaciones preferidas con referencias a los dibujos adjuntos, en los que

La **Figura 1** muestra la cantidad de células con el cromosoma 12 polisómico y NAV3 eliminado en muestras de adenoma y carcinoma de los mismos pacientes.

La **Figura 2** muestra A) Polisomía del cromosoma 12, B) Amplificación de NAV3 y C) Deleción de NAV3 en el colon normal, carcinoma de colon MSS y MSI y en muestras de adenoma de colon. Cada punto representa una muestra y se contaron 200 células de todas las muestras.

La **Figura 3** muestra las aberraciones de NAV3 en líneas celulares de cáncer de colon observadas por sondas BAC en relación a las translocaciones del cromosoma 12 por MFISH específica de brazo cromosómico o deleciones del NAV3 en relación con las deleciones observadas por las sondas YAC. a) Una metafase de la línea celular SW403 (CLL-230) que muestra tres copias del centrómero del cromosoma 12 (verde, Alexa 488) y un gen NAV3 perdido (rojo; BAC RP11-36P3) en una. Esta deleción se observó en un cromosoma que recibió material translocado del cromosoma 15q (b; MFISH- brazo) y estaba acompañado por dos copias de longitud completa del cromosoma 15 semejante (c, translocación desequilibrada). Las tinciones respectivas DAPI correspondientes se muestran en los paneles d- f. Por FISH específico de brazo (g), se localizó la translocación desde el cromosoma 15 (rojo y violeta) en el brazo p (naranja) del cromosoma 12 (verde y rojo carmesí) y se verificó la deleción para el brazo q. En la línea celular RKO (h- j), solo dos de los tres cromosomas 12 (centrómero verde)

mostraron señales de sonda BAC RP11-136F16 específica del gen NAV3 (rojo; h). La translocación desequilibrada entre los cromosomas 12 (i, MFISH) y 2 (j, MFISH) abolió el gen NAV3. Las células T84 (CLL-248) mostraban varias copias del cromosoma 12 (centrómero en azul; k) con pérdida de señales NAV3 en uno (naranja, BAC RP1136P3). La diferencia de tamaño entre el cromosoma 12 normal y el aberrante era pequeña (l, MFISH- brazo), pero se observaron deleciones indicadas por las sondas YAC 825F9 (12S326 y WI-7776, rojo en el panel m) y 885G4 (WI-6429, WI-9760, rojo en panel n), que se extendían proximalmente y distalmente del gen NAV3. Se vio la señal específica de NAV3 (RP11-36P3, rojo) en el der (2) t (2; 12) (o) en el cromosoma 12 normal (q), pero no en los otros dos cromosomas 12 (p – q; centrómero verde) ni en los cromosomas diminutos con material cen 12 (q). Los cromosomas aberrantes correspondientes que se observan comúnmente observados por el MFISH- brazo (2; 12), r) der (10) t (10; 12; 3), s) e i (12) (p) derecho, t) a lo largo de un cromosoma 12 normal, t).

La **Figura 4** muestra la pérdida de NAV3 en una muestra de un paciente detectada por matriz CGH. Vistas desde abajo: vista del genoma, cromosoma 12, nivel génico donde las sondas NAV3 están marcadas por un cuadrado.

La **Figura 5** muestra el dendrograma de agrupamiento GO y el mapa crítico de expresión. El análisis se basa en 16 productos génicos. El número medio de anotaciones GO por producto génico es 8. Además, 23 productos génicos no tenían anotación GO y se excluyeron del análisis. Los colores representan los valores de expresión de los productos génicos. Los valores de expresión más bajos se indican en rojo y las expresiones más altas en blanco. El dendrograma de la izquierda corresponde al agrupamiento basado en GO, a su vez el dendrograma superior utiliza los valores de expresión para el agrupamiento.

La **Figura 6** muestra la comparación de expresión de NAV3. Los niveles de ARNm NAV3 tras la transfección con ARNsi NAV3 se evaluaron por LightCycler q RTPCR y micromatrices Agilent 4 x 44K.

La **Figura 7** muestra la hibridación *in situ* del ARN de NAV3 silenciado en células A172 de glioblastoma. Se detectó el ARN-NAV3 con una sonda que reconoce los exones 37-39 del ARN NAV3 (púrpura). La expresión de NAV3 en las células silenciadas (e), las células no transfectadas (a), y las células transfectadas con el control de ARN (c). Se muestran los controles en sentido, con 5 x más sondas, para a, c, y e en b, d, y f, respectivamente.

La **Figura 8** muestra el dendrograma de agrupamiento GO y el mapa crítico de expresión de los genes regulados positivamente en ocho de los diez experimentos de anulación. Los valores de expresión más bajos se indican en rojo y los más altos en blanco. Se muestran el dendrograma basado en el agrupamiento GO (izquierda) y el dendrograma del agrupamiento de muestras basado en los perfiles de expresión (derecha). Los nombres de los genes están a la derecha y cada columna representa un único experimento. Los grupos GO con más de un gen son desde abajo a arriba; membrana (negro, 9 genes), transporte de iones (marrón, 2 genes), nuclear (verde, 4 genes), y unión a ribonucleótidos (azul, 2 genes).

La **Figura 9** muestra la expresión y la localización celular de IL23R y beta-catenina en los cánceres de colon y colorrectal humanos. Fotomicrografías representativas de la tinción inmunológica para IL23R (a) y beta-catenina (d) en tejido normal de colon. Se observó la inmunorreactividad de IL23R en las muestras de cáncer colorrectal con deleción de NAV3 (c, grado 3 de tinción, 8 % de células con NAV3 eliminado) mientras que los cánceres sin aberración NAV no mostraban tinción IL23R (b). Ambas muestras (b y c) tienen un 20 % de células tumorales con polisomía del cromosoma 12. Una muestra de CRC sin deleción NAV3 mostró un patrón membranoso normal de tinción de beta-catenina (e) mientras que una muestra de CRC con deleción de NAV3 en el 9 % de las células, mostró principalmente una fuerte localización nuclear de la beta-catenina (f).

La Figura 10 muestra el trazado de Kaplan-Meyer de las distribuciones de supervivencia con respecto a la inmunorreactividad de IL23R.

La **Figura 11** muestra la inmunotinción de GnrHR de células NAV3 0205 silenciadas y tejido de glioma. La tinción de membrana de GnrHR en células 0205 silenciadas NAV3 (c) comparadas con las células tipo silvestres, (a) y con las células transfectadas con la construcción de control (b). La expresión de GnrHR en las dos muestras de cáncer colorrectal con deleción de NAV3: paciente con CRC tipo MSS (e), paciente con CRC tipo MSI (f), tejido colorrectal normal de control (d). Tinción de GnrHR de dos muestras de glioma (astrocitoma) con un 55 % (g) y un 93 % (i) de células con NAV3 eliminado y número de copias de NAV3 normal (g).

## 50 Descripción detallada de la invención

Informamos ahora de que los cambios en el número de copias de NAV3 se encuentran con frecuencia en el CRC tipo MSS, en adenomas de colon, en tumores cerebrales, en queratinocitos epidérmicos y varias líneas celulares establecidas. Las aberraciones en NAV3 se correlacionan con polisomía en el cromosoma 12 y la implicación de los ganglios linfáticos. Además, los análisis de ARNsi específico del silenciamiento génico del NAV3 y de la matriz de expresión revelan al menos dos moléculas diana importantes para NAV3.

## Métodos de diagnóstico y métodos de tratamiento y predicción del pronóstico

Todos los genes regulados positivamente o sus productos génicos enumerados en la presente solicitud se pueden utilizar en el desarrollo de nuevos principios diagnósticos. Además para determinar el número de copias de NAV3, se estudia la expresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnrHR y beta-catenina en los métodos de la presente invención. Como se utiliza en el presente documento la expresión de un "producto génico" se refiere a un ARNm, proteína o a cualquier producto que se obtiene a partir del gen. En una realización específica de la invención, el producto génico es una proteína.

Para las proteínas que son secretoras, se pueden utilizar los métodos para comprobar su aumento de nivel en la sangre del paciente como un método diagnóstico. Para las proteínas no secretoras, el método más apropiado que se utilizará será la inmunohistoquímica.

- 5 Los métodos de diagnóstico se pueden llevar a cabo *in vitro* o *ex vivo*. En una realización específica de la invención, el método es un método *in vitro*.

Además se describe un kit de diagnóstico para demostrar el carácter maligno de un tumor o de una subpoblación celular. Las herramientas para detectar el cambio en el número de copias de NAV3 y/o la sobreexpresión de cualquier gen o producto génico puede comprender sondas adecuadas, cebadores o anticuerpos.

10 En una realización específica de la invención, el tumor es un tumor colorrectal, tumor cerebral o tumor de queratinocitos epidérmicos.

15 La mayoría de los tumores cerebrales se originan en la glía (gliomas) tales como los astrocitos (astrocitomas), oligodendrocitos (oligodendrogliomas), o células ependimales (ependimoma). También hay formas mixtas, con ambos componentes celulares astrocítico y oligodendroglioma. Estos se denominan gliomas mixtos u oligoastrocitomas. También se pueden encontrar tumores mixtos glioneuronales (tumores que muestran un componente neuronal, así como un componente glial, por ejemplo gangliogliomas, tumores neuroepiteliales disembrionales) y tumores que se originan en las células neuronales (por ejemplo gangliocitoma, gangliocitoma central). Otras variedades de tumor primario cerebral incluyen: tumores primitivos neuroectodérmicos (PNET, por ejemplo, meduloblastoma, meduloepitelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, ependimoblastoma), tumores del parénquima pineal (por ejemplo, pineocitoma, pineoblastoma), tumores de células ependimales, tumores del plexo coroideo, tumores neuroepiteliales de origen incierto (por ejemplo, gliomatosis cerebral, astroblastoma), etc. En una realización específica de la invención el tumor cerebral es un glioma, es decir, un glioblastoma.

Como se utiliza en el presente documento la expresión "tumor" se refiere a una masa anormal de tejido debido a un exceso anormal de divisiones celulares y la falta de muerte celular normal.

30 En una realización específica de la invención, el tumor es un tumor benigno o un tumor maligno, es decir, un tumor no canceroso o un tumor canceroso. La expresión "adenoma" se refiere a un tumor no canceroso. En una realización específica de la invención, el tumor es un carcinoma. Los carcinomas son tumores malignos derivados de células epiteliales.

35 Los métodos de la presente invención demuestran el carácter maligno de un tumor. Carácter maligno se refiere a un tumor maligno, es decir, un tumor canceroso. Los tumores malignos pueden ser agresivos, es decir, de crecimiento rápido y que posiblemente metastatiza. Se puede estudiar cualquier "subpoblación celular", que se refiere a una población restringida de células, para ver sus características de malignidad. La subpoblación celular se puede localizar en las células inflamatorias que infiltran el tejido.

40 En la presente invención, una muestra biológica puede ser cualquier muestra de tejido, tal como una biopsia del tejido o el ganglio linfático o una lesión tumoral metastática en cualquier órgano del cuerpo o en sangre entera. La muestra biológica también puede ser orina, heces u otra excreción corporal. La muestra biológica puede pretratarse, si fuera necesario, de una manera adecuada conocida por los expertos en la técnica.

45 La presente invención también se refiere a una predicción o un pronóstico. En una realización específica de la invención, la presencia de un tumor con un cambio en el número de copias NAV3 con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R o beta-catenina, se asocia con metástasis en ganglios linfáticos, alto grado de malignidad y/o poca supervivencia. En una realización específica de la invención el pronóstico es malo. "Pronóstico malo" se refiere a una alta expectativa de metástasis o diseminación tumoral, poca respuesta a las modalidades de tratamiento habituales y/o poca supervivencia. En un paciente con una predicción de poca supervivencia, la expectativa de vida es menor que en un correspondiente grupo de pacientes comparativo.

55 En los centros clínicos, se debe potenciar la capacidad de diagnosticar precisamente no solo el tipo de tumor sino los cambios genéticos, funcionales e inmunológicos que están presentes en un tumor en particular. Para una terapia más detallada, entonces se puede ajustar la elección de las moléculas terapéuticas o los anticuerpos a medida de ese tumor en particular. En otras palabras se necesita una medicina personalizada con una combinación de al menos dos fármacos que se dirijan contra diferentes moléculas.

60 Además se describen varios resultados aprovechables que se pueden utilizar además en el desarrollo de eficaces nuevos principios terapéuticos y diagnósticos. El hallazgo de que la regulación positiva de genes, que están regulados positivamente en la deficiencia de NAV3 y están implicados en la transformación en malignidad, se puede utilizar en la selección de una terapia racional para un cáncer determinado.

65 La decisión de cuáles alternativas terapéuticas se deberían utilizar, es decir, la selección de un tratamiento, puede basarse en el ensayo de malignidad del tumor por cambio en el número de copias de NAV3 (deleción del gen NAV3

que conduce al descenso de la expresión de NAV3) y por la regulación positiva de cualquiera de los genes o productos génicos seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina, los que se enumeran en las tablas 8-12 y la relación IL23/IL23R así como las rutas GnRHR.

5 Un método de tratamiento que además comprende una etapa, en la que el gen(es) o producto(s) génico(s) seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12 están afectados por una baja expresión o inactivación del gen(es) o producto(s) génico(s) o un descenso de la cantidad del producto(s) génico(s).

10 Un método de tratamiento que puede comprender además una etapa, en la que está afectado un gen o un producto génico de NAV3.

15 El gen o producto génico de NAV3 está afectado por sobreexpresión o activación del gen o del producto génico o el aumento de la cantidad del producto génico. El/los gen(es) y/o el/los producto(s) génico(s), es decir los seleccionados de NAV3, IL23R, GnRHR, beta-catenina y los que se enumeran en las tablas 8-12, están activados, inactivados, sobre expresados o bajo expresados, o la cantidad del producto génico está aumentada o disminuida, al menos están afectadas las rutas de señalización GnRH y/o JAK/STAT.

20 Cualquier molécula o moléculas terapéuticas se pueden utilizar para afectar los productos génicos diana; se utiliza un antagonista, anticuerpo o molécula inhibidora para afectar al menos a un producto génico. "Una molécula inhibidora" se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, una molécula pequeña inhibidora de ARN o un anticuerpo), que inhibe o reduce la acción de una diana, por ejemplo la molécula inhibidora es un ARNs. La regulación positiva de las proteínas asociadas a la membrana es de especial interés, ya que la terapia mediada por anticuerpos se utiliza actualmente ampliamente y los métodos para generar anticuerpos terapéuticos específicos de diana humanizados para moléculas diana están disponibles fácilmente.

25 Un método de tratamiento puede ser en forma de un medicamento convencional o se puede dar como terapia génica.

30 En terapia, se puede utilizar la restauración de la función normal de un gen. Esto se puede conseguir potenciando la expresión de genes funcionalmente homólogos, introduciendo un gen intacto o utilizando una forma alterada del gen o el oligonucleótido antisentido contra un gen por cualquier técnica disponible actualmente para la terapia génica para evitar la progresión de una enfermedad proliferativa. En particular, el crecimiento de las células tumorales se puede ralentizar o incluso pararse con tal terapia. Tales técnicas incluyen los métodos de terapia *ex vivo* e *in situ*, lo anterior comprende transducir o transfectar un gen intacto o alterado (o sus dominios funcionales) en forma de recombinante o de péptido o como oligonucleótidos antisentido o en un vector al paciente, esto último comprende la inserción del gen alterado o el oligonucleótido en un vehículo, el cual se introduce después en el paciente. Dependiendo de la enfermedad a tratarse, se puede conseguir una cura permanente o una cura transitoria. De manera alternativa, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o humanizados o péptidos unidos a una proteína diana para suprimir la función de la proteína y por tanto el crecimiento de las células tumorales puede ralentizarse o incluso pararse. Los anticuerpos contra una proteína diana podría también utilizarse para llevar otros agentes, tales como sustancias citotóxicas, a las células cancerosas con sobreexpresión del gen. Tales agentes podían utilizarse entonces para eliminar específicamente las células cancerosas.

45 Un tratamiento puede dirigirse a un gen o a un producto génico de NAV3 y/o a cualquier gen(es) o producto(s) génico(s) que se enumeran en la presente solicitud. Sin embargo, cualquier otro gen(es) o producto(s) génico(s) a lo largo de la ruta GnRHR y Jak/Stat también se pueden utilizar como dianas para la terapia.

50 Una molécula terapéutica tal como un antagonista, anticuerpo o molécula inhibidora se puede administrar sola o en combinación con otros agentes o composiciones. Además de cualquier molécula terapéutica, una composición farmacéutica que se administra a un paciente también puede comprender cualquiera de otros agentes terapéuticos eficaces, vehículos farmacéuticamente aceptables, tampones, excipientes, adyuvantes, antisépticos, disgregantes, estabilizantes o agentes espesantes, y/o cualquier componente que se encuentra normalmente en los productos correspondientes.

55 La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma, tal como forma sólida, semisólida o líquida, adecuada para su administración. La administración de un medicamento puede por ejemplo llevarse a cabo por medio de una administración oral o inhalada o a través de una inyección intratumoral, intramuscular, intra- arterial o intravenosa.

60 El sujeto a diagnosticar, pronosticar o apto para el uso de la invención es un ser humano o un animal. En una realización específica de la invención, el sujeto es un ser humano. En una realización específica de la invención, el sujeto tiene un adenoma colorrectal o un cáncer colorrectal. En otra realización específica de la invención, el sujeto tiene un tumor colorrectal, un tumor cerebral o un tumor de queratinocitos epiteliales.

65

**NAV3**

El NAV3 (navegador neuronal 3, también llamado POMFIL1) es un gen empalmado (40 exones) localizado en c12q21.1 y que se expresa en el tejido cerebral, células T activadas, placenta, colon y en ciertas líneas celulares de cáncer. La secuencia de aminoácidos de NAV3 se conserva bien entre diferentes especies, indicando que el NAV3 tiene un papel fundamental en los procesos celulares. La homología de la secuencia aminoacídica sugiere que el NAV3 participa en la señalización celular y en la supresión tumoral. El NAV3 es el homólogo humano de la proteína unc-53 de *C. elegans*, un mediador crítico de la migración celular. También los homólogos del NAV3, el NAV1 y NAV2 se unen a los filamentos intracelulares y regulan la expansión celular y la migración.

Las pruebas acumuladas sugieren que la destrucción del gen NAV3 contribuye a la progresión del cáncer. La expresión de la transcripción del NAV3 está regulada negativamente en un 40 % de los neuroblastomas primarios (Coy JF y col. 2002, Gene 290(1-2):73-94). El NAV3 también se elimina o transloca en varios subtipos de linfoma de células T cutáneas (CTCL) (Karenko L. y col. 2005, Cancer Res 65(18):8101-10; Hahtola S. y col. 2008, J Invest Dermatol 128(9):2304-9, Vermeer M.H. y col. 2008, Cancer Res 68(8):2689-98). Hemos identificado también cambios en el número de copias del gen NAV3 (deleciones/ amplificaciones) en cánceres de origen epitelial (Hahtola S y col. 2008, J Invest Dermatol 128(9):2304-9; Hahtola S y col. 2008, Genes Chromosomes Cancer 47(2):107-17; WO 2008059112 (A1)), y deleciones alélicas de NAV3 en cáncer colorrectal (Sipila L y col. 2008, EJC supplements 6(12) 118).

En una realización específica de la invención, el cambio en el número de copias de NAV3 está causado por una deleción, amplificación o translocación del gen NAV3 o su mayor parte. Los cambios en el número de copias del gen NAV3 se pueden determinar en células haploides, diploides y/o poliploides.

“Deleción” se refiere a la ausencia de cualquier fragmento(s) de un gen, lo que afecta adversamente la función del gen. “Deleción” también se refiere a la ausencia de un gen entero o ausencia del fragmento cromosómico que contiene el gen. En una realización específica de la invención, la deleción de NAV3 es una deleción total o parcial de NAV3.

“Amplificación” se refiere a una inserción de cualquier fragmento(s) de un gen en presencia de al menos una copia de ese gen. “Amplificación” también se puede referir a la amplificación de un gen completo o de un fragmento cromosómico que contiene el gen. En una realización específica de la invención, la amplificación de NAV3 es una amplificación total o parcial del NAV3. La amplificación de un gen puede ser detectada por ejemplo por un cambio en el número de copias del gen.

“Translocación” se refiere a una transferencia de regiones cromosómicas entre dos cromosomas no homólogos. El NAV3 puede translocarse parcialmente, totalmente o como una parte del fragmento cromosómico más grande que comprende el NAV3.

De acuerdo con el método de la presente invención, la presencia o ausencia de un cambio en el número de copias de un gen se puede detectar en una muestra biológica por cualquier método de detección conocido adecuado para detectar deleciones o amplificaciones. Tales métodos son fácilmente reconocidos por los expertos en la técnica e incluyen hibridaciones fluorescentes *in situ*, tales como hibridaciones fluorescentes multi color *in situ*, hibridación multifluorescente *in situ* (MFISH), cariotipado espectral (SKY), relación binaria combinada de marcaje (COBRA), cariotipado con cambio de color (CCK). En la hibridación genómica comparativa (CGH) los cambios genéticos se clasifican como pérdidas o ganancias de ADN. La CGH revela un patrón característico que incluye aberraciones a niveles cromosómico y subcromosómico. Las técnicas convencionales de banda-G también se pueden utilizar en los casos en los que se prevé que una detección grosera de pérdidas o ganancias es suficiente. Los métodos preferidos son aquellos que son adecuados para su uso en laboratorios clínicos

Se puede utilizar cualquier método de detección adecuado para detectar la expresión génica de cualquier gen o número de copias de NAV3, es decir, métodos que se basan en la detección del número de copias del gen (o ADN) y/o aquellos basados en la detección de los productos de la expresión génica (ARNm o proteínas) en los métodos de la presente invención. Tales métodos son fácilmente reconocidos por los expertos en la técnica e incluyen métodos convencionales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR RT, hibridaciones *in situ*, tales como FISH, hibridación de ARNm *in situ*, análisis de Northern, análisis de Western y Southern, inmunohistoquímica, y otros inmunoensayos, tales como ELISA. Los métodos preferidos son aquellos adecuados para su uso en los laboratorios clínicos rutinarios.

Los análisis de LOH también se pueden utilizar para detectar cambios en el número de copias de un gen. Como se utiliza en el presente documento “pérdida de heterocigosidad (LOH)” se refiere a la pérdida de la contribución de uno de los parentales a parte del genoma de la célula. La LOH se puede considerar como un evento para desenmascarar un alelo mutante de un gen que puede tener un papel en la supresión de la formación de un tumor. Por tanto, la LOH es un importante marcador para la iniciación de un tumor o su progresión. La LOH en cánceres se puede identificar por la presencia de heterocigosidad en un locus genético de la línea germinal de ADN y la ausencia de heterocigosidad en el mismo locus de las células tumorales.

En una realización específica de la invención, el cambio en el número de copias se confirma por FISH, LOH, CGH, análisis secuencial, inmunohistoquímica, PCR, PCRq o micromatriz tisular.

- 5 Los marcadores adecuados para detectar la expresión de un gen o los cambios en el número de copias incluyen cualquier marcador biológico tal como los marcadores microsátélites, marcadores SNP, cualquier sonda, cebador o anticuerpo asociado con un gen diana.

### Efectos de las aberraciones de NAV3

- 10 Los resultados del presente estudio también confirman que las aberraciones en el NAV3 son comunes en varios tumores y cánceres. Nosotros utilizamos tres métodos diferentes para buscar los cambios en el número de copias de NAV3; LOH, matriz CGH, y FISH. Cuando el método es FISH, observamos células con cambios en el número de copias en el cromosoma 12 y el gen NAV3 en un número sustancial de casos con carcinomas colorrectales (CRC). De manera importante, se detectó también la delección de NAV3 en el 23 % de las muestras de adenoma. Sin embargo, los hallazgos mostraron en todos los casos una población heterogénea de células tumorales que consisten principalmente en células con características diploides normales y células anormales con un número variable de marcas en el cromosoma 12 y/o NAV3. En este caso, una delección alélica o una amplificación del gen es diferente que en, por ejemplo, la situación de tumores homogéneos con mutaciones en los genes supresores de tumores. Es importante señalar que este tipo de aberraciones en el número de copias se puede observar solamente con el método FISH, que analiza células individuales, pero en la mayoría de los casos no con matriz CGH o con LOH, dos métodos que necesitan que más del 40 % de las células en la muestra muestren el mismo tipo de aberración. Nuestrs hallazgos a partir de una serie de muestras de tejido sin selección clínica están sin contabilizar por el hecho de que se observaron polisomías del cromosoma 12 y cambios en el número de copias de NAV3 similares también en tres líneas celulares establecidas de CRC del tipo MSS y en una línea celular del tipo MSI.

- 25 En los casos de carcinoma patente, los casos con aberración en NAV3 mostraron claramente más metástasis en ganglios linfáticos.

- 30 En el presente estudio, en los pólipos adenomatosos, los casos de pérdida de NAV3 se veían más a menudo que por los criterios clásicos (tamaño, diferenciación) indicando un alto riesgo para la transformación maligna posterior.

- 35 Para entender los efectos de la regulación negativa del NAV3 en los perfiles de expresión génica y para caracterizar los efectos de la delección de NAV3 *in vitro*, silenciamos la expresión de NAV3 por interferencia del ARN en células epiteliales normales de colon, una línea celular de glioblastoma establecida, una línea celular de glioblastoma derivada de nuevo, y queratinocitos primarios humanos carentes de infección por virus de papiloma humano. Se analizaron los perfiles de expresión génica en varios puntos temporales después de la transfección utilizando la micromatriz Agilent de doble color 4 x 44K. Con esta estrategia, el silenciamiento del gen NAV3 da lugar a una regulación positiva consistente de 39 genes en las células del colon, mientras que 28 genes se regularon positivamente en las células gliales. Entre estos estaban los receptores IL23 y GnRH, y los análisis PathwayExpress sugerían que las rutas GnRH y Jak-Stat eran dianas de NAV3. Cuando los resultados de todas las líneas celulares se combinaron, 49 genes, incluyendo GnRHR e IL23R estaban regulados positivamente en 7 de 10 muestras, al menos una vez en cada tipo celular. En total, 17 genes incluyendo el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHR) y el receptor de interleucina 23 (IL23R) estaban regulados positivamente en todos de los ocho experimentos con células de colon y gliales.

- 45 El silenciamiento del ARNsi del NAV3 imita la delección alélica encontrada *in vivo* y por tanto, la regulación positiva de las dos moléculas de receptores, GnRHR y IL23R, de los que se sabe que ambos están implicados en los procesos oncogénicos así como en las reacciones inflamatorias / inmunes, tiene una importancia potencial tanto para el inicio del proceso maligno como para la determinación del comportamiento biológico de las células malignas.

- 50 De manera importante, en los tumores MSS, la inmunorreactividad de la regulación positiva de IL23R se correlaciona con la estadificación de Dukes ( $p < 0,001$ ) y la metástasis en ganglios linfáticos ( $p < 0,001$ ), mientras que la beta-catenina nuclear se correlaciona solo con la metástasis en ganglios linfáticos ( $p = 0,045$ ). El ensayo de rango logarítmico identificó la inmunorreactividad de la regulación positiva de IL23R como un marcador favorable ( $p = 0,009$ ).

- 60 Además, hay una depleción de NAV3 que está ligada a la inflamación tisular del crecimiento tumoral por regulación positiva de los mediadores inflamatorios IL23R, vanina 3, y CYSLTR2. Nuestros hallazgos sugieren por tanto que los cambios en el número de copias de NAV3 están directamente implicados en la carcinogénesis precoz mientras se encuentra en un microambiente de inflamación, el IL23R regulado positivamente da una ventaja al crecimiento de la célula maligna.

### GnRHR

- 65 El GnRHR es un receptor de una hormona gonadotropina autocrina que estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por las

células gonadotropas hipofisarias (Yeung CM y col. 2005, Mol Hum Reprod 11(11):837-42). Además de las células gonadotropas hipofisarias, se sabe que el GnRHR se expresa en la superficie de los linfocitos, células mamarias, ováricas y prostáticas. Una multitud de informes recientes demuestran que el eje GnRH-GnRHR está activo también en células extra-hipofisarias, y se ha observado la regulación positiva de GnRHR en muchos cánceres, especialmente en carcinomas (Harrison GS y col. 2004, Endocr Relat Cancer 11(4):725-48). Se cree que la activación de GnRHR lleva primero a la activación de los genes inmediatos tempranos (IE) que afectan las rutas de la beta-catenina y del factor de células T (TCF) (Salisbury TB y col. 2008, Mol Endocrinol 22(6):1295-303). La beta-catenina, un miembro de la ruta canónica de señalización Wnt, también juega un papel esencial en la transducción de la señal GnRH (Salisbury TB y col. 2008, Mol Endocrinol 22(6):1295-303) por medio de la inactivación de la glucocén sintasa quinasa-3, que regula la degradación de la beta-catenina (Gardner S y col. 2009, Neuroendocrinology 89(3):241-51). Por otra parte, varios informes demuestran que el aumento de los niveles de expresión de beta-cateninas afecta a la metástasis en los ganglios linfáticos de tumores (Buhmeida A y col. 2008, APMIS 116(1):1-9).

En nuestro material de los pacientes, la expresión de beta-catenina nuclear se encontró sorprendentemente asociada a las aberraciones de NAV3 y correlacionada con la metástasis a los ganglios linfáticos. También nuestra identificación de la GnRH como una molécula diana regulada por NAV3 representa una ruta candidata para la prevención y terapia del carcinoma.

## IL23R

La identificación de IL-23R está ligada a la señalización JAK-STAT y apoya nuestra hipótesis de que el microambiente tisular proinflamatorio afecta el crecimiento potencial y la diseminación de las células tumorales. El ligando IL-23 del IL-23R se segrega en las células inflamatorias activadas, tales como macrófagos y células dendríticas. El heterodímero IL23R está compuesto por un receptor IL-12 beta 1 (IL-12Rbeta1) y una cadena IL-23R (designada IL-12Rbeta2) (Beyer BM y col. 2008, J Mol Biol 382(4):942-55); la última de los cuales está regulada positivamente en las células con NAV3 silenciado. Ambos JAK2 y STAT3 se asocian con IL-23R. El JAK2 fosforila el receptor en respuesta a IL-23 y los dímeros STAT3 activados se translocan al núcleo y se unen al IL-23R de una manera dependiente de ligando. La ruta JAK/STAT también está activada por mutaciones en los genes corriente arriba y se ha demostrado que se activan constitutivamente en varios procesos malignos humanos (Constantinescu SN y col. 2008, Trends Biochem Sci 33(3):122-31; Li WX. 2008, Trends Cell Biol 18(11):545-51).

Las pruebas acumuladas recientemente sugieren que la IL-23 pueden redirigir las respuestas de las células T citotóxicas hacia las rutas de efector proinflamatorio, que alimentan el tumor en vez de luchar contra él (Langowski JL y col. 2006, Nature 442(7101): 461-5). En consecuencia, las células tumorales que expresan IL-23 es probable que ganen una ventaja para crecer y persistan incluso en presencia de células T específicas del tumor. El IL-23R también se ha ligado a enfermedad inflamatoria del intestino grueso (IBD). En los niños con enfermedad de Crohn precoz, se ha demostrado que los niveles en la mucosa de IL12p40 y ARNm IL23R son significativamente más altos que en la enfermedad tardía (Kugathasan S y col. 2007, Gut 56(12): 1696-705). Es interesante el que se haya ligado la IBD con un aumento del riesgo de CRC y otros cánceres (Lakatos PL y col. 2008, World J Gastroenterol 14(25): 3937-47; Hemminki K y col. 2008, Int J Cancer 123(6): 1417-21).

La comunicación entre las células inflamatorias del tejido y las células epiteliales durante el inicio del cáncer se demostró por medio de la pérdida de células T dependientes de la señalización de Smad4, dando lugar a cánceres epiteliales espontáneos en el tracto gastrointestinal de ratones (Kim BG y col. 2006, Nature 441(7098):1015-9). Las células T Smad4 <sup>-/-</sup> producen IL-6, que activa la ruta de señalización JAK/STAT como el complejo IL23/IL23R. La señalización L-6/STAT3 también ha demostrado recientemente que tiene un papel pivotante en la formación de tumores en modelos de ratón de cáncer asociado a colitis (Grivnenkov S y col. 2009, Cancer Cell 15(2):103-13).

## Otros genes diana

Además de GnRHR e IL23R, hay cinco genes ligados a la carcinogénesis (*ARL11*, *SMR3B*, *FAM107A*, *MFSD2* y *BCLB6*) y dos genes ligados a la inflamación (*CYSLTR2* and *VNN3*) que han mostrado que están regulados positivamente por el silenciamiento de NAV3 en el presente estudio. Se ha demostrado recientemente que los polimorfismos en la región MYCL1 LD, incluyendo *MFSD2*, afectan las tasas de supervivencia en el cáncer de pulmón aunque los genes *MFSD2* muestran diferencias étnicas en las frecuencias alélicas (Spinola M y col. 2007, Lung Cancer 55(3):271-7). Se ha demostrado recientemente que la varina-1 epitelial controla la carcinogénesis en el modelo de ratón de cáncer de colon asociado a colitis (Poyet y col, 2009), y los niveles de expresión tanto la varina-1 y la varina-3 están potenciados por las citoquinas proinflamatorias en las células cutáneas con psoriasis (Jansen PA y col. 2009, J Invest Dermatol Mar 26). En este contexto, es interesante señalar que tanto los grupos de pacientes con psoriasis como celíacos tienen un aumento en el riesgo de cáncer (Grulich AE y Vajdic CM. 2005, Pathology 37(6): 409-19). La regulación positiva del grupo de proteínas asociadas a la membrana y sus dianas corriente abajo es de especial interés.

En la presente invención, al menos un gen o un producto génico seleccionados de IL23R, GnRHR y beta-catenina se selecciona para sus métodos, medios o usos. En una realización específica de la invención, el gen(es)

5 seleccionado de IL23R, GnRHR, beta-catenina codifican una proteína, que es una proteína de membrana, una proteína que regula procesos celulares, o una proteína que se une a nucleótidos purínicos. También se describen métodos y usos en los que el gen o producto génico se selecciona de entre el grupo que consiste en ARL11, SMR3B, FAM107A, MFSD2, BCLB6, CYSLTR2, VNN3, GNGT1, DNER, GnRHR, IL23R, beta-catenina, JAK1 y JAK3. En otra realización específica de la invención el gen o producto génico es IL23R y/o GnRHR.

10 En una realización específica de la invención, la combinación del gen o el producto génico es al menos IL23R, GnRHR y beta-catenina. En una realización específica de la invención la combinación del gen o el producto génico es IL23R, GnRHR y beta-catenina.

15 En una realización específica de la invención, la combinación del gen o el producto génico es de todos los 49 genes o productos génicos que se enumeran en la tabla 9. En otra realización específica de la invención, la combinación del gen o el producto génico es de los 17 genes o productos génicos que se enumeran en la tabla 8. En una realización específica de la invención, la combinación del gen o el producto génico es de todos los 14 genes o productos génicos que se enumeran en la tabla 10. En una realización específica de la invención la combinación del gen o producto génico es de todos los genes o productos génicos que se enumeran en la tabla 11. En una realización específica de la invención, la combinación del gen o producto génico es de todos los genes o productos génicos que se enumeran en la tabla 12.

20 Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar más la invención. Será obvio para un experto en la técnica que, como en los avances tecnológicos, el concepto inventivo se puede llevar a cabo de varias maneras. La invención y sus realizaciones no están limitadas por los ejemplos descritos a continuación sino que pueden variar dentro del ámbito de las reivindicaciones.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1. Muestras de tejidos, células y líneas celulares

#### 30 *Muestras de tejidos*

##### Muestras de tumor colorrectal

35 Se estudiaron por FISH, LOH e inmunohistoquímica las muestras quirúrgicas para biopsia de 59 pacientes (61 muestras de CRC y 10 de adenoma) que se operaron de CRC en el Mikkei Central Hospital. El estudio fue aprobado por la Oficina de Revisión Étnica del Mikkei Central Hospital y por la National Authority for Medicolegal Affairs. La histología de las muestras de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina fue verificada por un patólogo experimentado (MH) y los tumores, adenomas o mucosa normal se microdisecaron para obtener tejido normal puro o al menos con una relación del 50 % de carcinoma o adenoma. Las secciones embebidas en parafina se cortaron con un espesor de 50  $\mu\text{m}$  y los núcleos se aislaron por análisis FISH y el ADN se purificó con el análisis LOH siguiendo los protocolos de referencia (Hyytinen E y col. 1994, Cytometry 16: 93-96; Isola J. y col. 1994, Am. J. Pathol 145: 1301-1308). Todos los adenomas eran MSS mientras que 14 de los 56 carcinomas tenían un alto grado MSI.

45 Se utilizaron marcadores repetidos de mononucleótidos BAT25 y BAT26 del panel de Bethesda (Boland y col., 1998, Cancer Res 58: 5248-5257), suplementado con 5 marcadores de repetición de dinucleótidos (D12S1684, D12S326, D12S1708, D18S474, y D9S167), para determinar el estatus de inestabilidad microsatélite (MSI). Las muestras con al menos dos marcadores no estables se consideraron que tenían MSI, mientras que aquellos con un marcador no estable o ninguno se consideraron de microsatélite estable (MSS).

50 Se incluyeron los siguientes parámetros en los análisis estadísticos: grado del tumor, estadio tumoral de Dukes, y clasificación por TNM como define la Sociedad Americana contra el Cáncer ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)), la presencia de metástasis en ganglios linfáticos, el tiempo de seguimiento (meses) y el resultado clínico (vivo, muerto por otro motivo o muerto por la enfermedad).

##### 55 Muestras de tumor cerebral

60 Las muestras para el ensayo FISH se prepararon a partir de 119 casos de tumor cerebral. Los casos consistían en 55 astrocitomas, 20 oligodendrogliomas, 13 ependimomas, 18 meduloblastomas, y 13 neuroblastomas. Todos las muestras de tejido se habían procesado por fijación rutinaria en formalina y embebidas en parafina.

65 Las secciones embebidas en parafina se cortaron con un espesor de 50  $\mu\text{m}$  y los núcleos se aislaron para el análisis FISH siguiendo los protocolos de referencia (Hyytinen E y col. 1994, Cytometry 16: 93-96; Isola J. y col. 1994, Am. J. Pathol 145: 1301-1308).

**Células, líneas celulares y cultivos celulares**

Se cultivaron células normales de colon CRL-1541 y CRL-1539 (ATCC, Manassas, VA, EE. UU), la línea celular de glioblastoma A172 derivada de un glioblastoma grado 4, y queratinocitos epidérmicos primarios (todos de ATCC, Manassas, VA, EE. UU) como instruye el ATCC para no más de 30 pasajes. También se cultivaron las líneas celulares de cáncer colorrectal CCL-228 (SW480), CCL- 230 (SW403), CCL-248 (T84), RKO, LIM1215, y HCA7 (ATCC, Manassas, VA, EE. UU) como instruye el ATCC. Entre las líneas celulares de CRC se sabe que RKO, LIM1215, y HCA7 son deficientes en reparar incompatibles y tienen MSI.

Las células recientes de un glioblastoma 4 multiforme extraído perioperativamente se utilizó para derivar la línea celular 0205. El tejido tumoral se disoció mecánicamente, y las células se cultivaron en DMEM sin suero añadido, suplementado con la mezcla de nutrientes F12 (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EE. UU), Fungizona 2,5 µg/µl (Apotekon, NJ, EE. UU), B27 (Gibco/ Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 20 ng/ml (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EE. UU), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) 40 ng/ml (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EE. UU), penicilina-estreptomina 100 U/ml, (Biowhittaker, Verviers, Bélgica) y Glutamax (1x) (Gibco/ Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU). Tras cinco pasajes, emergió una población de clones en la preparación del caldo, y se congelaron alícuotas. Para todos los experimentos posteriores, las alícuotas preparadas se descongelaban, y solo se utilizaron las células del cultivo con menos de 20 pasajes. La expresión de los marcadores neuronales (proteína ácida fibrilar glial y tubulina neuronal clase beta) se evaluó por inmunotinción. La recolección de las células fue aprobada por el comité ético de Helsinki y el distrito del hospital Uusimaa, y se consiguió un consentimiento informado de los pacientes.

**Ejemplo 2. Análisis FISH y LOH****25 FISH (hibridación in situ de fluorescencia)**

Se estudiaron con FISH multicolor las líneas celulares CRL-1541, CRL-1539 y A172 para ver si había cambios en el número de copias de NAV3 como se había descrito anteriormente (Karenko L y col. 2005, Cancer Res 65:8101-10). Los análisis FISH también se llevaron a cabo en el tejido tumoral del que se estableció la línea celular 0205.

Además, se llevó a cabo un ensayo FISH específico de NAV3 en los núcleos aislados de las muestras de pacientes (61 CRC y 10 adenomas) y sobre los cromosomas en metafase de las líneas celulares de carcinoma de colon (CCL-228, CCL-230, CCL-248, RKO, LIM1215 y HCA7). Se usaron los clones específicos para ADN NAV3 del cromosoma artificial bacteriano (BAC) (RP11-36P3 y RP11-136F16; Research Genetics Inc., Huntsville, AL, EE. UU) y la sonda del centrómero del cromosoma 12 (pA12H8; American Type Cell Culture) y se marcaron con Alexa 594-5-dUTP y Alexa 488-5'-dUTP (Invitrogen), respectivamente (muestras de pacientes) o con digoxigenina o biotina (metafases de líneas celulares). Los métodos detallados para el marcado con sondas, la preparación de portaobjetos para el ensayo FISH, y el uso de MFISH específica de brazo se muestran a continuación.

También, se llevó a cabo el ensayo FISH específico de NAV3 sobre los núcleos aislados de las muestras de 119 casos de tumor cerebral. Los métodos detallados para el marcado con sonda, la preparación de portaobjetos para el ensayo FISH, y el uso del MFISH específico de brazo se muestran a continuación.

**Marcado con sonda.** Para analizar las muestras de los pacientes se marcaron dos clones cromosómicos artificiales bacterianos específicos de ADN NAV3 (RP11-36P3 y RP11-136F16; Research Genetics Inc., Huntsville, AL, EE. UU) con Alexa 594-5-dUTP y Alexa 488-5-dUTP (Invitrogen), respectivamente, utilizando traducción Nick. Se mezclaron el BAC y las sondas de centrómero junto con ADN COT-1 (Invitrogen), se precipitaron y se diluyeron en el tampón de hibridación (15 % p/v de sulfato de dextrano, 70 % de formamida en 2 x SSC, pH 7,0).

Para analizar las líneas celulares las sondas BAC específicas de NAV3 (véase anteriormente) se prepararon y marcaron con digoxigenina y se preparó la sonda específica de centrómero 12 y se marcó con biotina o dUTP conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) por traducción de Nick como se había descrito anteriormente (Karenko y col. 2005) o de manera similar con Dietilaminocumarín-5-dUTP (DEAC, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, EE. UU).

**Métodos FISH.** Las preparaciones de núcleos se pretrataron con tiocianato sódico 1 M a +80 °C durante 5 minutos, se lavó tres veces con 2 x SSC, tratado con glicerol al 50 %, 0,1 x SSC a +90 °C durante 6 minutos, se lavó con 2 x SSC durante 3 minutos y tres veces con agua destilada durante 2 minutos. Las preparaciones se digirieron con proteinasa K (Sigma; 8 µg/ml en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 2 mM) a +37 °C durante 8 minutos. Después de la deshidratación y el secado con aire, se añadió la mezcla de sonda, las preparaciones se desnaturalizaron durante 6 minutos a +85 °C y se hibridó durante 48 h a ± 37 °C. Se lavaron las preparaciones tres veces con Urea 1,5 M, 0,1 x SSC a +47 °C durante 10 minutos, con 0,1 x SSC durante 10 minutos a +47 °C, tres veces con PBS, 0,1 % NP a temperatura ambiente, aclarado con agua destilada, secado con aire y montado en un medio Mounting Vectashield con dihidrocloruro de 4', 6- diamino- 2 fenilindol (DAPI; Vector).

65

Las preparaciones FISH de las muestras de los pacientes se evaluaron utilizando el microscopio Olympus BX51 equipado con un objetivo de inmersión de 60 x y un triple filtro de paso de banda para la detección simultánea de Alexa 488, Alexa 594 y DAPI (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT, EE. UU).

5 Las preparaciones convencionales en metafase se prepararon para la FISH como se había descrito anteriormente (Abdel-Rahman W. M. y col. 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98: 2538-43). La hibridación de las sondas y la detección de las sondas NAV3 marcadas con digoxigenina y las sondas específicas del centrómero 12 marcadas con biotina, se llevaron a cabo con avidina-FITC (Vector laboratories, Burlingame, CA, EE. UU) y con anti-digoxigenina de oveja conjugada con rodamina (Roche, Mannheim, Alemania) como se ha descrito anteriormente (Karenko y col. 2005).  
10 Se llevó a cabo el M FISH específico de brazo con el kit XaCyte (Metasystems GmbH, Altlußheim, Alemania) como recomienda el fabricante). Las metafases hibridadas se analizaron con un microscopio de epifluorescencia (Axioplan Imaging 2, Zeiss, GmbH, Jena, Alemania, equipado con cámara-CCD), y con el módulo de programa M FISH (Isis, Metasystems, Altlußheim, Alemania) sea manualmente o utilizando un aparato de captura automática (Metafer, Metasystems, Altlußheim, Alemania).

15

### **Evaluación de los resultados FISH**

Las preparaciones FISH de pacientes derivadas de muestras de tumores colorrectales y cerebrales fueron analizadas, sin revelar la identidad de las muestras, por dos analizadores independientes. Los resultados se indican como el porcentaje de células anormales en un número total de 200 recuentos de núcleos celulares. Las células con dos señales del cromosoma 12 (células diploides) y solo una señal para NAV3 y células con más de dos señales de cromosoma 12 pero con un número menor de señales NAV3 (por ejemplo, tres señales de centrómero de cromosoma 12 y una señal NAV3) se interpretaron como células con delección de NAV3. Las muestras que mostraron más frecuentemente señales NAV3 que señales de centrómero 12 se interpretaron como células con  
20 amplificación NAV3. Una muestra se consideraba aberrante NAV3 si el porcentaje de las células de interfase que mostraban una amplificación era mayor del 7 % o si el porcentaje de las células de interfase que mostraban delección era mayor del 4 % (calculado a partir de la distribución normal de los resultados de muestras normales como la media + 3 desviaciones estándar). Para las líneas celulares CCL-228, CCL-230, CCL-248, RKO, LIM1215 y HCA7 se analizaron diez de 47 metafases para ver NAV3 y centrómero 12, y se analizaron 6 a 11 metafases por MFISH de  
25 brazo.

30

### **Análisis LOH NAV3 utilizando marcadores microsatélite y extensión de cebador de nucleótido único, SnuPE**

El ensayo LOH NAV3 se llevó a cabo en muestras de tumor colorrectal como se había descrito anteriormente (Hahtola S y col. 2008, J Invest Dermatology 128: 2304-9). Además, se utilizó el polimorfismo A/G (rs1852464) en el exón 19 del gen NAV3 que muestra hasta el 0,493 de heterocigosidad en los Caucásicos/Europeos en la reacción SnuPE.

35

Las muestras de ADN se amplificaron primero por PCR utilizando los cebadores rs1852464F 5' CCTGCTATTTTCATCTTTCAAGC 3' (SEC ID N° 1) y rs1852464R 5' GGCTGGGATGCTGTTTGAG 3' ((SEC ID N° 2) para obtener un fragmento PCR de 130 pb que contenía el polimorfismo A/G. El producto de la PCR se purificó posteriormente por Exonucleasa I (10 U/ $\mu$ l) (ExoSAP-IT, Amersham Biosciences) y se llevó a cabo la Extensión PCR utilizando un cebador de extensión marcado con fluorescencia 5' GATGCTGTTTGAGCGCAT-CATGCTGGGCC 3' (SEC ID N° 3) y una mezcla de nucleótidos conteniendo ddCTP. Los productos de la extensión fueron de 43 pb o 49 pb dependiendo de si estaba presente G o A en la matriz y se separaron y el resultado se analizó como se había descrito anteriormente (Hahtola y col. 2008, J Invest Dermatology 128: 2304-9).

45

Una muestra se valoró como que mostraba LOH, si uno de los alelos en la muestra de tumor tenía un 40 % o más de disminución de señal a rs1852464 o, en el caso de homocigosidad constitucional por su marcador, en sus marcadores microsatélite adyacentes al compararse con su coincidencia normal (Cleton-Jansen A. M. y col. 2001, Cancer Res 61: 1171-7).

50

### **Se encuentran anomalías NAV3 correspondientes en adenomas y carcinomas colorrectales que aparecen en el mismo paciente cuando se utilizan métodos FISH y LOH**

55 La comparación del número de copias de NAV3 entre las muestras de adenoma y carcinoma de un determinado paciente, obtenidas en la misma operación quirúrgica en todos menos en dos casos revelaron que la delección de NAV3 se detectaba frecuentemente por la técnica FISH también en el estadio de adenoma (**Figura 1**). Sin embargo, la cantidad de células aberrantes NAV3 siempre fue mayor en la lesión histológicamente maligna. De forma similar, en 2 de 3 adenomas con LOH, los carcinomas coincidentes mostraban un patrón principalmente similar de LOH.  
60 Esto sugiere que adenomas histológicamente benignos que tienen células con aberraciones NAV3 pueden ya tener propiedades de crecimiento maligno.

**Se encuentran cambios en el número de copias de NAV3 en CRC y en adenomas colorrectales utilizando métodos FISH o LOH**

Se detectaron células con cambios en el número de copias NAV3 en el 40 % de las muestras con carcinoma colorrectal tipo MSS; se detectaron células que tenían tanto delección de NAV3 como amplificación en el 15 % de las muestras mientras que el 15 % de las muestras mostraba solamente delección de NAV3 y el 10 % tenía solamente un bajo nivel de amplificación de NAV3 (tres a cinco copias). Las células con delección de NAV3 también se detectaron en el 12,5 % de las muestras del tipo MSI y en el 23 % de las muestras de adenoma. Además, se detectaron células con polisomía del cromosoma 12 más a menudo en tres o cinco copias, en el 70 % de las muestras con carcinoma colorrectal tipo MSS, en el 50 % de las muestras tipo MSI y en el 31 % de las muestras de adenoma. Los resultados de la FISH se ilustran en la **Figura 2**.

Los cambios en el número de copias de NAV3 en las células de carcinoma de colon se confirmaron por el ensayo LOH. La LOH se detectó en el 21 % de los carcinomas MSS y en el 18 % de las muestras de adenoma simple. Los resultados de cada marcador se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Resultados de LOH NAV3 para cada marcador**

	<b>D12S1684</b>	<b>D12S26</b>	<b>SNUPE@rs1852464</b>	<b>D12S1708</b>
CRC, MSS	8/37 (22 %)	10/33 (30 %)	4/23 (17 %)*	5/29 (17 %)
CRC, MSI	0/3	0/2	0/7*	0/4
Adenoma	1/21 (5 %)	2/19 (11 %)	0/8*	2/16 (13 %)

\* Las frecuencias de LOH se calcularon solo para casos informativos. El ensayo SNUPE era no informativo debido a la homocigosidad constitucional en 5 carcinomas y en todos los adenomas que mostraron LOH examinados por microsatélites del cromosoma 12

**Se encontraron cambios en el número de copias de NAV3 o translocaciones, como se demostró por FISH, en líneas celulares establecidas de CRC**

Se analizaron seis líneas celulares establecidas de CRC diferentes (CCL-228, CCL-230, CCL-248, RKO, LIM1215 y HCA7) y dos líneas celulares de colon normal (CRL-1541 y CRL-1539) con una FISH específica de NAV3 (**Tabla 2**). Las líneas celulares normales de colon CRL-1541 and CRL-1539 no mostraron señales aberrantes para NAV3 en relación con las señales del centrómero del cromosoma 12 pero en CRL-1539, el 8 % de las células eran tetrasómicas para ambas señales. Tres líneas celulares (SW403, RKO, T84) mostraron una porción notable de metafases con pérdida de NAV3 (SW-403 y T84 90 % o más y RKO mas del 40 % de metafases; **Tabla 2** y **Figura 3**). La línea CCL-228 casi diploide mostro normalmente un cromosoma 12 normal, dos cromosomas anormales con pérdida de una señal NAV3 y un cromosoma anormal con señal NAV3 pero sin señal de centrómero del cromosoma 12. Se observó una translocación de NAV3 a otro cromosoma, interpretado como t (2; 12) por MFISH de brazo, en todas las metafases excepto en una (Tabla 2, Figura 3).

**Tabla 2. Sumario de las metafases de la línea celular de CRC que muestran aberraciones numéricas de NAV3 o de centrómero 12.**

<b>Línea celular</b>	<b>Tipo</b>	<b>Nivel de ploidía más común, y frecuencia de tales metafases/todas las metafases, intervalo de número de citrososoma</b>	<b>Resultado de FISH NAV3 por sondas BAC</b>	<b>Resultados de MFISH de brazo, MFISH o YAC</b>
CCL-230 =SW403	CIN	casi triploide, 11/15, intervalo 34 a 212	Pérdida de NAV3 en 14/15 metafases	Desequilibrado Der (12) t (12; 15) (p13?: q?) del(12)(q15 o 21) en 6/6 metafases
CCL-248 =T84	CIN	casi diploide, 7/10, intervalo 75 a 114	Pérdida de NAV3 en 9/10 metafases	Del(12)(q?q?) en 5/5 metafases en MFISH de brazo, delección por YAC FISH en 10/10 metafases
CCL-229	CIN	casi diploide, 6/10, intervalo 34-183	Fragmentación o amplificación de centrómero 12 en 10/10 metafases	der(2)t(2;12) (Reuter J.A. y col. 2009, Cancer Cell 15: 477-88), Der(10)t(3;12;10) (Chung D.C. 2000 Gastroenterology 119: 854-65), i(12)(p) (Kim B.G. y col. 2006, Nature 441,1015-1019), inv(12)(p12q12or13) Del(12)(p?)Del(12)(q?) (Fearon E. R. y Vogelstein B, 1990, Cell 61: 759-67)

RKO MSI casi diploide, 34/47, intervalo 15 a 90 Pérdida de NAV3 en der(12)t(2;12) desequilibrado en 21/47 metafase 6/11 metafases estudiadas

Las líneas celulares LIM1215 (MIN) y HCA7 (MIN) muestran tantas señales de centrómero 12 como de NAV3 (27/27 y 27/29 metafases estudiadas, respectivamente), como ocurre con el cromosoma clon 12q+ en HCA7 observado previamente (Abdel-Rahman W.M. y col. 2001. Proc Natl Acad Sci USA 98: 2538-43) que mostraba señal NAV3 en el presente estudio.

**Aberraciones en NAV3 de las muestras colorrectales asociadas con polisomía del cromosoma 12 y con metástasis en los ganglios linfáticos**

5 Las aberraciones de NAV3 de las muestras colorrectales se correlacionan con la polisomía en el cromosoma 12 y la metástasis en los ganglios linfáticos con significación estadística (**Tabla 3**). Además, la polisomía en el cromosoma 12 se produce más a menudo en tumores con alto grado de malignidad (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Correlaciones entre las variables de los análisis FISH, tumores de colon y resultado de los pacientes entre las muestras de CRC. El ensayo exacto de Fisher (de dos lados) se utilizó si no se indica otra cosa. Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo utilizando las muertes producidas por el cáncer de colon como punto de corte primario.**

	Polisomía del cromosoma 12	Grado tumoral	Grado de Dukes	Metástasis en ganglios linfáticos	Resultado del paciente (pronóstico)
Cambio en el número de copias de NAV3	p = 0,006	ns <sup>1)</sup>	ns	p = 0,019	ns
Polisomía en el cromosoma 12		p = 0,019	ns	ns	ns
Expresión de beta-catenina nuclear	ns	ns	ns	p < 0,05	ns
Inmunorreactividad de IL23R regulado positivamente <sup>2)</sup>	ns	ns	p < 0,001	p < 0,001 <sup>2)</sup>	p = 0,009 <sup>3)</sup>
1) ns = no significativo estadísticamente 2) correlación analizada para el grupo de pacientes MSS 2) Prueba de chi cuadrado, exacto, de dos lados 3) Ensayo de rango logarítmico					

10 **Se encontraron cambios en el número de copias del gen NAV3 en tumores cerebrales**

Se analizaron en total 119 casos de tumor cerebral de los cuales 55 eran astrocitomas, 20 oligodendrogliomas, 13 ependimomas, 18 meduloblastomas, y 13 neuroblastomas para ver los cambios en el número de copias del gen NAV3 y polisomía en el cromosoma 12 utilizando FISH (véase **Tabla 4**). Los niveles de corte para la delección de NAV3, amplificación de NAV3 y polisomía del cromosoma 12 fueron del 4 %, 7 %, y 10 %, respectivamente.

20 Tanto la delección como la amplificación de NAV3 se detectaron en astrocitomas; el 20 % (11 de 55) de los casos estudiados mostraron delección del NAV3 y el 11 % (6 de 55) amplificación. Se observó polisomía del cromosoma 12 en el 45 % (25 de 55) de los casos. Los análisis estadísticos utilizando el ensayo de Kaplan-Meier mostraron una tendencia de la amplificación de NAV3 prediciendo un resultado mejor de la enfermedad que con la delección o con un número normal de copias de NAV3.

25 Los casos de oligodendroglioma estudiados mostraron una delección del 15 % (3 de 20) y una amplificación en el 30 % (6 de 20). La polisomía del cromosoma 12 se detectó en el 43 % (10 de 23) de los casos. La polisomía del cromosoma 12 parecía predecir un resultado peor en la enfermedad cuando se analizó por el ensayo de Kaplan-Meier.

30 Los ependimomas mostraron una delección de NAV3 en el 31 % (4 de 13) de los casos estudiados, una amplificación de NAV3 en el 54 % (7 de 13) y polisomía del cromosoma 12 en el 69 % (9 de 13). El análisis estadístico indicó que la amplificación de NAV3E y la polisomía del cromosoma 12 predicen una peor supervivencia.

35 La delección de NAV3 se observó en el 11 % (2 de 18) de los casos de meduloblastoma estudiados, la amplificación de NAV3 en el 39 % (7 de 18) y la polisomía del cromosoma 12 en el 61 % (11 de 18). El análisis estadístico utilizando la prueba de Kaplan-Meier implicaba que la delección NAV3 predice una peor supervivencia y una amplificación de NAV3, por el contrario, predice un mejor resultado que un número normal de copias de NAV3.

No se detectó delección de NAV3 en los casos de neuroblastoma estudiados pero el 69 % (9 de 13) mostraron una amplificación de NAV3 y el 77 % (10 de 13) polisomía del cromosoma 12. En el ensayo de Kaplan-Meier la

amplificación de NAV3 y la polisomía del cromosoma 12 parecían predecir una supervivencia peor.

**Tabla 4. Los tumores cerebrales se clasificaron en cinco clases. Los Casos tumorales, aberraciones NAV3 (delección, amplificación), y polisomía del cromosoma 12 se muestran como número y porcentajes de los casos estudiados**

Tumor	Delección de NAV3	Amplificación NAV3	Polisomía del cromosoma 12
Astrocitoma 55/46 %	11/20 %	6/11 %	25/45 %
Oligodendroglioma 20/17 %	3/15 %	6/30 %	10/50 %
Ependimoma 13/11 %	4/31 %	7/54 %	9/69 %
Neuroblastoma 13/11 %	0/0 %	9/69 %	10/77 %
Meduloblastoma 18/15 %	2/11 %	7/39 %	11/61 %
En total 119/100 %	19/17 %	35/29 %	65/55 %

5 Los tumores gliales de grado 1, 2, y 3 se agruparon en una clase y se compararon con los tumores gliales grado 4 con respecto a las aberraciones NAV3 (Tabla 5). Los análisis mostraron que los grados 1, 2, y 3 más bajos mejor diferenciados contenían más amplificación NAV3 que los tumores gliales de grado 4. La amplificación de NAV3 se observó en el 27 % (13 de 48) de los tumores gliales de grados 1, 2, y 3 en comparación con el 5 % (2 de 38) de los gliomas grado 4. Por el contrario los tumores gliales de grado 4 contenían más delección NAV3 que los grados 1, 2, y 3. La delección de NAV3 se observó en el 18 % (7 de 38) de tumores de grado 4 en contraste con el 15 % (7 de 48) de los tumores de grado 1, 2, y 3.

**Tabla 5. Los tumores gliales de grados 1, 2, y 3 se agruparon en una clase y los tumores gliales de grado 4 formaban la otra clase. Los casos de tumores, amplificación de NAV3, y delección de NAV3 se muestran como número y porcentajes de los casos estudiados en estas dos clases.**

	Delección NAV3	Amplificación NAV3
Tumores gliales de grado 1, 2, y 3 48/56 %	7/15 %	13/27 %
Tumores gliales grado 4 38/44 %	7/18 %	2/5 %
En total 86/100 %	14/16 %	15/17 %

### Ejemplo 3. CGH

#### 15 Matriz CGH

El ADN se extrajo de las secciones de tejidos de 50 micrómetros embebidos en parafina. El ADN de referencia se extrajo de sangre aportada en la Cruz Roja Finlandesa por 4 hombres y mujeres sanos. El ADN se digirió, se marcó y se hibridó con una matriz de oligonucleótidos 244 K según el protocolo del fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU). Las muestras se escanearon con un escáner de micromatriz de ADN y se analizó utilizando el software Feature Extraction y CGH Analytics (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU). Los análisis se llevaron a cabo utilizando puntuación z y una ventana media de movimiento de 1 Mb. Los valores log<sub>2</sub> por debajo de +/- 0,4 no se consideraron aberrantes. Se analizaron utilizando este método tres líneas celulares de carcinoma de colon y dos muestras de tumor de carcinoma de colon.

#### 25 **Análisis de matriz CGH de casos seleccionados de material del paciente y líneas celulares de CRC**

Los estudios de matriz CGH se llevaron a cabo en dos muestras de material de pacientes y en tres líneas celulares CRC establecidas CLL-230, CLL-248 y CLL-228. Los datos de la matriz CGH demuestran una delección en 12q21 que abarca el locus NAV3 en una de las muestras del paciente, confirmando así los resultados de la FISH (esta muestra del paciente tenía un 41 % de células con NAV3 eliminado según el método FISH) (Figura 4). Sin embargo, la otra muestra de paciente mostraba resultados normales en este análisis, debido probablemente a un número de células aberrantes NAV3 proporcionalmente insuficiente en la muestra (el 28 % de las células mostraba señales de NAV3 amplificado en el análisis FISH). El análisis de matriz de las líneas celulares de carcinoma de colon que mostraban pérdida de NAV3 en FISH reveló alteraciones muy importantes en el cromosoma 12 así como en otros cromosomas, lo que se esperaba en las células de cáncer cultivadas. En la línea CLL-230, se detectó una amplia delección que abarcaba el locus NAV3 en 12q. Esta delección no se detectó en las otras (dos) líneas celulares (CLL-248 and CLL-228) que a su vez demostraron amplificaciones en otras partes del cromosoma.

#### 40 **Ejemplo 4. ARNi y Micromatrices de expresión génica**

##### Métodos

##### 45 **Silenciamiento génico del gen NAV3 in vitro**

El gen NAV3 se silenció con oligos ARNsi agrupados (On-Target SMART pool, Dharmacon, Chicago, IL, EE. UU). Las secuencias específicas de los oligos fueron las siguientes: 5'-GGACUUAACGUUAUACUA-3' (SEC ID N° 4) (Exón 12), 5'-GAGAGGGUCUUCAGAUGUA-3' (SEC ID N° 5) (Exón 38-39), 5'-CAGGGAGCCUCUAAUUUAA-

3' (SEC ID N° 6) (Exón 7), y 5'-GCUGUUAGCUCAGAUUUU-3' (SEC ID N° 7) (Exón 30-31).

Se cultivaron células de glioblastoma A172, queratinocitos epidérmicos primarios, y las líneas celulares de colon normales CRL-1541 y CRL-1539 en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 70 %, y a partir de ahí se transfectoron con 200 pmol de ARNsi NAV3 agrupado o ARNsi codificado de control (Dharmacon, IL, USA), utilizando reactivo de transfección Dharmafect1 (Dharmacon). Se indujo el crecimiento de células 0205 de glioblastoma como una monocapa adherente alterando las condiciones del cultivo mencionado anteriormente de la siguiente manera: se eliminaron bFGF y EGF y el medio se suplementó con un 10 % de FCS durante 4 días antes de la transfección. Para la transfección de una placa de 6 pocillos, se diluyó el ARNsi 1  $\mu$ M en 100  $\mu$ l de 1 x tampón ARNsi (recibido del fabricante) y se mezcló con una cantidad igual de medio de cultivo normal. Se incubaron cuatro microlitros de agente de transfección durante 5 minutos a temperatura ambiente con 196  $\mu$ l de medio de cultivo. Se añadió la dilución de ARNsi y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de la adición a las células en 1600  $\mu$ l de medio de cultivo. Seis horas después de la transfección, se reemplazó el medio de transfección por medio normal de crecimiento. Se hizo un seguimiento de la viabilidad de las células 48 horas después de la transfección con una tinción de azul tripán. Todos los tipos celulares mostraron más del 70 % de viabilidad, y además, solo se utilizaron las células adherentes para la preparación del ARN.

#### **Micromatrices de expresión génica**

Para identificar los genes regulados por NAV3, se midieron los cambios en los perfiles de expresión génica inducidos por el ARNi dirigido al NAV3 con micromatrices de color dual Agilent 4 x 44K y sondas de oligonucleótidos (Biochip center, Biomedicum Helsinki, <http://www.helsinki.fi/biochipcenter/>). Para estos análisis, se obtuvieron muestras de ARN total de las células transfectadas con el ARNsi a las 6, 24, y 48 horas después de la transfección (CRL 1541: 6 y 48 h, CRL 1539: 6 y 24 h, A172: 6 y 48 h, 0205: 6 y 48 h, queratinocitos epidérmicos primarios (PEK): 24 and 48h).

Las células se destruyeron en 350  $\mu$ l de tampón RLT (Qiagen), el ARN se purificó con el kit RNeasy Micro o Mini (dependiendo de la cantidad de células) (Qiagen, Hilden, Alemania) y se almacenó a -70 °C. El ARN total obtenido de las células con NAV3 silenciado se hibridó con las muestras de cada tiempo postransfección de las mismas células transfectadas con los oligonucleótidos codificados. Antes de la hibridación, la calidad de las muestras de ARN se evaluó con el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

#### **Análisis de la micromatriz**

Se analizaron los datos de la micromatriz de dos líneas celulares de colon normales CRL-1541 y CRL-1539, y los datos de las células de glioblastoma y queratinocitos epiteliales primarios transfectados con los oligos que silencian el NAV3 o con los oligos control. Las intensidades de sonda se corrigieron a fondo y se normalizaron con LOWESS utilizando el Agilent Feature Extractor 9.1.3.1. Para cada muestra, las veces que cambiaba en cada muestra se computaron, y se consideraron como expresadas diferencialmente 200 sondas con la expresión más alta y 200 sondas con la expresión más baja. Los genes que se expresaban de forma diferencial consistente en todas las líneas celulares normales de colon y en las muestras tumorales se emplearon para el análisis computacional de ruta utilizando PathwayExpress (Draghici S. y col. 2007, Genome Res 17(10): 1537-45). En este método, los valores de expresión de los genes expresados diferencialmente se utilizan para computar un factor de impacto y un valor de p asociado para señalización de rutas en la base de datos KEGG [REFE: PMID: 18477636], teniendo en cuenta la topología de las rutas.

Con este método, un gen que codifica una proteína situado corriente arriba de una ruta tiene más impacto numérico que las proteínas corriente abajo.

Además, se utilizó un nuevo método basado en el agrupamiento de Ontología Génica (GO) para revelar los agrupamientos genéticos que comparten una función biológica o localización común en las células (Ovaska K y col. 2008, BioData Min 1(1):11). Las distancias entre los genes se computaron utilizando la medida de similitud semántica de Lin (Lin. Proceedings of the 15th International Conference on Machine Learning 1998: 296-304) basándose en las anotaciones GO. Los genes que tienen anotaciones GO similares tienen distancias menores entre ellos y están agrupados próximamente. Los agrupamientos, junto con los valores de expresión, se visualizan utilizando mapas críticos y dendrogramas.

#### **PCR-RTq**

El silenciamiento de NAV3 eficaz y la regulación positiva de IL23R y GnRHR se confirmaron con el Light Cycler PCR-RTq y la hibridación de ARN *in situ*.

Para la PCR-RT cuantitativa, el ARN total se transcribió inversamente con el kit Revert Aid™ First Strand cADN Synthesis (Fermentas, St.Leon-Rot, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Para preparar las curvas de referencia, se hicieron diluciones seriadas del ADNc de las células A172. Las reacciones se llevaron a cabo con un aparato LightCyder480™ utilizando el kit LC 480 SYBR Green 1 master (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Brevemente, el ADN se desnaturizó a 95 °C durante 5 minutos, luego con 45 ciclos de 95 °C, 58 °C y 72 °C, que se hicieron durante 10, 15 y 10 segundos respectivamente, y a continuación por el análisis de curva de fusión de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el ajuste de fondo se utilizó el punto de ajuste para determinar el valor del punto de cruzamiento como se había descrito anteriormente (Linja MJ y col. 2004, Clin Cancer Res 10(3):1032-40). Para la normalización de los niveles de expresión, se midió la expresión de la unión de la proteína TATA (TBP) como se había descrito (Linja MJ y col. 2004, Clin Cancer Res 10(3):1032-40). El nivel de expresión relativo se obtuvo dividiendo los valores para NAV3 por el valor TBP. Además del análisis de curva de fusión, los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % para asegurar el tamaño correcto del producto. También se confirmó la regulación positiva de IL23R y GnRHR por PCR RTq, aumentando la temperatura de anidamiento a 60 °C. Todos los cebadores utilizados en las reacciones se enumeran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Cebadores utilizados en la PCR-RTq**

Gen	Cebador directo	Cebador Inverso
NAV3	ATCCATGGAGCTCAGCAA (SEC ID N° 8)	TTGGCTOCTTCTTGGAGTTT (SEC ID N° 9)
GnRHR	AAGAGCACGGCTGAAGACTC (SEC ID N° 10)	GCATGGGTTTAAAAAGGCAA (SEC ID N° 11)
IL23R	CGCAAACTCGCTATTCGACA (SEC ID N° 12)	ATGGCTTCCCTCAGGCAGA (SEC ID N° 13)

#### **Hibridación *in situ* de ARN NAV3 de células con NAV3 silenciado**

Para evaluar la eficacia de la anulación del gen NAV3, hemos realizado una hibridación *in situ* de ARN dirigido a NAV3 de las células transfectadas con ARNsi de las líneas celulares A172 y 0205. La expresión de NAV3 se comparó con células no transfectadas y células transfectadas con oligos codificados. En resumen, las transcripciones de ARNm NAV3 se detectaron con una sonda que reconocía los exones 37-39, por hibridación durante una noche a 45 °C.

#### *Hibridación de ARNm *in situ* para ARNm NAV3*

#### Preparación de sondas ARN

Las sondas ARN se generaron basándose en localizaciones específicas del gen NAV3 que ejercen los siguientes oligonucleótidos (exón 37-39: antisentido 5'-TTGGCTGCTTCTTGGAGTTT-3' (SEC ID N° 14), sentido 5'-CACCAAATCTAGAGCTGCATCA- 3' (SEC ID N° 15)). Los productos PCR resultantes se clonaron en el vector pCR®II-TOPO® (Invitrogen). Las sondas ARN se marcaron utilizando el kit DIG RNA labelling (SP6/T7, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Hibridación *in situ* para células fijadas

Se cultivaron las líneas celulares A172 y 0205 en portaobjetos estériles de cristal (LAB-TEK II chamber Slide w/Cover RS Glass Slide, Nalge Nunc International) y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (MERCK) – PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon con PBS y se refijaron con un 1 % PFA-PBS (7 min, +4-8 °C) seguido por lavado en PBS. Los portaobjetos se acetilaron con trietanolamina 0,1 M (TEA, Riedel-de Haan) pH 8,0 – 0,25 % de anhídrido acético (MERCK) y se prehibridaron con 4 x SSC – formamida desionizada al 50 %. La hibridación *in situ* se llevó a cabo en una cámara humidificada durante una noche a 45 °C utilizando una solución de hibridación que contenía sonda DIG-ARN desnaturizada antisentido (4 ng/μl) o la sonda en sentido (19 ng/μl). Los portaobjetos se lavaron después de la hibridación con tampones precalentados en un baño de agua a 37 °C (1 x 10 min, 1 x 15 min 2 x SSC, y Tris a pH 8,0; EDTA 1 mM) durante 30 min a 37 °C). Después de lavarse, las sondas hibridadas se detectaron inmunológicamente con Fab anti- DIG- fosfatasa alcalina diluida 1:1000 en solución bloqueante. Los portaobjetos se lavaron y se incubaron durante una noche en una cámara humidificada con una solución sustrato de color (1:50 NBT/BCIP Solución Madre (Roche) en tampón de detección que contenía levamisol recién preparado 0,002 mM (Vector Laboratories)). Para terminar la reacción los portaobjetos se lavaron, aclararon brevemente en agua y se hizo el recuento de tinción con Kemchrot al 0,1 % (1 x 5 min, Gurr, BDH Chemicals). Todos los reactivos e instrumentos se trataron con dietil pirocarbonato (DEPC) o estaban libres de RNasa.

#### **Resultados**

#### ***El silenciamiento del gen NAV3 da como resultado la regulación positiva de la expresión de GnRHR e IL23R***

#### *Líneas celulares de colon normal*

Para identificar *in vivo* los genes diana del NAV3 relevantes, estudiamos los perfiles de expresión de las células normales de colon CRL-1541 y CRL-1539 con NAV3 silenciado (con número de copias del gen NAV normal). En estos experimentos identificamos, entre los 39 genes que están regulados positivamente constantemente en las células de colon normal, la regulación positiva de dos receptores clave implicados en carcinogénesis. En primer lugar, se identificó la ruta del receptor de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHR) utilizando Pathway Express estando enriquecida estadísticamente significativamente (valor de p corregido por múltiples hipótesis <

0,001), y este resultado se debía a la regulación positiva de GnRHR, variante de transcripción 1, con cambios de 4,7- 32,4 veces. En segundo lugar, se identificó la ruta Jak- STAT que se identificó como marginalmente significativa estadísticamente (valor p corregido < 0,058) y estaba afectada por regulación positiva del receptor de la interleucina 23 (IL23R), con cambios de 3,4- 14,01 veces. La regulación positiva de estos receptores se confirmó por PCR-RTq en muestras seleccionadas. Véase la **Figura 5**.

*Líneas celulares y muestras tisulares*

Se compararon el número de señales NAV3 con el número de señales del centrómero 12 con FISH multicolor, y de esta manera se definió que tenían señales de NAV3 normales, amplificadas o eliminadas. El estudio de las líneas celulares CRL-1541, CRL- 1539, O205 y A172 mostraron que consisten principalmente en células sin aberraciones en NAV3 (**Tabla 7**) y que eran por tanto adecuadas para los estudios de silenciamiento. El silenciamiento eficaz de NAV3 se confirmó por PCR-RTq e hibridación ARN *in situ* (**Figuras 6 y 7**). También ambas sondas para NAV3 presentes en la micromatriz Agilent 4 x 44K estaban bajo expresadas con un cambio medio de 0,26 veces, indicando que el silenciamiento de NAV3 era eficaz. Todos los métodos mostraron una regulación del NAV3 consistente en todos los tipos celulares en todos los tiempos puntuales.

**Tabla 7. FISH de NAV3 y centrómero del cromosoma 12**

Línea celular o muestra tisular	Tipo celular	Número de núcleos analizados	% de núcleos con señales normales	% de núcleos con polisomía NAV3	% de núcleos con señal NAV3 amplificada	% de núcleos con señal NAV3 eliminada
CRL-1541	Colon	30	100	0	0	0
CRL-1539	Colon	37	91,9	8,1	0	0
O205	Glioblastoma	200	98,5	0	0,5	0,5
A172	Glioblastoma	108	11,1	74	5,6	9,3
O205 tumoral	Glioblastoma	206	97,09	0,49	1,46	0,49

Cuando se evaluaron los perfiles de expresión génica de todas las células de colon normales CRL-1541 y CRL-1539 con NAV3 silenciado, la línea celular de glioblastoma A172 derivada de glioblastoma de grado 4, y queratinocitos epidérmicos primarios (todos de ATCC, Manassas, VA, EE. UU), identificamos 17 genes regulados positivamente en todos los experimentos (**Tabla 8**). De estos, se remarcó la regulación positiva de dos receptores clave implicados en la carcinogénesis. En primer lugar se identificó que la ruta del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas utilizando PathwayExpress estaba enriquecida significativamente estadísticamente (valor de p corregido de múltiples hipótesis < 0, 001). Este resultado fue debido a la regulación positiva de la variante 1 de la transcripción de GnRHR que tenía un cambio medio de 13,7 veces. En segundo lugar se identificó que la ruta Jak-STAT estaba alterada marginalmente significativamente estadísticamente (valor de p corregido < 0, 058) por regulación positiva del receptor de la interleucina 23 (IL23R), que tenía un cambio medio de 7,2 veces. La regulación positiva de estos receptores se confirmó por PCR-RTq en muestras seleccionadas. Hemos decidido incluir los perfiles de expresión génica de queratinocitos epiteliales primarios con NAV3 silenciado (PEK) en el análisis. Entonces identificamos 52 genes, incluyendo GnRHR e IL23R que estaban regulados positivamente en 7 de los 10 experimentos que llevaron a cabo con los tres tipos de células (**Tabla 9**).

**Tabla 8. Lista de 17 genes regulados positivamente en los ocho experimentos de silenciamiento de NAV3 con células gliales y de colon**

Abreviatura	Máximos cambios en nº de veces	Mínimos cambios en nº de veces	Nombre completo
C12orf42	47,8	12,7	Fase de lectura abierta 42 del cromosoma 12 de Homo sapiens (C12orf42), ARNm [NM 198521]
GNRHR	32,4	47	Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHR) de Homo sapiens, variante de transcripción 1 ARNm [NM 000406]
ARL11	30,2	6,8	Factor de ribosilación 11 similar ADP (ARL11), ARNm [NM 138450]
AF334588	31,8	12,8	ARNm P25 de Homo sapiens, cds completo [AF334588]
A 24 P799680	29,3	6,1	Desconocido
UNQ6490	41,1	5,5	Clon ADN 147309 YPLR6490 (UNQ6490) ARNm de Homo sapiens, cds completo, [AY358209]
FLJ33641	23,4	59	Proteína FLJ33641 hipotética de Homo sapiens (FLJ33641), ARNm [NM_152687]

CN480368	25,3	3,8	UI-H-EU0-azt-m-22-0-UI,s1 NCI_CGAP_Carl Homo sapiens clon ADNc UI-H-EU0-azt-m -22-0-UI 3' secuencia de ARNm [CN480368]
NP297856	20,0	40	GB AF132199,1 AAG35545,1 PRO1460 [NP297856]
ENST00000329949	23,6	49	proteína similar a POM121 de Homo sapiens, ARNm (clon ADNc IMAGE 40053742), [BC112340]
ENST00000360623	17,2	5,5	clon F22H de ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina miosin-reactiva de Homo sapiens, cds parcial, [AF035042]
THC2407334	17,0	4,2	Desconocido
IL23R	14,0	34	Receptor interleucina 23 (IL23R) de Homo sapiens, ARNm [NM144701]
THC2443880	13,3	42	Desconocido
VNN3	12,4	4,5 5	Vanina 3 (VNN3) de Homo sapiens, variante 1 de transcripción, ARNm [NM018399]
LOC348174	50,2	7,9	Homo sapiens ADNc FLJ38732 fis, clon KIDNE2010750, [AK096051]
ENST00000372121	11,2	3,9	Gen de Homo sapiens hipotético apoyado por BC006119, ARNm (clon de ADNc IMAGEN:3505629), cds parcial [BC006119]

**Tabla 9, Lista de 49 genes regulados positivamente en al menos 7/10 experimentos de silenciamiento y una vez con cada tipo celular. En la columna de la derecha, se muestran los cambios en número de veces de la expresión génica en las células comparado con la expresión génica de los mismos genes en las células con ARNsi silenciado**

Nombre del gen	Descripción	Cambio medio de veces
AK021467	Clon ADNc FLJ11405 fis Homo sapiens HEMBA1000769 [AK021467]	24,5
C12orf42	Fase de lectura abierta 42 del cromosoma 12 de Homo sapiens (C12orf42), ARNm [NM 198521]	24,1
AF334588	ARNm P25 de Homo sapiens, cds completo [AF334588]	23,2
A 24 P799680	Desconocido	18,9
CN480368	UI-H-EU0-azi-m-22-0-UI.s1 NCI_CGAP_Carl Homo sapiens clon ADNc UI-H-EU0-azi-m-22-0-UI 3', secuencia ARNm [CN480368]	14,3
GNRHR	Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHR) de Homo sapiens, variante de transcripción 1 mRHA [NM 000406]	13,7
LOC348174	ADNc FLJ38732 fis de Homo sapiens, clon KIDNE2010750, [AK096051]	13,7
THC2378839	CR457228 FLJ20225 {Homo sapiens;}, parcial (19 %) [THC2318839]	13,2
ENST00000360623	Clon F22H de ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina miosin-reactiva de Homo sapiens, cds parcial, [AF035042]	12,4
UNQ6490	Clon ADN 147309 YPLR6490 (UNQ6490) ARNm de Homo sapiens, cds completo, [AY358209]	12,4
CECR1	Región candidata 1 del cromosoma del síndrome de ojo de gato de Homo sapiens (CECR1), variante de transcripción 1, ARNm [NM017424]	11,7
OR2W3	Receptor olfatorio de Homo sapiens, familia 2, subfamilia W, miembro 3 (OR2W3), ARNm [NM_001001957]	11,3
A 32 P93894	Desconocido	11,2
GK	Glicerol quinasa de Homo sapiens (GK), variante de transcripción 1, ARNm [NM_203391]	10,0
THC2407334	Desconocido	9,9
ARL11	Factor de ribosilación 11 similar ADP (ARL11), ARNm [NM 138450]	9,9
AA903523	Clon AA9C3523 ok50h02,s1 NCI CGAP Lei2 de Homo sapiens ADNc IMAGEN: 1517427 3', secuencia ARNm [AA903523]	9,8
TPD52L3	Proteína tumoral D52 similar a 3 de Homo sapiens (TPD52L3), variante de transcripción 1, ARNm [NM_033516]	9,7
FLJ33641	Proteína FLJ33641 hipotética de Homo sapiens (FLJ33641), ARNm [NM_152687]	9,5
A 24 P929289	Desconocido	8,5
ZDHHC15	Dedos de zinc de Homo sapiens, tipo DHHC que contienen 15 (ZDHHC15), ARNm [NM_144969]	8,3

ENST00000329949	Homo sapiens proteína similar a POM121, ARNm (clon ADNc IMAGE 40053742), [BC112340]	8,0
ANKRD45	Dominio repetido de anquirina 45 (ANKRD45) Homo sapiens ARNm [NM_198493]	7,8
THC2443880	Desconocido	7,5
CLCA3	Miembro 3 de la familia del Canal cloruro calcio activado 3 (CLCA3), ARNm [NM_004921]	7,5
ENST00000327625	Desconocido	7,2
IL23R	Receptor interleucina 23 (IL23R) de Homo sapiens, ARNm [NM144701]	7,2
VNN3	Vanina 3 (VNN3) de Homo sapiens, variante 1 de transcripción, ARNm [NM018399]	7,0
OPRK1	Receptor opioide kappa 1 de Homo sapiens 1 (OPRK1), ARNm [NM_000912]	6,9
BX113452	BX113452 cerebro infantil Soares 1N1B Homo sapiens clon ADNc IMAGp998L21165 secuencia ARNm [BX113452]	6,7
ENST00000372127	Gen de Homo sapiens hipotético apoyado por BC006119, ARNm (ADNc clon IMAGEN:3505629), cds parcial [BC006119]	6,6
CYSLTR2	Receptor 2 de cisteinil leucotrina de Homo sapiens (CYSLTR2), ARNm [NM_020377]	6,5
SMR3B	Proteína 3 regulada por andrógenos de la glándula submaxilar de Homo sapiens homóloga B (ratón) (SMR3B), ARNm [NM_006685]	6,3
THC2319152	Desconocido	6,3
THC2405170	Desconocido	6,2
U22172	ADN Humano de reparación de daños y proteína de recombinación RAD52 pseudogen ARNm, cds parcial. [U22172]	6,1
GNGT1	Proteína de unión al nucleótido guanina de Homo sapiens (proteína G), polipéptido 1 con actividad gamma transductora (GNGT1), ARNm [NM_021955]	5,9
AF078533	Enzima convertidora evolucionariamente relacionada con interleucina – 1beta de Homo sapiens ARNm cds completo [AF078533]	5,8
FAM107A	Miembro A de la familia con similitud 107 de Homo sapiens (FAM107A), ARNm [NM_007177]	5,7
THC2314833	Desconocido	5,7
ZDHHC15	Dedos de zinc de Homo sapiens, tipo DHHC que contienen 15 (ZDHHC15), ARNm [NM_144969]	8,3
CCDC62	Dominio de hélice superenrollada que contiene 62 de Homo sapiens (CCDC62), variante de transcripción 1, ARN [NM_032573]	5,7
THC2351769	Desconocido	5,7
AK095225	Homo sapiens ADNc FLJ37906 fis, clon COLON20043318, [AK095225]	5,3
A 23 P134405	Desconocido	5,3
BCL6B	Homo sapiens CLL de células B / linfoma 6, miembro B (proteína dedos de zinc) (BCL6B), ARNm [NM_181844]	5,2
NP297856	GB[AF132199,1] AAG35545,1 PRO1460 [NP297856]	5,1
ZSCAN4	Dominio dedos de zinc y SCAN que contiene 4 de Homo sapiens (ZSCAN4) ARNm [NM_152677]	5,1
THC2438003	Q9BVX4 (Q9BVX4) MGC5566 proteína, parcial (23 %) [THC2438003]	4,8
AF119887	PRO2610 ARNm de Homo sapiens, cds completo [AF119887]	4,8
X92185	H. sapiens ARNm para elementos alu [X92185]	4,7
THC2455392	Desconocido	4,3
C19orf30	Fase de lectura abierta 30 del cromosoma 19 de Homo sapiens (C19orf30), ARNm [NM_174947]	4,0

### **Análisis de Ontología Génica de los genes regulados por NAV3**

- 5 El agrupamiento basado en ontología génica se llevó a cabo para identificar procesos biológicos afectados por la depleción de NAV3. Para aumentar el número de genes para el análisis GO, realizamos el agrupamiento sobre 52 genes que estaban regulados positivamente en 7 de 10 experimentos. De entre este grupo, se identificaron cuatro grupos GO (Figura 8): membrana (nueve genes), transporte de iones (dos genes), nucleares (cuatro genes), y unión con ribonucleótidos (dos genes). El grupo de unión a ribonucleótidos incluía dos genes: glicerol quinasa y ARL11. La glicerol quinasa es una enzima clave en la regulación de la toma de glicerol y el metabolismo, mientras que ARL11 (o ARLTS1) pertenece a la familia ARF de la superfamilia Ras de GTPasas pequeñas, que se sabe que están
- 10

implicadas en múltiples rutas reguladoras alteradas en carcinogénesis humanas.

Los productos génicos se agruparon (unieron) basándose en sus anotaciones de Ontología Génica (GO). Los genes que tienen anotaciones similares pertenecen al mismo grupo. La distancia entre los productos génicos se define utilizando la información de las medidas teóricas de similitud semántica.

En la **Tabla 10** a continuación, se muestra el más informativo (más específico) de los términos comunes de cada grupo. Todos los productos génicos en el grupo se anotan con el término GO mencionado. Un término GO es más informativo si se produce escasamente en las anotaciones GO del genoma entero. La columna priori contiene una probabilidad a priori  $p$  a la que un producto génico aleatorio es anotado con el determinado término GO. La información se define como  $\log_2 p$ . Generalmente, los grupos con (1) un gran número de productos génicos y (2) términos GO comunes con alto contenido informativo son los más interesantes.

**Tabla 10, Productos génicos que están agrupados (unidos) basándose en sus anotaciones de Ontología genética (GO)**

Grupo	Tamaño	GOID	PRIORI	INFO	DESCRIPCIÓN
G1	4	GO:0003824	0,230	2,120	Actividad catalítica
		GO:0008152	0,312	1,681	Procesos metabólicos
		GO:0044464	0,906	0,142	Parte celular
G2	3	GO:0005215	0,046	4,435	Actividad transportadora
		GO:0006810	0,093	3,434	Transporte
G3	5	GO:0005886	0,124	3,014	Membrana plasmática
		GO:0016021	0,126	2,989	Integral para membrana
G4	2	GO:0005634	0,163	2,620	Núcleo
		GO:0005515	0,237	2,079	Unión proteica
		GO:0050794	0,262	1,932	Regulación de procesos celulares

MIEMBROS DE GRUPOS  
 G1 GAL3ST1 GK RDHE2 CECR1  
 G2 AQP10 ENST00000327625 CLCA3  
 G3 GNRHR OPRK1 DNER IL23R FLJ33641  
 G4 BCL6B FAM107A

Además de los genes del grupo de membrana IL23R y GnrRHR tratados anteriormente, hay otros genes en el grupo de membrana (**Figura 8**) incluidos *GNGT1*, *CYSLTR2*, y *SMR3B*. El *GNGT1* codifica la subunidad gamma de la transducina, que se encuentra principalmente en los segmentos de bastoncillos externos. El *CYSLTR2* pertenece a los cisteinil leucotrienos que son importantes mediadores en el tráfico celular y respuestas inmunes innatas, implicadas en la patogénesis de procesos inflamatorios. El IFN-gamma induce la expresión de *CysLTR2* y potencia las respuestas inflamatorias inducidas por *CysLT*. El *SMR3B* (proteína 3 regulado por andrógenos de glándula submaxilar, B), es un candidato a gen relacionado con tumores.

El grupo del núcleo incluye el gen *FAM107A*, también llamado *TU3A*, que se ha informado que se silencia epigenéticamente en varios cánceres. Además, hemos identificado el gen *BCL6B*, un gen codificante del factor de transcripción, regulado positivamente por el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial. La lista completa de genes en cada grupo se da en la **Figura 8**. Otros genes de interés que están unidos a la inflamación también se encontraron entre los genes regulados positivamente, incluyendo *Vanin3* un miembro de la familia *Vanin* de ectoenzimas segregadas o asociadas a la membrana. El *Vanin 1* y *Vanin 3* han mostrado recientemente tener una actividad proinflamatoria.

Cuando se trataron las células de glioma y colon como grupos específicos, identificamos 39 genes consistentemente regulados positivamente en las células de colon normales con *NAV3* silenciado y 28 genes regulados positivamente en las células gliales (**Tablas 11 y 12**). La *DNER* es una proteína transmembrana que lleva repeticiones extracelulares similares a *EGF* y un ligando *Notch* atípico, y que estaba regulada positivamente solo en las células de colon con *NAV3* silenciado (**Tabla 11**).

**Tabla 11. Lista de genes regulados positivamente en los cuatro experimentos con células de colon con silenciamiento de NAV3, El número total de genes era 39, pero los genes que carecían de anotación se dejaron fuera de la tabla. Los genes están listados de acuerdo con su grupo GO. Los genes marcados con un asterisco (\*) han sido relacionados previamente con cáncer.**

Abreviatura	Nombre completo	Máx. cambios en nº de veces	Mín. cambios en nº de veces
<i>Proteínas de membrana</i>			
GNRHR*	Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas de Homo sapiens (GNRHR), variante de transcripción 1	32,4	14,8

ES 2 469 802 T3

FLJ33641	Proteína hipotética FL33641 de Homo sapiens (FLJ33641), ARN [NM 1526871]	23,4	7,0
ENST00000327625	Desconocido	17,8	6,9
AQP10	Aquaporin 10 (AQP10) Homo sapiens	16,2	5,5
IL23R	Receptor Interleucina 23 de Homo sapiens (IL23R)	14,0	4,4
DNER	Transmembrana delta-notch que contiene repeticiones similares a EGF de Homo sapiens (DNER)	21,9	5,8
OPRK1	Receptores opioides kappa1 de Homo sapiens (OPRK1)	14,6	4,9
GAL3ST1	Galactosa-3-O-Sulfotransferasa 1 de Homo sapiens (GAL3ST1)	13,2	3,9
<i>Unión a nucleótidos purínicos</i>			
ARL11	Factor de ribosilación 11 similar a ADP de Homo sapiens (ARL11)	30,2	6,8
ANKRD45	Dominio 45 de repetición de anquirina de Homo sapiens (ANKRD45), ARNm	11,2	8,0
GK*	Glicerol quinasa de Homo sapiens (GK), variante de transcripción 1	15,1	4,1
<i>Regulación de procesos celulares</i>			
FAM107A*	Familia con similitud de secuencia con la familia 107 de Homo sapiens, miembro A	8,1	4,1
BCL6B	CLL de Células B /linfoma 6, miembro B (proteína dedos de zinc) de Homo sapiens (BCL6B)	9,9	5,4
<i>Sin grupo GO</i>			
C12orf42	Fase de lectura abierta 42 del cromosoma 12 de Homo sapiens (C12orf42)	47,8	176
MFSD2*	Homo sapiens ADNc FLJ14490 fis, clon MAMMA1002886 [AK027396]	34,9	9,9
RDHE2	Isoforma 1 de deshidrogenasa reductasa de cadena corta retiniana de Homo sapiens	20,5	7,7
ENST00000329949	Proteína similar a POM121 de Homo sapiens	19,9	4,9
ENST00000360623	Clon F22H de ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina miosin-reactiva de Homo sapiens, cds parcial, [AF035042]	17,2	5,5
ZNF224	Proteína dedos de zinc 224 de Homo sapiens	42,1	8,3
CECR1	Región candidata 1 del cromosoma del síndrome de ojo de gato de Homo sapiens (CECR1), variante de transcripción 1	10,6	5,1
TPD52L3	Proteína tumoral D52 similar a 3 de Homo sapiens (TPD52L3), variante de transcripción 1	11,6	4,2
VNN3	Vanina 3 (VNN3) de Homo sapiens, variante 1 de transcripción, ARNm [NM018399]	12,1	4,5
CCDC62	Dominio de hélice superenrollada que contiene 62 de Homo sapiens (CCDC62), variante de transcripción 1	8,8	4,9
X92185	H. sapiens ARNm para elementos alu [X92185]	8,4	5,12
CLCA3*	Miembro 3 de la familia Canal cloruro del calcio activado (CLCA3)	12,0	5,2

**Tabla 12. Lista de los genes comúnmente regulados positivamente en las líneas celulares gliales**

Abreviatura	Máximos cambios en nº de veces	Mínimos cambios en nº de veces	Nombre completo
C12orf42	36,9	12,7	Fase de lectura abierta 42 del cromosoma 12 de Homo sapiens (C12orf42), ARNm [NM 198521]
AK021467	37,0	9,1	Clon ADNc FLJ11405 fis Homo sapiens HEMBA1000769 [AK021467]
GNRHR	32,3	4,7	Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHR) de Homo sapiens, variante de transcripción 1 ARNm [NM 000406]

AF334588	28,6	12,8	ARNm P25 de Homo sapiens, cds completo, [AF334588]
A 24 P799680	29,3	6,1	Desconocido
ENST00000329949	23,6	6,2	Proteína similar a POM121 de Homo sapiens, ARNm (clon ADNc IMAGE 40053742), [BC112340]
LOC348174	21,7	7,9	Homo sapiens ADNc FLJ38732 fis, clon KIDNE2010750, [AK096051]
CN480368	17,3	3,8	UI-H-EU0-azt-m-22-0-UI,s1 NCI_CGAP_Carl Homo sapiens clon ADNc UI-H-EU0-azt-m -22-0-UI 3' secuencia de ARNm [CN480368]
THC2378839	16,3	5,4	CR457228 FLJ20225 {Homo sapiens;}, parcial (19 %) [THC2318839]
NP297856	15,2	4,0	GB AF132199,1 AAG35545,1 PRO1460 [NP297856]
VNN3	12,4	4,9	Vanina 3 (VNN3) de Homo sapiens, variante 1 de transcripción, ARNm [NM018399]
CYSLTR2	12,3	3,5	Receptor 2 de cisteinil leucotrina de Homo sapiens (CYSLTR2), ARNm [NM_020377]
ENST00000360623	16,1	9,6	Clon F22H de ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina miosin-reactiva de Homo sapiens, cds parcial, [AF035042]
THC2407334	15,0	4,2	Desconocido
AA903523	12,2	3,6	Clon AA9C3523 ok50h02,s1 NCI CGAP Lei2 de Homo sapiens ADNc IMAGEN: 1517427 3', secuencia ARNm [AA903523]
ENST00000372127	11,2	3,9	Gen de Homo sapiens hipotético apoyado por BC006119, ARNm (ADNc clon IMAGEN:3505629), cds parcial [BC006119]
C19orf30	10,9	3,8	Fase de lectura abierta 30 del cromosoma 19 de Homo sapiens (C19orf30), ARNm [NM_174947]
ZSCAN4	10,8	5,3	Dominio dedos de zinc y SCAN que contiene 4 de Homo sapiens (ZSCAN4) ARNm [NM_152677]
SPAG11	10,8	5,3	Antígeno 11 asociado a esperma de Homo sapiens (SPAG11), variante de transcripción C, ARNm [NM_058203]
A 24 P929289	10,3	4,9	Desconocido
THC2443880	9,7	4,2	Desconocido
UNQ6490	19,4	5,5	Clon ADN 147309 YPLR6490 (UNQ6490) ARNm de Homo sapiens, cds completo, [AY358209]
ARL11	18,1	7,6	Factor de ribosilación 11 similar a ADP de Homo sapiens (ARL11)
THC2314833	7,2	3,9	Desconocido
IL23R	8,7	3,4	Receptor Interleucina 23 de Homo sapiens (IL23R)
FLJ33641	9,8	5,9	Proteína hipotética FL33641 de Homo sapiens (FLJ33641), ARN [NM_1526871]
U22172	7,0	4,6	ADN Humano de reparación de daños y proteína de recombinación RAD52 pseudogen ARNm, cds parcial. [U22172]
BX113452	14,7	6,0	BX113452 cerebro infantil Soares 1N1B Homo sapiens clon ADNc IMAGp998L21165 secuencia ARNm [BX113452]

### Ejemplo 5. Inmunohistoquímica

#### *Inmunohistoquímica de IL23R y beta-catenina en las muestras de tejido*

5 Se estudiaron las expresiones de IL23R y beta-catenina por inmunohistoquímica en micromatrices de tejido preparadas a partir de las biopsias de colon embebidas en parafina. De cada paciente se incluyeron en la micromatriz, muestras pareadas del colon histológicamente normal y dos muestras del tumor de colon. También, se incluyeron muestras pareadas de 19 pacientes con una lesión adenomatosa y otra muestra de colon normal. Con un total de 57 pacientes, se incluyeron en las micromatrices de tejido 43 muestras de tumor MSS, 14 muestras de tumor MSI, 14 muestras de adenoma y 57 correspondientes a muestras de colon normal.

10

Se llevó a cabo la inmunohistoquímica utilizando la técnica del complejo avidina- biotina – peroxidasa (Vectastatin Elite ABC kit [mouse IgG], Vector laboratories, Burlingame, CA, EE. UU) con DAB como sustrato cromogénico y hematoxilina de Mayer como tinción de recuento. Después de la desparafinación estándar, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % y las secciones se pretrataron con un baño de agua a +95 °C en tampón de citrato ((DakoCy-tomation, Glostrup, Dinamarca) durante 20 min. Los portaobjetos entonces se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón contra IL23R (R&D MAB14001; diluidos en 1:30, portaobjetos pretratados con un 1 % de tripsina a 37 °C 30 min) o contra beta-catenina (Zymed CAT-5H10, Invitrogen, Carlsbad, CA 92008 EE. UU; diluido en 1:250, pretratamiento del portaobjetos a +95 °C durante 30 min en DAKO Target Retrieval Solution S1699, pH 6-6,2) a +4 °C durante una noche. El DAB se utilizó como sustrato cromogénico para IL23R mientras que se utilizó el kit VECTOR NovaRED substrate S-4800 para la beta-catenina.

Para los análisis estadísticos el resultado del inmunomarcado se puntuó según lo siguiente: para la inmunorreactividad de IL23R sin tinción (puntuación 0), tinción ligeramente positiva (puntuación 1), tinción claramente positiva (puntuación 2), tinción fuertemente positiva (puntuación 3; véase también la **Figura 9** para ejemplos) para la beta-catenina no teñida (puntuación 0) , la tinción de la membrana celular (puntuación 1), tinción del citoplasma (puntuación 2), tinción nuclear en la mayoría de las células tumorales (puntuación 3; véase también la **Figura 9**).

### **Análisis estadísticos**

Las correlaciones entre las variables categóricas se analizaron utilizando la prueba del chi-cuadrado, o cuando no era válida, el ensayo exacto de Fisher. Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo utilizando la muerte producida por el cáncer de colon como punto de corte primario. Los tiempos de seguimiento se obtuvieron de Statistics Finland, una agencia gubernamental. Se utilizó el software SPSS versión 15.0 (SPSS, IL, EE. UU).

### **Expresión de IL23R o beta-catenina nuclear en tumores MSS con NAV3 aberrante asociados con estadificación de Dukes y metástasis en ganglios linfáticos, y expresión de IL23R asociada con mal pronóstico**

La detección inmunohistoquímica de beta-catenina (ligada a la ruta de la GnRHR) y la expresión de IL23R se llevó a cabo entonces en una micromatriz de tejido que incluía 43 MSS (incluyendo también 8 muestras de adenoma de los mismos pacientes) y 14 muestras de pacientes MSI (tumorales y su correspondiente epitelio normal de colon). Se encontró en todas las muestras de colon normal de estos casos, excepto en tres casos, que la tinción de beta-catenina era siempre membranosa y no había o era solamente débil la expresión de IL23R (grado 1) (**Figura 9**).

Se sabe que en las células epiteliales normales la beta-catenina se localiza en las membranas celulares pero cambia su distribución hacia el núcleo y el citoplasma en muestras de carcinomas. En las muestras representativas de tumor MSS (muestras duplicadas de cada una), se encontró beta-catenina nuclear en 10/43 casos y la inmunorreactividad de IL23R con regulación positiva (puntuaciones 2-3) en 27/43 casos. La expresión de beta-catenina nuclear se correlaciona con metástasis en ganglios linfáticos. La inmunorreactividad de IL23R regulada positivamente en las muestras de matrices de tejido se correlacionaba fuertemente con la estadificación de Dukes (véase la **Tabla 3** en el Ejemplo 2, aberraciones de NAV3 asociadas con polisomía del cromosoma 12 y con metástasis de los ganglios linfáticos) y también con la metástasis de ganglios linfáticos (véase **Tabla 3** en Ejemplo 2). Las muestras tumorales con deleciones alélicas NAV3 mostraban frecuentemente una reactividad de IL23R regulada positivamente más clara (**Figura 9**).

En un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (**Figura 10**), se encontró que los pacientes con inmunorreactividad de IL23R con regulación positiva (puntuaciones 2 y 3) tenían peor pronóstico que los pacientes con un nivel normal o bajo de expresión (es decir, una intensidad de tinción, puntuación 0 o 1, respectivamente, y comparable con las muestras de colon normal) (véase **Tabla 3** en el Ejemplo 2). El tiempo medio de supervivencia para pacientes con expresión baja de IL23R era de 44 meses (95 %IC 38-50 meses), mientras que para el paciente con una expresión alta de regulación positiva, la media de supervivencia era solamente de 23 meses (95 % IC 13-33 meses)

Para los pacientes con CRC tipo MSS, era posible comparar los resultados de la FISH de IL23F, beta-catenina y NAV3 en muestras de adenoma y tumores, los cambios en el número de copias de NAV3, junto con la elevación en la expresión de IL23R (inmunotinción moderada o fuerte) y/o la beta-catenina nuclear estaban presentes en 3 de las muestras de adenoma y la expresión elevada de IL23R sola en dos adenomas adicionales (datos no mostrados). En las correspondientes muestras tumorales, los hallazgos fueron similares excepto en dos muestras donde no se encontró aberración NAV3 a pesar de haber expresión de IL23R regulada positivamente. En ambos de estos últimos casos, la lesión de adenoma correspondiente, sin embargo, había mostrado polisomía del cromosoma 12.

### **Inmunohistoquímica de IL23R y GnRHR en muestras de tejido**

La inmunotinción de GnRHR se llevó a cabo en un inmunostainer LabVision (LabVision, CA, EE. UU) y a continuación se llevó a cabo la recuperación del antígeno utilizando tampón Tris-EDTA, pH 9,0 en un horno microondas durante 24 minutos a 900 vatios y a continuación se enfrió durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se detectó el GnRHR con anticuerpo monoclonal de ratón (diluido 1:10, Abcam, Cambridge, R. U) y un sistema de detección basado en polímero (Envision, K5007, DakoCytomation) con diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (**Figura 11**).

5 Se incluyeron dos secciones de tejido colorrectal de casos representativos (muestras pareadas de colon histológicamente normal y el tumor de colon) y dos casos de astrocitoma (glioblastoma) preparadas a partir de la biopsias embebidas en parafina de pacientes con cáncer colorrectal o astrocitoma. Para estas muestras, se llevó a cabo la inmunohistoquímica como se describió anteriormente utilizando el anticuerpo anti-GnRHR y anticuerpo monoclonal de ratón contra IL23R (R&D MAB14001; diluido 1:30, portaobjetos pretratados con tripsina 1 % a 37 °C durante 30 min) y su detección por un complejo avidina- biotina- peroxidasa (Vectastain Elite ABC kit [mouse IgG], Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU) con DAB como sustrato cromogénico.

**Confirmación de regulación positiva de proteína IL23 y GnRHR en células 0205 con NAV3 silenciado, y en muestras de tejido de CRC y glioblastoma**

15 0146 La regulación positiva de los niveles de proteína GnRHR en las células con NAV3 silenciado se demostró por inmunotinción. La tinción de GnRHR fue más alta en células con silenciamiento de NAV3 que en las células tipo silvestre y las células control transfectadas con ARNsi codificado (**Figura 11 a-c**) La inmunotinción de la proteína GnRHR en las muestras de tejido con CRC también fue más alta que en el epitelio normal de colon (**Figura 11 d**).  
 20 Los resultados eran repetibles en dos muestras típicas de un paciente con CRC, un caso con un tipo MSS de CRC y en el 41 % de las células con NAV3 eliminado en el tumor (el corte para delección NAV3 es del 3 % en la referencia normal como se informó anteriormente, **Figura 11 e**), y en el caso de CRC tipo MSI y el 8 % de las células con NAV3 eliminado en el tumor (**Figura 11 f**). Igualmente, se observó regulación positiva de GnRHR e IL23R en una serie de muestras preliminares de glioblastoma (astrocitoma) que mostraron delección de NAV3 en comparación con los tumores gliales sin delección (**Figura 11 g y h**).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Helsingin yliopiston rahastot
- <120> Métodos y usos que implican aberraciones genéticas de NAV 3 y expresión aberrante de múltiples genes
- 35 <130> 2081898PC
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.3
- 40 <210> 1  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 45 <220>  
<223> oligonucleótido
- 50 <400> 1  
cctgctattt tcattcttca agc 23
- <210> 2  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 55 <220>  
<223> oligonucleótido
- 60 <400> 2  
ggctgggatg ctgtttgag 19
- <210> 3  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 65

<220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 3  
 5 gatgctgttt gagcgcata tgctgggcc 30  
  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 4  
 15 ggacuaaacc uauauacua 19  
  
 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 5  
 25 gagagggucu ucagaugua 19  
  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 6  
 35 caggagccu cuaauuaa 19  
  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 40 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 7  
 45 gcuguuagcu cagauuuu 19  
  
 <210> 8  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
  
 <400> 8  
 55 atccatggag ctcagcaa 18  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

	<220> <223> oligonucleótido	
5	<400> 9 ttggctgctt cttggagttt	20
10	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> oligonucleótido	
15	<400> 10 aagagcacgg ctgaagactc	20
20	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
25	<400> 11 gcatgggttt aaaaaggcaa	20
30	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido	
35	<400> 12 cgcaaaactc gctattcgac a	21
40	<210> 13 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> oligonucleótido	
45	<400> 13 atggcttccc tcaggcaga	19
50	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido	
55	<400> 14 ttggctgctt cttggagttt	20
60	<210> 15 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
65		

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 15

5 caccaaatct agagctgcat ca 22

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de demostración del carácter maligno de un tumor o de una subpoblación celular de un sujeto, comprendiendo el método:
  - i) determinar un cambio en el número de copias de NAV3 en una muestra biológica del sujeto; y
  - ii) determinar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina, en la muestra biológica o en otra muestra biológica del sujeto;
  - iii) demostrar el carácter maligno de un tumor o de una subpoblación celular de un sujeto, cuando tanto un cambio en el número de copias de NAV3 como la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina están presentes en la(s) muestra(s) del sujeto.
  
2. Un método de predicción de un pronóstico de un sujeto que tiene un tumor, comprendiendo el método:
  - i) determinar un cambio en el número de copias de NAV3 en una muestra biológica del sujeto;
  - ii) determinar la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R o beta-catenina, en la muestra biológica o en otra muestra biológica del sujeto; y
  - iii) predecir un pronóstico de un sujeto, que tiene tanto un cambio en el número de copias de NAV3 como la sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R o beta-catenina en la(s) muestra(s).
  
3. Un uso del gen NAV3 o de un producto génico y al menos un gen y/o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina para demostrar el carácter maligno de un tumor o de una subpoblación celular con un cambio en el número de copias de NAV3 y con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina en un sujeto.
  
4. Un uso del gen NAV3 o de un producto génico y al menos un gen y/o un producto génico seleccionados de entre IL23R o beta-catenina para predecir el pronóstico de un sujeto.
  
5. El método o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cambio en el número de copias de NAV3 lo causa una delección, amplificación o translocación del gen NAV3 o una gran parte de él.
  
6. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor es un tumor colorrectal, tumor cerebral o tumor de queratinocitos epidérmicos.
  
7. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor es un carcinoma.
  
8. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el/los gen(es) y/o el/los producto(s) génico(s) están activados, inactivados, sobreexpresados o infraexpresados, o la cantidad del producto génico está aumentada o disminuida.
  
9. El método o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3 o 5-8, en el que la presencia de un tumor con un cambio en el número de copias de NAV3 y con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina se asocia con metástasis en ganglios linfáticos, alto grado de malignidad y/o baja supervivencia.
  
10. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2,4 o 5-8, en el que la presencia de un tumor con un cambio en el número de copias de NAV3 y con sobreexpresión de al menos un gen o un producto génico seleccionados de entre IL23R o beta-catenina se asocia con metástasis en ganglios linfáticos, alto grado de malignidad y/o baja supervivencia.
  
11. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-9, en el que el/los gen(es) seleccionados de entre IL23R, GnRHR, beta-catenina, codifican una proteína, que es una proteína de membrana, una proteína que regula los procesos celulares o una proteína de unión a nucleótidos purínicos.
  
12. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 5-8 o 10, en el que el/los gen(es) seleccionados de entre IL23R o beta-catenina, codifican una proteína, que es una proteína de membrana, una proteína que regula procesos celulares o una proteína de unión a nucleótidos purínicos.
  
13. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5-9 u 11, en el que el gen o el producto génico son IL23R y/o GnRHR.
  
14. El método o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor cerebral es un glioma.

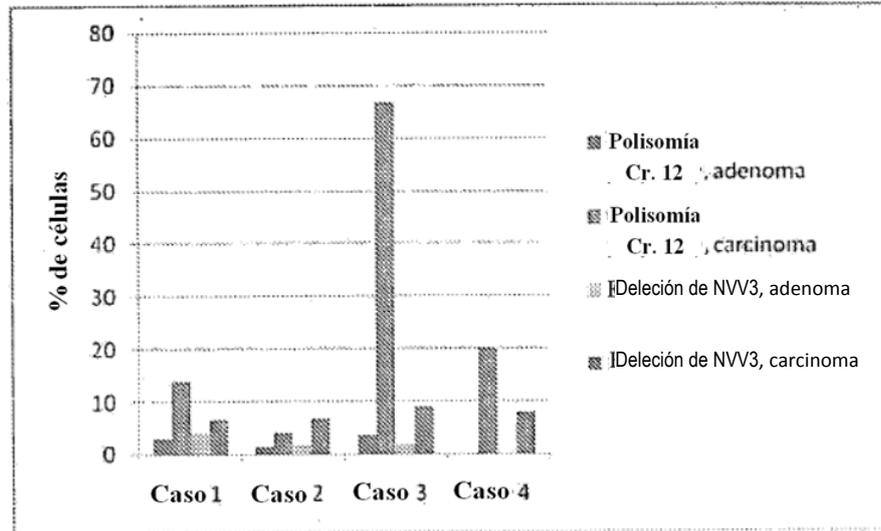


Figura 1

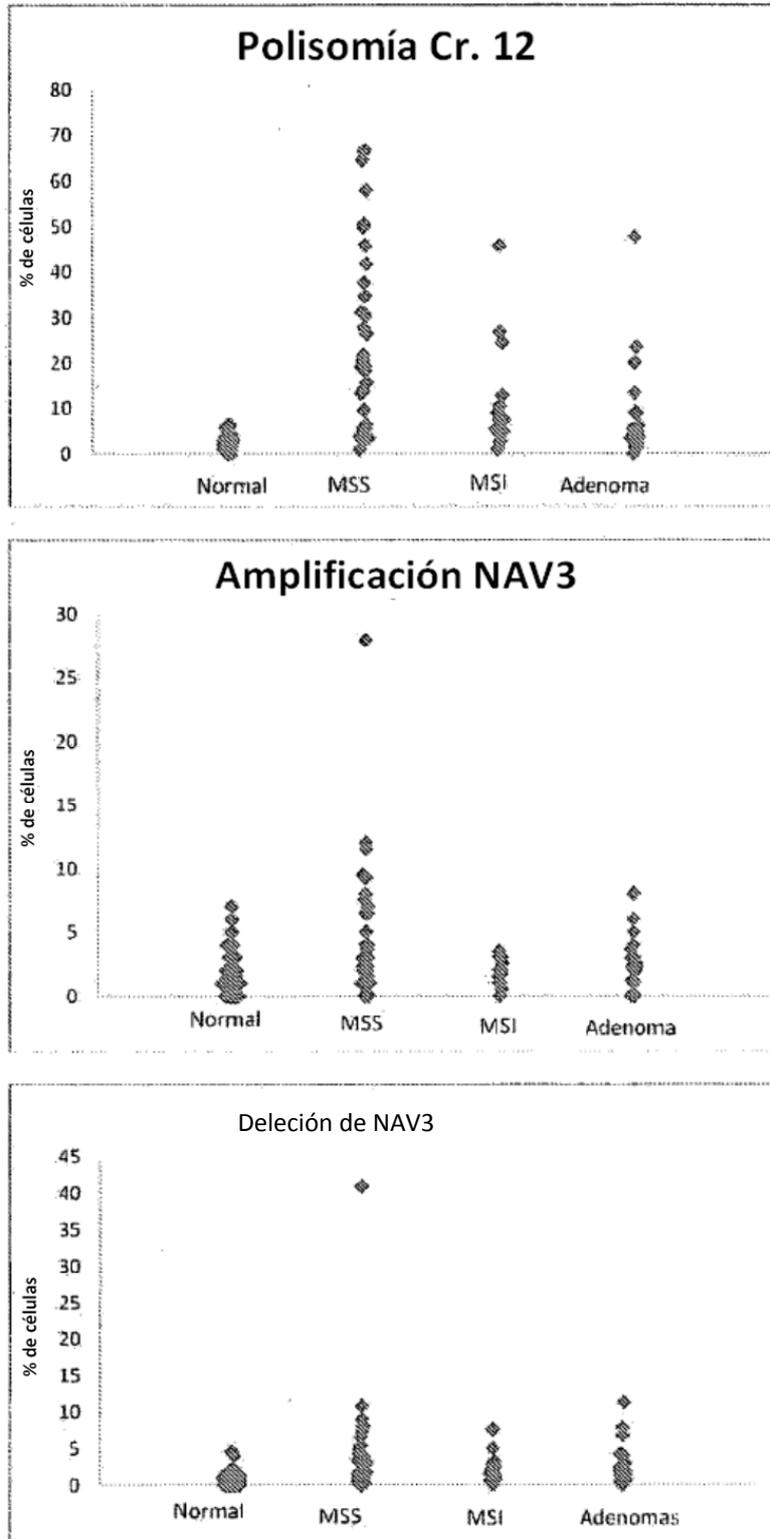


Figura 2

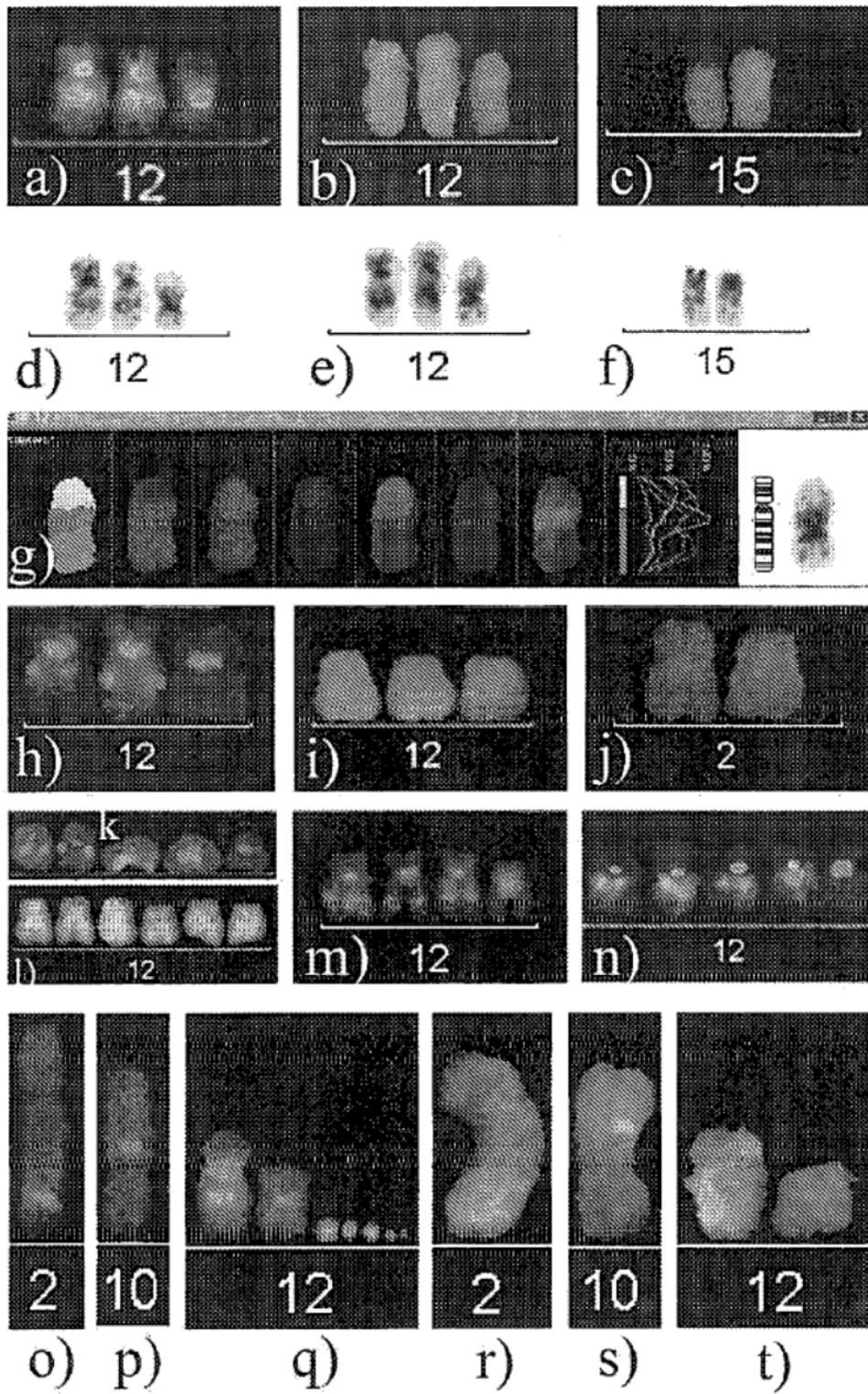


Figura 3

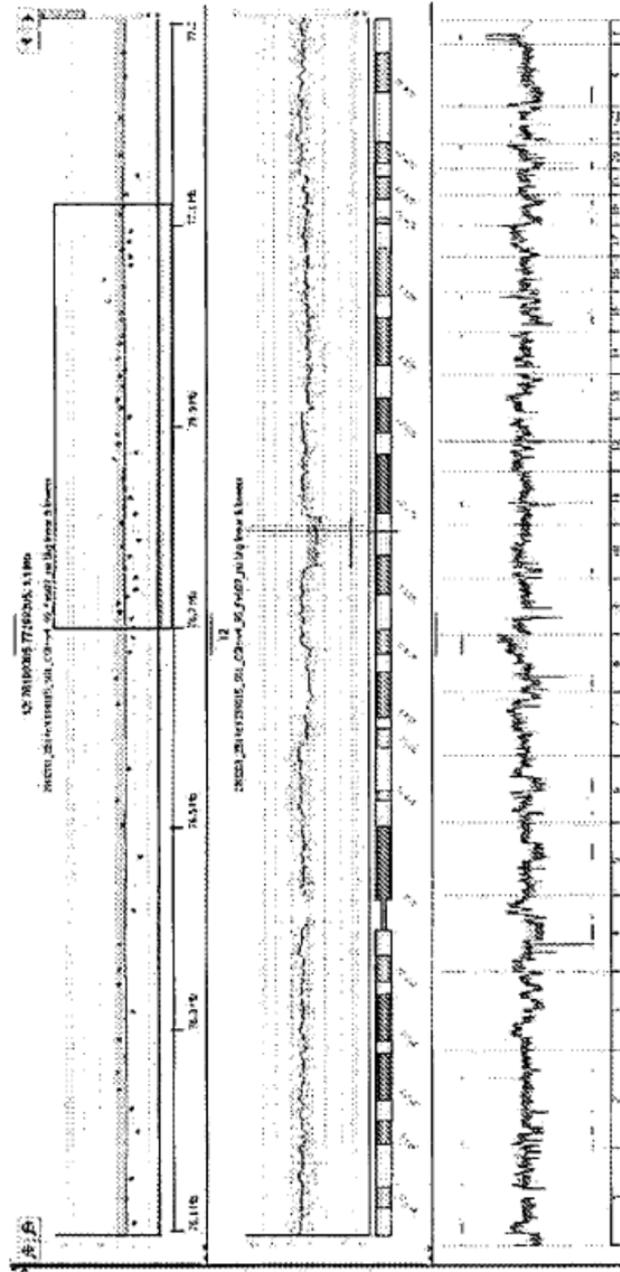


Figura 4

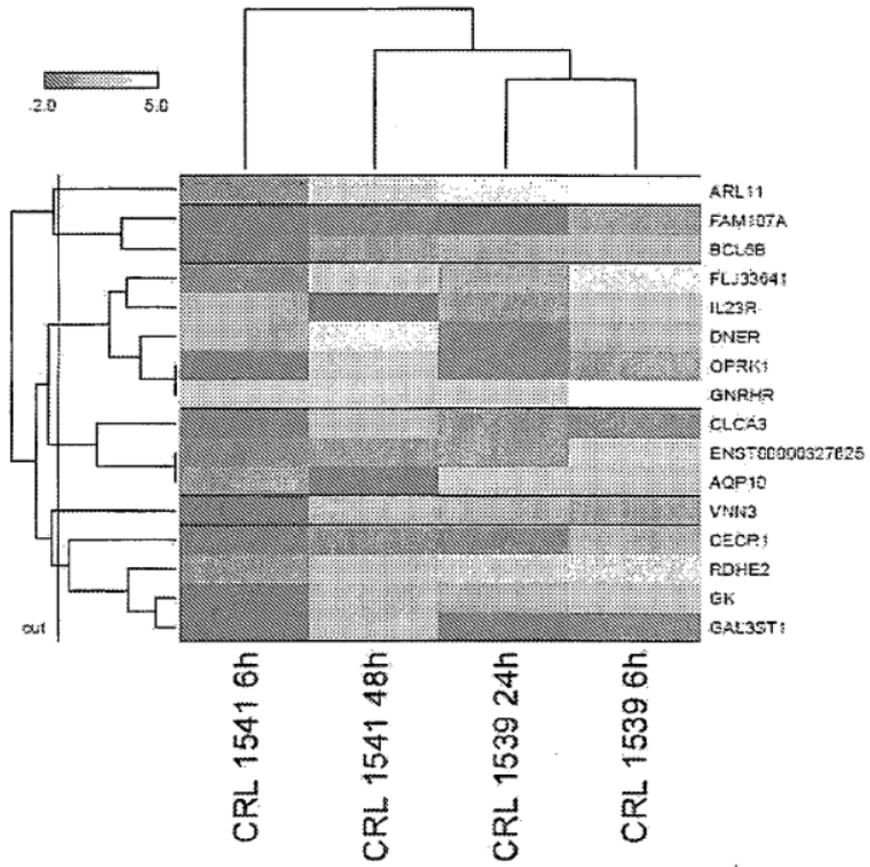


Figura 5

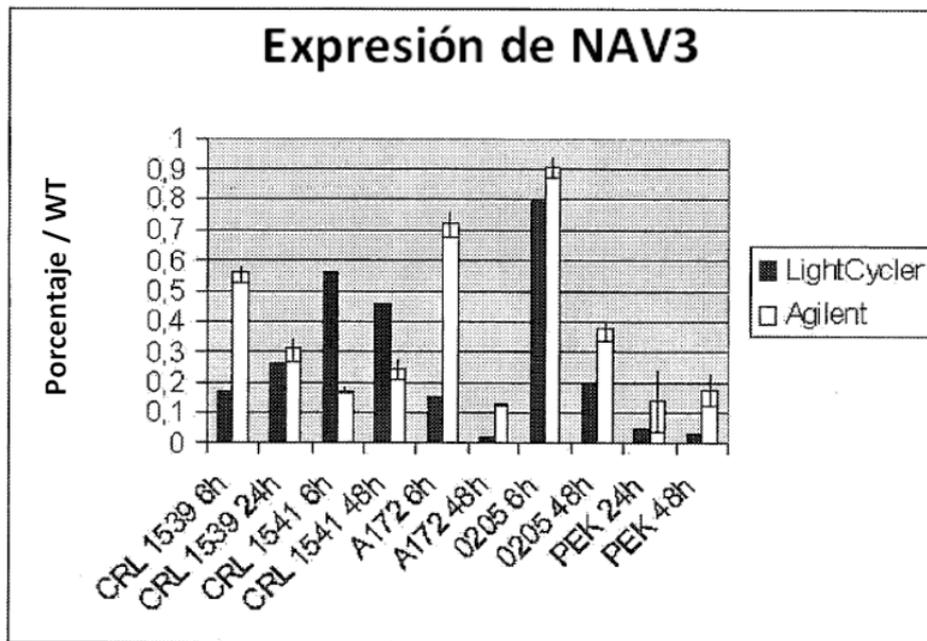
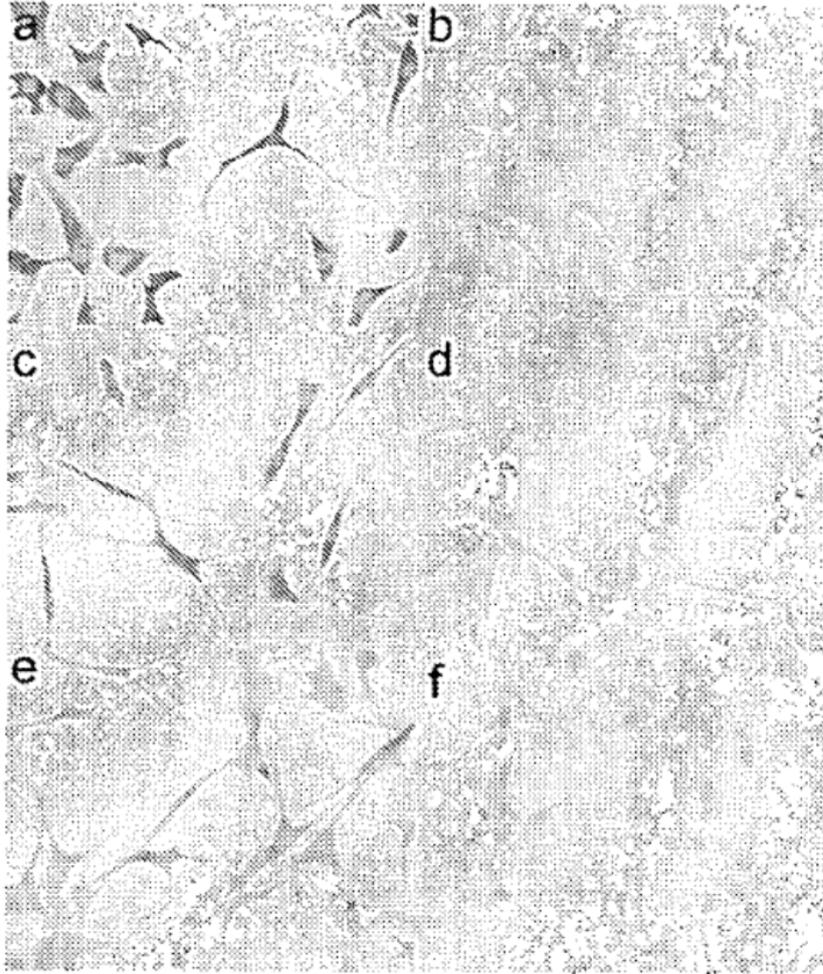


Figura 6



**Figura 7**

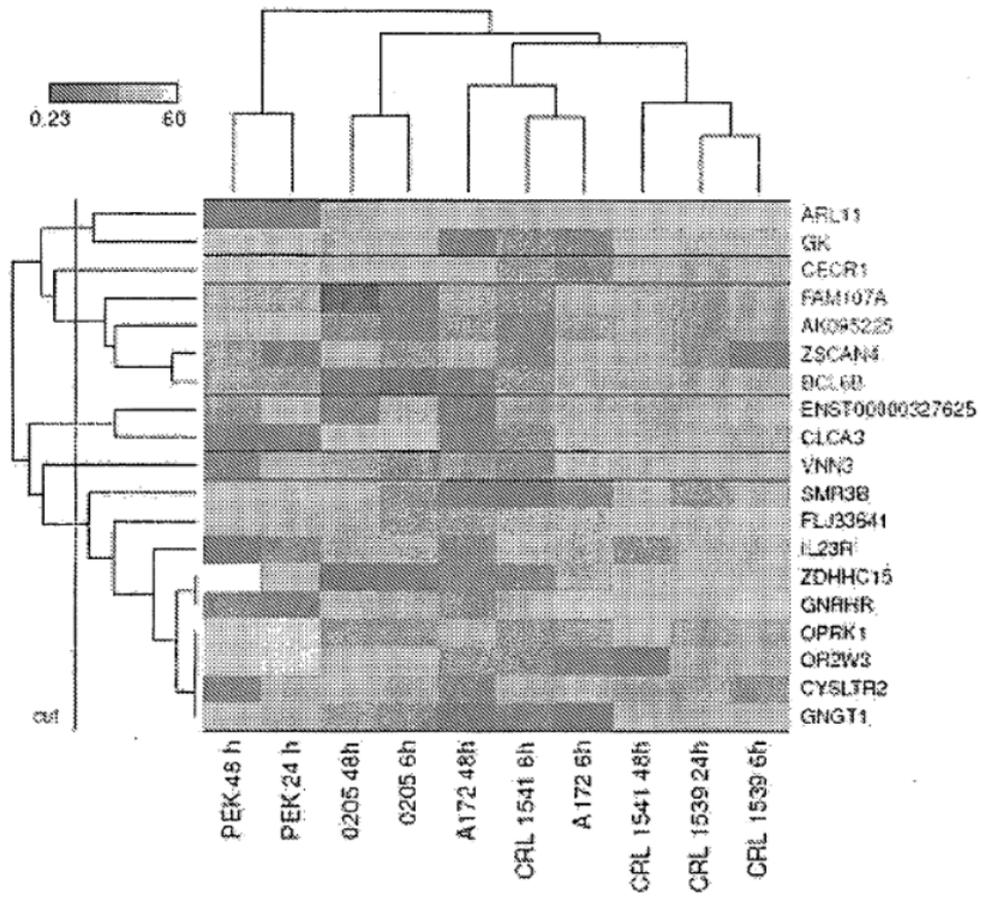


Figura 8

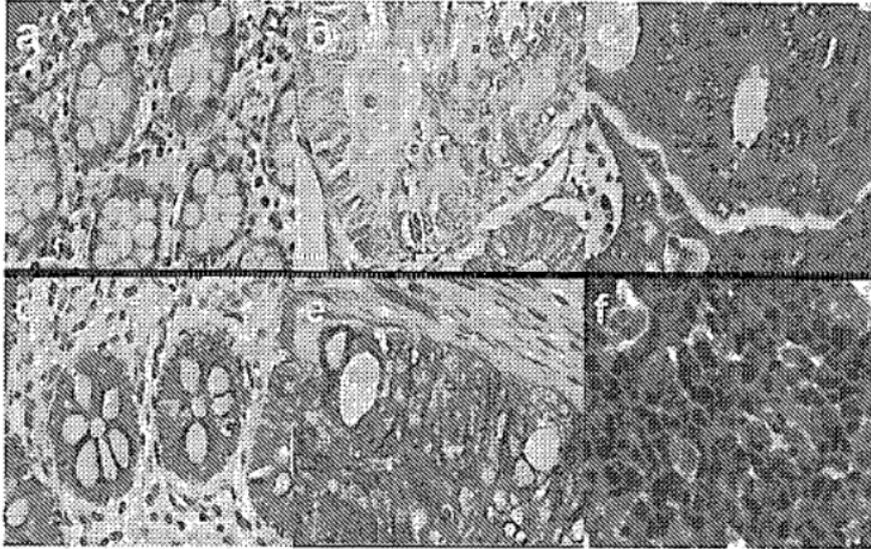


Figura 9

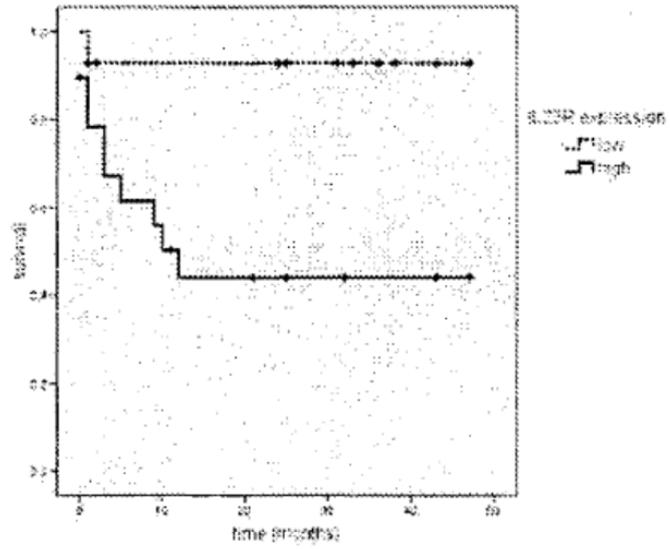
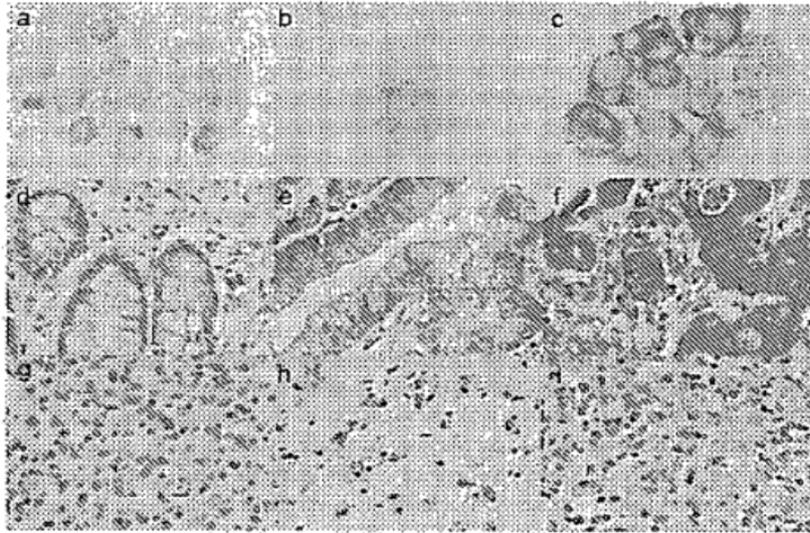


Figura 10



**Figura 11**