

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 578**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2008** **E 08796270 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2185695**

54 Título: **Diferenciación de las células madre de embriones humanos**

30 Prioridad:

18.07.2007 US 779311

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

09.06.2015

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
1000 GIBRALTAR DRIVE
MILPITAS, CA 95035, US**

72 Inventor/es:

REZANIA, ALIREZA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 537 578 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

Diferenciación de las células madre de embriones humanos

5 ÁMBITO DE LA INVENCION

Esta es, en parte, la continuación de la solicitud de EE.UU. nº 11/736.908, presentada el 18 de abril del 2007 que reclama la prioridad para: la solicitud provisional de EE.UU. nº 50/745.899, presentada el 28 de abril del 2006; la solicitud provisional de EE.UU. nº 50/827.695, presentada el 30 de abril del 2006 y la solicitud provisional de EE.UU. nº 50/882.670, presentada el 29 de diciembre del 2006.

La presente invención se refiere a los métodos para promover la diferenciación de las células madre pluripotentes. La presente invención se refiere, en particular, al método mejorado para la formación del endodermo pancreático, de células que expresan la hormona pancreática y de la hormona pancreática que segrega células. La presente invención se refiere también a los métodos para promover la diferenciación de las células madre pluripotentes, sin hacer uso de una monocapa sustentadora celular.

ANTECEDENTES

Los avances en la terapia de sustitución celular para la diabetes *mellitus* tipo 1 y la escasez de islotes de Langerhans trasplantables han hecho que el interés se centre en el desarrollo de fuentes de células productoras de insulina o de células β , apropiadas para los injertos. Una manera de enfocarlo consiste en la generación de células β funcionales a partir de células madre pluripotentes como, por ejemplo, células madre embrionarias.

En el desarrollo vertebrado embrionario, una célula pluripotente da lugar a un grupo de células compuestas de tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) en un proceso conocido como gastrulación. Tejidos como, por ejemplo, el tiroides, el timo, el páncreas, el intestino y el hígado se desarrollarán a partir del endodermo, a través de una etapa intermedia. La etapa intermedia en este proceso consiste en la formación de un endodermo definitivo. Las células del endodermo definitivo expresan un número de marcadores como, por ejemplo, HNF-3 beta, GATA4, Mix11, CXCR4 y Sox-17.

La formación del páncreas surge de la diferenciación del endodermo definitivo en el interior del endodermo pancreático. Las células del endodermo pancreático expresan el gen Pdx1 de la homeosecuencia pancreático duodenal. En ausencia de Pdx1, el páncreas no consigue desarrollar la formación de esbozos ventrales ni dorsales. Por tanto, la expresión de Pdx1 marca una fase crítica en la organogénesis pancreática. El páncreas maduro contiene tejido exocrino y tejido endocrino, entre otros tipos de células. Ambos tejidos surgen de la diferenciación del endodermo pancreático.

Las células que soportan las propiedades de los islotes se han derivado, según se informa, de células embrionarias del ratón. Por ejemplo, Lumelsky y otros autores (*Science* 292,1.389, 2001) señalan que la diferenciación de las células madre de embriones de ratón en estructuras secretoras de insulina es similar a la de los islotes pancreáticos. Soria y otros autores (*Diabetes* 49, 157, 2000) señalan que las células secretoras de insulina derivadas de las células madre de embriones de ratón normalizan la glucemia en ratones sometidos a la diabetes inducida por estreptozotocina.

En un ejemplo, Hori y otros autores (*PNAS*, 99-16.105, 2002) divulgan que el tratamiento de las células madre de embriones de ratón con inhibidores de fosfoinositido 3-quinasa (LY294002) produjo células que se parecían a las células β .

En otro ejemplo, Blyszczuk y otros autores (*PNAS*, 100-998, 2003) señalan que la generación de células productoras de insulina a partir de células madre de embriones de ratón expresan, constitutivamente, el Pax4.

Micallef y otros autores señalan que el ácido retinoico puede regular la implicación de las células madre embrionarias en la formación de endodermos de Pdx1 pancreático positivos. El ácido retinoico es el más efectivo a una expresión inducida de Pdx1 cuando se añade a cultivos en el día 4 de la diferenciación de la célula madre embrionaria, durante un período que se corresponde con el final de la gastrulación en el embrión (*Diabetes* 54-301, 2005).

Miyazaki y otros autores señalan que una línea de células madre de embrión de ratón sobre expresa el Pdx1. Sus resultados muestran que la expresión exógena de Pdx1 potencia claramente la expresión de los genes de la insulina, somatostatina, glucoquinasa, Neurogenin 3, P48, Pax6 y HNF-6 en las células diferenciadas resultantes (*Diabetes* 53-1.030, 2004).

Skoudy y otros autores señalan que la activina A (miembro de la superfamilia TGF β) activa la expresión de los genes exocrinos pancreáticos (p48 y amilasa) y de los genes endocrinos (Pdx1, insulina y glucagón) en células madre de

embrión de ratón. Se observó que se alcanzaba el máximo efecto utilizando para ello la activina A InM. También observaron que la expresión del nivel de insulina y de mRNA de Pdx1 no se veían afectados por el ácido retinoico; sin embargo, el tratamiento con FGF7 de 3nM dio como resultado un incremento en el nivel de la transcripción Pdx1 (*Biochem. J.* 379-749, 2004).

Shiraki y otros autores estudiaron los efectos de los factores de crecimiento que potencian, específicamente, la diferenciación de las células madre embrionarias en el interior de las células de Pdx1 positivas. Observaron que la reproducibilidad de TGFβ2 producía una mayor proporción de células de Pdx1 positivas (*Genes Cells*, Jun. 2005; 10(6)-503-16).

Gordon y otro autores demostraron la inducción de Brachyury+/HNF-3beta+ células del endodermo a partir de células madre de embriones de ratón, en ausencia de suero y en presencia de activina, junto con un inhibidor de señalización de Wnt (EE. UU. 2006/0003446A1).

Gordon y otro autores (*PNAS*, vol. 103, página 16.806, 2006) manifiestan que "se requirieron, simultáneamente, Wnt y TGFβ/Nodal/señalización de activina para la generación de la anterior línea primitiva".

Sin embargo, el desarrollo del modelo de células madre de embriones de ratón puede no mimetizar exactamente el programa de desarrollo en mamíferos superiores como, por ejemplo, los seres humanos.

Thomson y otros autores aislaron las células madre embrionarias de los blastocitos humanos (*Science* 282,114, 1998). Al mismo tiempo, Gearhart y sus colaboradores derivaron gérmenes embrionarios humanos (hEG) y líneas celulares a partir del tejido gonadal fetal (Shamblott y otros autores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE. UU. 95, 13.726, 1998). A diferencia de las células madre de embriones de ratón a las que se les impidió la diferenciación simplemente mediante el cultivo con el factor inhibidor de la leucemia (LIF), las células madre de embriones humanos deben conservarse bajo unas condiciones muy especiales (Pat. de EE. UU. nº 6.200.806; WO 99/20.741; WO 01/51.616).

D'amour y otros autores describen la producción de cultivos enriquecidos con células madre de embriones humanos derivadas del endodermo definitivo, en presencia de una elevada concentración de activina y baja de suero (D'amour KA y otros autores, 2005). Trasplantar estas células bajo la cápsula renal de los ratones dio como resultado la diferenciación en el interior de más células maduras con las características de algunos órganos endodérmicos. Las células madre de embriones humanos derivadas de las células del endodermo definitivo pueden diferenciarse mejor en el interior de células de Pdx1 positivas tras la adición de FGF10 (EE. UU. 2005/0266554A1)

D'amour y otros autores (*Nature Biotechnology*-24, 1.392-1.401 (2006) manifiestan: " hemos desarrollado un proceso de diferenciación que convierte las células madre de embriones humanos (hES) en células endocrinas capaces de sintetizar las hormonas pancreáticas: insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina. Este proceso mimetiza *in vivo* la organogénesis pancreática conduciendo las células a través de varias etapas que se parecen al endodermo definitivo, endodermo del tubo intestinal, endodermo pancreático y al precursor endocrino, en ruta hacia las células que expresan hormonas endocrinas".

En otro ejemplo, Fisk y otros autores señalan un sistema para producir células de los islotes pancreáticos a partir de células madre de embriones humanos (EE. UU. 2006/0040387A1). En este caso, la vía de diferenciación se dividió en tres etapas. Primero, las células madre de embriones humanos se diferenciaron del endodermo utilizando para ello una combinación de butirato y activina A. Luego, se cultivaron las células con los antagonistas de TGFβ como, por ejemplo, Noggin combinado con EGF o betacelulina para generar células de Pdx1 positivas. La diferenciación terminal se indujo por nicotinamida.

En un ejemplo, Benvenisty y otros autores manifiestan: "concluimos que la sobre expresión de Pdx1 potenciaba la expresión de los genes pancreáticos enriquecidos y que la inducción de la expresión de insulina puede requerir señales adicionales que solo están presentes *in vivo*" (Benvenisty y otros autores, *Stem Cells*, 2006, 24-1.923-1.930).

En consecuencia, sigue faltando una necesidad significativa para desarrollar las condiciones que permitan establecer líneas de células madre pluripotentes que puedan expandirse para así responder a las necesidades clínicas actuales, mientras que se mantiene el potencial para su diferenciación en el interior de las células pancreático endocrinas, células que expresan hormonas pancreáticas o células que segregan hormonas pancreáticas. Hemos adoptado una manera alternativa de enfocarlo para mejorar la eficiencia de la diferenciación de células madre de embriones humanos hacia células pancreático endocrinas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino y que comprende las fases de:

a. cultivo de las células madre pluripotentes,

b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio químicamente definido que se compone del medio suplementado con B27 y mediante el tratamiento de las células pluripotentes con activina A.

c. diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto o ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto y

d. diferenciación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con un inhibidor de la gamma secretasa.

La invención también proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y que comprende las fases de:

a. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio químicamente definido que se compone del medio suplementado con B27,

b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, mediante el tratamiento de las células pluripotentes con activina A y

c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto o ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

La invención también proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores que son característicos del linaje del endodermo definitivo y que comprende las fases de:

a. recubrimiento de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y

b. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio químicamente definido que se compone del medio suplementado con B27 y tratamiento de las células pluripotentes con activina A.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes y que comprende las fases de:

a. cultivo de las células madre pluripotentes y

b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,

c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y

d. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino.

En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se diferencian de las células madre pluripotentes mediante el tratamiento de las células madre pluripotentes con cualquiera de los siguientes métodos:

a. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A, en ausencia de suero y, luego, cultivar las células con la activina A y el suero de una concentración diferente o

b. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A, en ausencia de suero y, luego, cultivar las células con la activina A y con suero de otra concentración o

c. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y un ligando Wnt, en ausencia de suero y, luego, extraer el ligando Wnt y cultivar las células con activina A, con suero o

d. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt o

e. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego, cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y, luego, cultivar las células madre pluripotentes con activina A, en un segundo medio de cultivo que contiene suero o

f. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y, luego, cultivar las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un segundo medio de cultivo que contiene suero de una concentración diferente o

g. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio suplementado con B27 y que contiene un ligando Wnt y activina A o

h. cultivo de las células madre pluripotentes sobre un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular en un medio suplementado con B27 y que contiene activina A.

En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se diferencian de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con cualquiera de los siguientes métodos:

a. tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con un factor de crecimiento de fibroblasto y un inhibidor de la vía de señalización Hedgehog, luego extraer el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblasto y el inhibidor de la vía de señalización Hedgehog y, posteriormente, cultivar las células en un medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblasto y el inhibidor de la vía de señalización Hedgehog o

b. tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico y, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto o

c. tratamiento de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico, luego extraer el ácido retinoico y, posteriormente, tratar las células con al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino se diferencian de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con cualquiera de los siguientes métodos:

a. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene DAPT y Exendin-4, luego extraer el medio que contiene DAPT y Exendin-4 y, posteriormente, cultivar las células en un medio que contiene Exendin-1, IGF-1 y HGF o

b. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene Exendin-4, luego extraer el medio que contiene Exendin-4 y, posteriormente, cultivar las células en un medio que contiene Exendin-1, IGF-1 y HGF o

c. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene DAPT y Exendin-4 ó

d. cultivar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en un medio que contiene Exendin-4 o

e. tratar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con un factor que inhibe la vía de señalización Notch.

En una materialización, la presente divulgación describe un método para tratar a un paciente que sufre diabetes y que comprende las fases de:

a. cultivo de las células madre pluripotentes,

b. diferenciación de las células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo,

c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático,

d. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células del linaje celular β y

e. implantación de las células del linaje celular β en el paciente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El panel de la **figura 1** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo: CXCR4, GATA4, HNF-3beta, Mix1l y Sox-17 en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo el tratamiento con 100ng/ml de activina A durante dos, cinco y ocho días. Se ensayó la expresión de los marcadores del endodermo definitivo al nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel b muestra la expresión de los marcadores Cerberus y Otx-I del endodermo anterior y los genes Hox en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo el tratamiento con 100 ng/ml de activina A durante tres y cinco días.

La **figura 2** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo el tratamiento con 100 ng/ml de activina A durante cinco días. La expresión de los marcadores del endodermo definitivo se detectó mediante inmunohistoquímica. El panel (a) muestra la expresión de Sox-17. El panel (b) muestra la expresión de HNF-3beta. El panel (c) muestra la expresión de Oct3/4.

La **figura 3** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo un protocolo de diferenciación escalonada. La expresión de los marcadores del endodermo definitivo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de GATA4. El panel (b) muestra la expresión de Sox-17. El panel (c) muestra la expresión de HNF-3beta. El panel (d) muestra la expresión de Mix1l. Los datos con la indicación 'AA' aluden a un tratamiento con activina A durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o

siete días (7 d). Los datos con la indicación 'UT' aluden a cultivos controles no tratados durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d).

La **figura 4** muestra la expresión de marcadores extraembrionarios del endodermo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo un protocolo de diferenciación escalonada. La expresión de los marcadores extraembrionarios del endodermo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel (a) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de AFP. El panel (b) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de Sox-17. Los datos con la indicación 'AA' aluden a un tratamiento con activina A durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d). Los datos con la indicación 'UT' aluden a cultivos controles no tratados durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d).

La **figura 5** muestra la expresión de marcadores del mesodermo y ectodermo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo un protocolo de diferenciación escalonada. La expresión de los marcadores del mesodermo y ectodermo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias. El panel (a) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de Brachyury. El panel (b) muestra el efecto de 100 ng/ml de activina A en una expresión de Zic 1. Los datos con la indicación 'AA' aluden a un tratamiento con activina A durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d). Los datos con la indicación 'UT' aluden a cultivos controles no tratados durante uno (1 d), tres (3 d), cinco (5 d) o siete días (7 d).

La **figura 6** muestra la expresión de los marcadores del endodermo definitivo: Brachyury (panel a), CXCR4 (panel b), Mix11 (panel c), Sox-17 (panel d), HNF-3beta (panel e), Oct4 (panel f), en la línea H7 de células madre de embriones humanos y siguiendo un tratamiento con 100 ng/ml de activina A durante uno, tres, cinco y siete días. La expresión de marcadores del endodermo definitivo se ensayó a un nivel de mRNA y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos no tratados con células madre embrionarias.

La **figura 7** muestra la expresión de marcadores del endodermo definitivo en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo definitivo se detectó mediante inmunohistoquímica. Los paneles (a) y (b) muestran la expresión de Sox-17. Los paneles (c) y (d) muestran la expresión de HNF-3beta. Los paneles (e) y (f) muestran la expresión de GATA4. Los paneles (b), (d) y (f) muestran la contratinción de los núcleos con DAPI. Las columnas con la indicación 'tratado' aluden al tratamiento con activina A (100 ng/ml) durante cinco días. Las columnas con la indicación 'no tratado' aluden a controles no tratados.

La **figura 8** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de Pdx1. El panel (b) muestra la expresión de GLUT-2. El panel (c) muestra la expresión de PTF1.

La **figura 9** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un segundo protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se detectó mediante inmunohistoquímica. El panel (a) muestra la expresión de Pdx1 en el control no tratado y el panel (b) muestra la expresión de Pdx1 en el cultivo tratado mediante el protocolo de diferenciación escalonada.

La **figura 10** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un tercer protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de NeuroD1. El panel (b) muestra la expresión de NGN-3. El panel (c) muestra la expresión de insulina. El panel (d) muestra la expresión de Hes-1, se normaliza el nivel de expresión para las células del endodermo pancreático.

La **figura 11** muestra la expresión de marcadores del endodermo pancreático en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores del endodermo pancreático se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de Nkx2.2. El panel (b) muestra la expresión de Pdx1.

La **figura 12** muestra, con cada párrafo (P0, P1 y P2), la expresión de Pdx1 en células en cultivo. La expresión de Pdx1 se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias.

La **figura 13** muestra la expresión de marcadores de hepatocitos en la línea H9 de células madre de embriones humanos, siguiendo la puesta en práctica de un tercer protocolo de diferenciación. La expresión de los marcadores

de hepatocitos se ensayó mediante PCR y se normalizó a niveles de expresión en seres humanos tratados con activina A de células madre embrionarias. El panel (a) muestra la expresión de AFP. El panel (b) muestra la expresión de albúmina.

- 5 La **figura 14** muestra la expresión de marcadores de pluripotencia en la línea H9 de células madre de embriones humanos. La expresión de los marcadores de pluripotencia se ensayó mediante inmunohistoquímica. El panel (a) muestra la expresión de Oct4. El panel (b) muestra la expresión de fosfatasa alcalina.
- 10 La **figura 15** muestra el cariotipo de la línea H9 de células madre de embriones humanos. El cariotipo se determinó en células, párrafo número P36, que se cultivaron en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón.
- La **figura 16** representa el esquema de un protocolo de diferenciación en esta invención, donde las células madre de embriones humanos se diferencian en el interior del endodermo definitivo, en un sistema de alimentación libre.
- 15 La **figura 17** representa el perfil FACS de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 44, cultivado en concentraciones variables de Matrigel y expuesto, durante cinco días, a baja concentración de suero (0,5-2%) y a una alta concentración de activina A (100 ng/ml). La expresión del marcador CXCR4 (CD 184) del endodermo definitivo se muestra en el eje Y y la expresión del marcador CD9 de ES se muestra en el eje X.
- 20 La **figura 18** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR para los marcadores del endodermo definitivo a partir de los cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 44, cultivada en una dilución de Matrigel (■) 1:10, dilución de Matrigel (■) 1:20 ó dilución de Matrigel (□) 1:30 y expuesta al protocolo de diferenciación divulgado en la referencia 14. La inducción cruzada está vinculada con las células indiferenciadas de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 44 y cultivadas en un medio acondicionado, utilizando para ello fibroblastos embrionarios de ratón.
- 25 La **figura 19** muestra los diagramas de dispersión para la expresión génica global en células madre pluripotentes e indiferenciadas y las células del endodermo definitivo obtenidas a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes. Los datos mostrados proceden de cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 44, cultivados en fibroblastos embrionarios de ratón (panel de la derecha) y cultivados en Matrigel (panel de la izquierda), párrafo 83.
- 30 La **figura 20** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS en el quinto día para: la línea H1 de células madre de embriones humanos (panel a), la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel b) y la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel c), cultivadas en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón y expuestas al protocolo de diferenciación del endodermo definitivo, divulgado en la referencia 4.
- 35 La **figura 21** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR de la expresión de los marcadores del endodermo definitivo ya indicados, en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel a) y de la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel b), cultivados en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.
- 40 La **figura 22** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS en el quinto día para: la línea H1 de células madre de embriones humanos (panel a), la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel b) y la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel c), cultivados en Matrigel (dilución de 1:30) y expuestos al protocolo de diferenciación del endodermo definitivo, divulgado en la referencia 4.
- 45 La **figura 23** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR de la expresión de los marcadores del endodermo definitivo ya indicados, en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel a), la línea H9 de células madre de embriones humanos (panel b) y la línea H1 de células madre de embriones humanos (panel c). Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas. Las células se trataron según los métodos divulgados en la referencia 4.
- 50 La **figura 24** representa la etapa de contraste de imágenes de cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 46, en presencia de 100 ng/ml de activina A (panel a) ó 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml Wnt-3a (panel b). Las células se trataron durante cinco días.
- 55 La **figura 25** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos, párrafo 44 (paneles a y b) y H9, párrafo 46 (paneles c y d), siguiendo el tratamiento según los métodos divulgados en la referencia 4. Los paneles b y d muestran el efecto de 20 ng/ml Wnt-3a en la expresión del CXCR4. Los paneles a y c muestran la expresión del CXCR en ausencia de Wnt-3a. Los resultados se obtuvieron cinco días después del tratamiento.
- 60 La **figura 26** demuestra, en tiempo real, los datos de la PCR para la expresión de los genes indicados en cultivos de la línea H7 de células madre de embriones humanos (panel a) y H9 (panel b). Los cultivos se trataron con el protocolo de diferenciación divulgado en la referencia 4. También se examinaron los efectos de los agonistas de
- 65

Wnt; Wnt-3a (20 ng/ml), Wnt-5a (20 ng/ml), Wnt-7a (20 ng/ml), tal y como se indica en los paneles. Las células se trataron durante cinco días. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.

La **figura 27** representa la expresión del CXCR4 en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 46, mediante FACS, cinco días después del tratamiento. El panel (a) representa la expresión del CXCR4 en ausencia de Wnt-3a. El panel (b) representa la expresión del CXCR4 siguiendo el tratamiento con 10 ng/ml de Wnt-3a. El panel (c) representa la expresión del CXCR4 siguiendo el tratamiento con 20 ng/ml de Wnt-3a y el panel (d) representa la expresión del CXCR4 siguiendo el tratamiento con 50 ng/ml de Wnt-3a.

La **figura 28** representa la expresión de los marcadores definitivos ya indicados, en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, tras cinco días de tratamiento. Los resultados se muestran como un incremento en la expresión con respecto a las células indiferenciadas, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR. El panel (a) muestra el efecto de 10, 20 y 50 ng/ml de Wnt-3a en la expresión de los genes marcadores del endodermo definitivo ya indicados. El panel (b) muestra el efecto de 1,5 ó 10 ng/ml de Wnt-3a (etiquetas del eje x: 10, 5, 1) en la expresión en Goosecoid (■) y la expresión del CXCR4 (□), dos (2 d) y cinco días (5 d) después del tratamiento. El panel (c) muestra el efecto de 1,5 ó 10 ng/ml de Wnt-3a en el número de célula, dos (□) o cinco días (■).

La **figura 29** representa la expresión del CXCR4 en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, mediante FACS y siguiendo un tratamiento de cinco días con el protocolo de diferenciación divulgado en la referencia 4. Las células se cultivaron en ausencia de Wnt-3a o del inhibidor de GSK-3B (panel a), 20 ng/ml de Wnt-3a durante todo el período de cinco días (panel b), 1000 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel c), 500 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel d), 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel e), 10 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante todo el período de cinco días (panel f), 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los días 1 y 2 (panel g), 10 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los días 1 y 2 (panel h).

La **figura 30** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo mediante PCR y en tiempo real. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas. El panel (a) muestra los datos obtenidos a partir de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 48, tratadas con el protocolo del endodermo definitivo divulgado en la referencia 4 que contiene Wnt-3a o el inhibidor de GSK-3B, en las concentraciones y los tiempos indicados. El panel (b) muestra los datos obtenidos a partir de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 46, tratadas con el protocolo del endodermo definitivo divulgado en la referencia 4 que contiene Wnt-3a o el inhibidor de GSK-3B, en las concentraciones y los tiempos indicados.

La **figura 31** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS para las líneas de células madre de embriones humanos utilizadas en la presente invención. Los paneles (a-d) muestran los datos obtenidos a partir de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo número 49. Los paneles (e-f) muestran los datos obtenidos a partir de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo número 46. Los datos se obtuvieron en los cinco días posteriores al tratamiento. Las células se trataron en las siguientes condiciones: panel (a): 10 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días; panel (b): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días; panel (c): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días; panel (d): 10 ng/ml de activina A durante los cinco días más 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días; panel (e): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días y panel (f): 10 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días.

La **figura 32** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 49, tratadas con 10, 50 ó 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (Oct4); panel (b): Sox-17 y GATA4. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.

La **figura 33** representa la expresión del CXCR4 mediante FACS para la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 53. Los datos se obtuvieron en los cinco días posteriores al tratamiento. Las células se trataron en las siguientes condiciones: panel (a): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días y 25 ng/ml de BMP-4 durante los días 3 y 5; panel (b): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días; panel (c): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días; panel (d): 20 ng/ml de Wnt-3a + 25 ng/ml de BMP-4 durante los cinco días; panel (e): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3a + 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B durante los dos primeros días y panel (f): 100 ng/ml de activina A durante los cinco días más 25 ng/ml de BMP-4 durante los cinco días. Para todos los paneles, el eje X representa la expresión de CD9 y el eje Y representa la expresión del CXCR4 (CD184).

- La **figura 34** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo 46, tratadas con 10 ó 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a ó 100 nM del inhibidor de GSK-3B. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC y POU5F (Oct4); panel (b): Sox-17, HNF-3B y GATA4. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.
- La **figura 35** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 49, tratadas con 50 ó 100 ng/ml de activina A más 10 ó 100 nM del inhibidor de GSK-3B. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (Oct4); panel (b): Sox-17 y GATA4. Los resultados se expresan como un incremento con respecto a las células indiferenciadas.
- La **figura 36** representa la expresión génica de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR para cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 53, tratadas con combinaciones de activina A, Wnt-3a, inhibidor de GSK-3 y BMP-4, durante cinco días. Panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y Sox-7; panel (b): Sox-17, HNF-3B y GATA4.
- La **figura 37** representa el porcentaje de la expresión del CXCR4, determinada mediante FACS en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, tratadas en las condiciones enumeradas en la referencia 22.
- La **figura 38** representa la expresión de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, mediante FACS, en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, cultivadas en fibronectina (panel a) o Matrigel TM (panel b).
- La **figura 39** representa la expresión de los marcadores del endodermo definitivo, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR, en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, cultivadas en fibronectina(□) o en una dilución de factor de crecimiento reducido Matrigel (■) 1:10.
- La **figura 40** representa el efecto de varias concentraciones de Matrigel en presencia de baja concentración de suero, 100 ng/ml de activina A y 20 ng/ml de Wnt-3a, en la diferenciación de células madre de embriones humanos en el interior del endodermo definitivo. Las células se trataron según los métodos divulgados en la referencia 4. Los resultados mostrados son los niveles de expresión de los genes ya indicados, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR.
- La **figura 41** representa la función de Wnt-3a en la formación del endodermo definitivo mediante las células madre de embriones humanos conservadas en Matrigel pero diferenciadas en fibroblastos embrionarios de ratón. Los paneles (a-d) muestran, en tiempo real, los datos de la PCR para los genes ya indicados. Los paneles (e-g) muestran los datos del FACS para las condiciones ya indicadas.
- La **figura 42** muestra la diferenciación de las células madre de embriones humanos cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con Matrigel TM para el endodermo definitivo, siguiendo el tratamiento con el inhibidor de Wnt DKK-1. Los resultados mostrados son la expresión de los genes ya indicados, tal y como se determina, en tiempo real, mediante PCR en las células H9 tratadas según los métodos divulgados en la referencia 4, en presencia de 20 ng/ml de Wnt-3a más 100 ng/ml de DKK-1(DE + DKK-1) o en ausencia de DKK-1 (DE).
- La **figura 43** muestra la tinción de inmunofluorescencia de los marcadores del endodermo definitivo en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con Matrigel y diferenciadas en baja concentración de suero más 100 ng/ml de activina A sin (panel a) o con (panel b) 20 ng/ml de Wnt-3a Ecad=E-cadherina, NCAM=N-cadherina.
- La **figura 44** muestra la diferenciación de la línea SA002 de células madre de embriones humanos, párrafo 38, en el interior del endodermo definitivo. Las células se trataron durante cinco días en las condiciones ya indicadas y la expresión génica se determinó, en tiempo real, mediante PCR para los genes ya indicados en los paneles.
- La **figura 44** muestra la expresión del CXCR4 mediante FACS en la línea SA002 de células madre de embriones humanos, párrafo 38, siguiendo el tratamiento con 100 ng/ml de activina A (panel a), 100 ng/ml de activina A + 20 ng/ml de Wnt-3a (panel b) ó 100 ng/ml de activina A + 100 nM del IX inhibidor de GSK-3B (panel c). Las células se trataron durante cinco días.
- La **figura 46** muestra la diferenciación de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo 55, en el interior del endodermo definitivo, en sustrato de cultivo de tejido recubierto con suero humano. Las células se trataron en las condiciones ya indicadas y la expresión génica se determinó, en tiempo real, mediante PCR para los genes indicados en los paneles.
- La **figura 47** muestra la diferenciación de los cultivos de la línea H1 de células madre de embriones humanos, párrafo 54, en sustrato de cultivo de tejido recubierto con Matrigel TM para el endodermo definitivo. Se examinaron

los efectos de varios inhibidores GSK-B siguiendo un protocolo DE de cinco días. Se evaluaron los siguientes inhibidores GSK-3B, a 100 nM, durante los dos primeros días del tratamiento: GSK-3B, VIII, IX, XI y XII.

La **figura 48** muestra la expresión de AFP (panel a), Pdx1 (panel b), Cdx-2 y GLUT-2 (panel c) y HNF-3beta, HNF-3beta, HNF-6 y somatostatina (panel d) en cultivos de la línea H9 de células madre de embriones humanos, párrafo 49, cultivadas y tratadas según los métodos divulgados en la referencia 4, en presencia de 20 ng/ml de Wnt-3a durante los dos primeros días de tratamiento. Se siguió el tratamiento de manera que las células se trataron durante tres días adicionales con 2% de FBS más 1 mM de ácido retinoico, 0,1 a 1mM TTNPB (4[(E)- 2-(5, 6, 7, 8 tetrahidro- 5, 5, 8, 8- tetrametilo-2- naftalenilo) -1 propenilo] ácido benzoico, ácido arotinoide ó 0,1 mM AM-580 (4- [(5, 6, 7, 8- tetrahidro- 5, 5, 8, 8- tetrametilo-2- naftalenilo) carboxamida] ácido benzoico). Después, las células se trataron durante tres días adicionales con 2% de FBS más 20 ng/ml de bFGF.

La **figura 49** muestra, en tiempo real, los resultados de la PCR de la expresión de los marcadores del endodermo definitivo indicados en los paneles a y b, en los cultivos de la línea H1 de células madre de embriones humanos, tratadas con activina A y Wnt-1 para los tiempos y las concentraciones indicadas.

La **figura 50** representa la expresión del CXCR4 y CD9 mediante FACS, en los días 4 y 5, para EXPRES 01, BGO1V y las líneas celulares H1, párrafo 50, expuestas a los medios de diferenciación definidos o a baja concentración de suero basada en los medios de diferenciación.

La **figura 51** demuestra, en tiempo real, los datos de la PCR para EXPRES 01, BGO1V y cultivos H1 tratados con baja concentración de suero o definidos como medios + activina A + Wnt-3a en los días 4 y 5.

La **figura 52** representa las imágenes de inmunofluorescencia de EXPRES 01, párrafo 49, células diferenciadas en el interior de DE utilizando para ello 1% de b27 + DM-F12 + activina A + Wnt-3a + inhibidor de GSK-3B durante cinco días.

La **figura 51** demuestra, en tiempo real, los datos de la PCR para las células H1 expuestas a cualquier baja concentración de suero + activina A o medio definido + activina A, en los días 1-5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para mayor claridad de la divulgación y a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en subsecciones que describen o ilustran algunas propiedades, materializaciones o puestas en práctica de la presente invención y divulgación.

Definiciones

Las células madre son células indiferenciadas que se definen por su capacidad, en el nivel de células individuales, para que ambas se auto-renueven y se diferencien para así producir células progenitoras que incluyan progenitores de auto-renovación, progenitores de no renovación y células completamente diferenciadas. Las células madre se caracterizan también por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en el interior de células funcionales de varios linajes celulares y a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), además de dar lugar, tras el trasplante, a tejidos de múltiples capas germinales y para contribuir considerablemente, tras las inyecciones, a la mayoría, si no todos, de los tejidos en el interior de los blastocitos.

Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes, que significa que son capaces de dar lugar a todo tipo de células embrionarias y extraembrionarias; (2) pluripotentes, que significa que son capaces de dar lugar a todo tipo de células embrionarias; (3) multipotentes, que significa que son capaces de dar lugar a un subgrupo de linajes celulares pero todos dentro de un tejido en particular, órgano o sistema fisiológico (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) y que pueden generar descendencia que incluye HSC (auto-renovación), células sanguíneas restringidas a los progenitores oligopotentes y todo tipo de células y elementos (p. ej., plaquetas) que son componentes habituales de la sangre; (4) oligopotentes, que significa que son capaces de dar lugar a un subgrupo de linajes celulares más restringidos que las células madre multipotentes y (5) unipotentes, que significa que son capaces de dar lugar a un linaje celular individual (p. ej., células madre espermatogénicas).

La diferenciación es el proceso mediante el cual unas células no especializadas (no comprometidas) o menos especializadas adquieren las propiedades de unas células especializadas como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida a diferenciación es aquella que ha adoptado una posición más especializada (comprometida) dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica en el proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha actuado en la vía de diferenciación hasta un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en el interior de un tipo de célula específica o subgrupo de tipos de células y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en el interior de un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciado. La desdiferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal y como se utiliza aquí, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué célula procede y a qué células puede

dar lugar. El linaje de una célula la sitúa dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador específico de linaje se refiere a características asociadas específicamente con el fenotipo de células de un linaje de interés y puede utilizarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

5 La AFP o alfa-fetoproteína, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un antígeno producido al inicio del desarrollo hepático. La AFP también puede expresarse en células extraembrionarias.

10 La albúmina es una proteína monomérica soluble que constituye alrededor de la mitad de todas las proteínas séricas en adultos.

15 El linaje celular β se refiere a las células con expresión génica positiva para el factor de transcripción Pdx1 y para, al menos, uno de los siguientes factores de transcripción: NGN-3, Nkx2,2, Nkx6,1, NeuroD, Isl-1, HNF-3 beta, MAFA, Pax4 y Pax6. Las células que expresan marcadores característicos del linaje celular β contienen células β .

Brachyury, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia génica T-box. Es el marcador para la línea primitiva y para las células del mesodermo.

20 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, tal y como se utilizan aquí, se refieren a las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: Sox-17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, Cer1, Nodal, FGF8, Brachyury, la proteína de homosecuencia similar al Mix, FGF4, CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-kit, CD99 ó OTX2. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo contienen células precursoras de la línea primitiva, células de la línea primitiva, células del mesodermo y células del endodermo definitivo.

25 Tanto el C-kit como el CD117 se refieren a una superficie celular receptora de tirosina quinasa que tiene una secuencia divulgada en el número de entrada X06182 del Genbank o una secuencia que se da de forma natural y que es una variante de la misma (p. ej., variante alélica).

30 El CD99, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la proteína codificada mediante el gen con el número de entrada NM_002414.

35 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, tal y como se utilizan aquí, se refieren a las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: Pdx1, HNF-1 beta, PTF1 alfa, HNF-6 ó HB9. Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático contienen células del endodermo pancreático.

40 Las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, tal y como se utilizan aquí, se refieren a las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: NGN-3, NeuroD, islote-1, Pdx1, Nkx6,1, Pax4, NGN-3 ó PTF1 alfa. Las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino contienen células pancreático endocrinas, células que expresan hormonas pancreáticas, células que segregan hormonas pancreáticas y células del linaje celular β .

45 El Cer 1 o Cerberus, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la superfamilia de proteínas del nudo de cisteína.

El CXCR4, tal y como se utiliza aquí, se refiere al receptor del factor 1 de células derivadas del estroma (SDF-1), también conocido como LESTR o fusin. En el embrión gastrulante de ratón, el CXCR4 se expresa en el endodermo definitivo y mesodermo pero no en el endodermo extraembrionario.

50 El endodermo definitivo, tal y como se utiliza aquí, se refiere a las células que soportan las características de células que surgen del epiblasto durante la gastrulación y que forman el tracto gastrointestinal y sus derivados. Las células del endodermo definitivo expresan los siguientes marcadores: HNF-3 beta, GATA4, Sox-17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 y Mix11.

55 El endodermo extraembrionario, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la población de células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores: Sox-17, AFP y SPARC.

60 El FGF2, FGF4, FGF8, FGF10 y FGF17, tal y como se utilizan aquí, son miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto.

El GATA4 y GATA6 son miembros de la familia de factores de transcripción GATA. Esta familia de factores de transcripción se induce mediante señales de TGF β y contribuye a la conservación de los marcadores tempranos del endodermo.

65 El GLUT-2, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la molécula transportadora de glucosa que se expresa en numerosos tejidos fetales y adultos y que incluye el páncreas, hígado, intestino, cerebro y riñón.

El goosecoide o GSC, tal y como se utiliza aquí, se refiere al factor de transcripción del homeodominio que se expresa en el labio dorsal del blastopore.

5 El HB9, tal y como se utiliza aquí, se refiere al gen 9 de la homeosecuencia.

El HNF-1 alfa, HNF-1 beta, HNF-3 beta y el HNF-6 pertenecen a la familia de factores nucleares hepáticos de los factores de transcripción que se caracteriza por un dominio de unión al ADN muy bien preservado y dos dominios carboxilo-terminales.

10 El islote-1 o Isl-1, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia del homeodominio LIM de los factores de transcripción y se expresa en el páncreas en desarrollo.

15 El MAFA, tal y como se utiliza aquí, es un factor de transcripción que se expresa en el páncreas y controla la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis y secreción de insulina.

20 Los marcadores, tal y como se utilizan aquí, son moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan de manera diferente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial viene a significar un nivel incrementado para un marcador positivo y un nivel reducido para un marcador negativo. El nivel detectable del marcador de ácido nucleico o polipéptido es suficientemente superior o inferior en las células de interés, si se compara con otras células, por lo cual la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células, utilizando para ello cualquier variedad de métodos conocidos en la materia.

25 La célula del mesendodermo, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa, al menos, uno de los siguientes marcadores: CD48, eomesodermin (EOMES), Sox-17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17 y GATA6.

El Mix1l, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un gen de homeosecuencia que es marcador para las células en la línea primitiva, mesodermo y endodermo.

30 El NeuroD, tal y como se utiliza aquí, es un factor de transcripción de hélice-bucle-hélice básica (bHLH) implicado en la neurogénesis.

35 El NGN-3, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia neurogenin de los factores de transcripción de hélice-bucle-hélice básica.

El Nkx-2,2 y Nkx.6,1, tal y como se utilizan aquí, son miembros de la familia de los factores de transcripción Nkx.

El Nodal, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la superfamilia TGF beta de proteínas.

40 El Oct4 es un miembro del factor de transcripción del dominio POU y es ampliamente reconocido como una señal de identidad de las células madre pluripotentes. La relación de Oct4 con las células madre pluripotentes se sugiere mediante su expresión estrictamente restringida de células madre pluripotentes indiferenciadas. Al diferenciarse de linajes somáticos, la expresión de Oct4 desaparece rápidamente.

45 La célula pancreática endocrina o la célula que expresa la hormona pancreática, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de expresar, al menos, una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

50 La célula que segrega la hormona pancreática, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula capaz de segregar, al menos, una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

El Pax4 y Pax6, tal y como se utilizan aquí, son factores de transcripción específicos de las células β pancreáticas que están implicadas en el desarrollo del islote.

55 El Pdx1, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un factor de transcripción del homeodominio implicado en el desarrollo del páncreas.

60 La célula de la línea preprimitiva, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa, al menos, uno de los siguientes marcadores: Nodal o FGF8.

La célula de la línea primitiva, tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa, al menos, uno de los siguientes marcadores: Brachyury, la proteína de homosecuencia similar al Mix o FGF4.

65 El PTF1 alfa, tal y como se utiliza aquí, se refiere a la proteína de hélice-bucle-hélice básica de 48 kD que es una subunidad de unión a la secuencia específica del ADN del factor 1 de transcripción (PTF1) del páncreas trimérico.

El Sox-1, Sox-2, Sox-7 y Sox-17, tal y como se utilizan aquí, son unos miembros de la familia de factores de transcripción Sox y están implicados en la embriogénesis.

La SPARC, tal y como se utiliza aquí, también conocida como proteína segregada ácida y rica en cisteína.

El SSEA-1 (antígeno embrionario específico de estado 1) es un antígeno glucolípido de superficie presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma murino (EC), células germinales de embrión murino y humano (EG) y de las células madre de embriones murinos (ES).

El SSEA-3 (antígeno embrionario específico de estado 3) es un antígeno glucolípido de superficie presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

El SSEA-4 (antígeno embrionario específico de estado 4) es un antígeno glucolípido de superficie presente en la superficie de células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

EL TRAI-60 es un sulfato de queratina que se refiere al antígeno que se expresa en la superficie de las células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

EL TRAI-81 es un sulfato de queratina que se refiere al antígeno que se expresa en la superficie de las células madre de teratocarcinoma humano (EC), células germinales de embrión humano (EG) y de las células madre de embriones humanos (ES).

La TRA2-49 es una isoenzima de la fosfatasa alcalina que se expresa en la superficie de las células madre de teratocarcinoma humano (EC) y de las células madre de embriones humanos (ES).

El UTF-1, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un coactivador transcripcional que se expresa en células madre embrionarias pluripotentes y en células extraembrionarias.

El Zic1, tal y como se utiliza aquí, es un miembro de la familia de factores de transcripción Zic. El Zic1 regula la expresión de los genes específicos de la cresta neural y se expresa en las células del tubo dorsal neural y de la cresta neural premigratoria.

Aislamiento, expansión y cultivo de células madre pluripotentes

Caracterización de las células madre pluripotentes

Las células madre pluripotentes pueden expresar uno o más de los estados 3 y 4 de los antígenos embrionarios específicos (SSEA) y los marcadores detectables que utilizan anticuerpos designados como: Tra-1-60 y Tra-1-81 (Thomson y otros autores, *Science* 282, 1.145, 1998). La diferenciación de las células madre pluripotentes *in vitro* se traduce en la pérdida de la expresión del SSEA-4, Tra-1-60 y Tra-1-81 (en su caso) y un incremento de la expresión del SSEA-1. Las células madre pluripotentes indiferenciadas tienen, por lo general, actividad de fosfatasa alcalina que puede detectarse mediante la fijación de las células con 4% de paraformaldehído y, luego, mediante su desarrollo con el Vector Red como sustrato, tal y como lo describe el fabricante (Laboratorios Vector, Burlingame – California-). Las células madre pluripotentes indiferenciadas también expresan, por lo general, el Oct4 y TERT, tal y como se detecta mediante RT-PCR.

Otro fenotipo conveniente para las células madre pluripotentes propagadas es un potencial para diferenciar en el interior de células de las tres capas germinales: tejidos del endodermo, mesodermo y ectodermo. La pluripotencia de las células madre pluripotentes puede confirmarse, por ejemplo, inyectando células en el interior de ratones que padecen inmunodeficiencia combinada severa (SCID), fijando los teratomas a esa forma utilizando para ello 4% de paraformaldehído y, luego, examinándolos histológicamente para obtener pruebas de los tipos de células procedentes de las tres capas germinales. Alternativamente, la pluripotencia puede determinarse mediante la creación de cuerpos embrioides para la presencia de marcadores asociados a las tres capas germinales.

Las líneas de células madre pluripotentes propagadas pueden estar cariotipadas, utilizando para ello una técnica estándar de anillamiento G y pueden compararse con los cariotipos publicados de las correspondientes especies de primates. Es conveniente obtener células que tengan un cariotipo normal, lo cual significa que las células son euploides, donde todos los cromosomas humanos están presentes sin que se encuentren especialmente alterados.

Fuentes de las células madre pluripotentes

Los tipos de células madre pluripotentes que pueden utilizarse en la presente divulgación contienen líneas establecidas de células pluripotentes derivadas del tejido formado tras la gestación y contienen tejido preembrionario (como, por ejemplo, un blastocito) y tejido embrionario o fetal tomado durante cualquier momento de la gestación,

por lo general (aunque no necesariamente), antes de, aproximadamente, 10-12 semanas de gestación. Los ejemplos no exhaustivos son líneas establecidas de células madre de embriones humanos o células germinales de embriones humanos como, por ejemplo, las líneas H1, H7 y H9 de células madre de embriones humanos (WiCell). También se contempla el uso de las composiciones de esta divulgación durante el establecimiento inicial o la estabilización de dichas células, en cuyo caso la fuente de las células sería las células pluripotentes primarias tomadas directamente a partir de la fuente de los tejidos. También resultan adecuadas las células tomadas a partir de una población de células madre pluripotentes ya cultivadas, en ausencia de células sustentadoras. También resultan adecuadas en esta divulgación las líneas de células madre de embriones humanos mutantes como, por ejemplo, BG01 v (BresaGen, Atenas, GA).

En esta divulgación, las células madre de embriones humanos pueden prepararse tal y como lo describen Thomson y otros autores (Pat. de EE. UU. n° 5.843, 780; *Science* 282, 1.145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38, 133 ff., 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 92, 7.844, 1995).

Cultivo de las células madre pluripotentes

En una materialización, las células madre pluripotentes se cultivan, por lo general, en una capa de células sustentadoras que sostienen a las células madre pluripotentes de varias maneras. Alternativamente, las células madre pluripotentes se cultivan en un sistema de cultivo que está, esencialmente, libre de células sustentadoras pero, no obstante, sostiene la proliferación de células madre pluripotentes sin que experimenten una diferenciación sustancial. El crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo libre de sustentadores y sin diferenciación se sostiene utilizando un medio acondicionado mediante el previo cultivo con otro tipo de célula. Alternativamente, el crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo libre de sustentadores y sin diferenciación se sostiene utilizando un medio definido químicamente. En una materialización, el crecimiento de las células madre pluripotentes en un cultivo libre de sustentadores y sin diferenciación se sostiene utilizando un medio definido químicamente que consiste en un medio suplementado con B27.

Por ejemplo, Reubinoff y otros autores (*Nature Biotechnology* 18, 399-404 (2000)) y Thompson y otros autores (*Science*, 6 de noviembre de 1998, vol. n°: 282, 5.391, páginas: 1.145-1.147) divulgan el cultivo de las líneas de células madre pluripotentes a partir de blastocitos humanos utilizando una monocapa sustentadora celular de fibroblasto de embriones de ratón.

Richards y otros autores (*Stem Cells* 21, 546-556, 2003) evaluaron un grupo de 11 adultos humanos diferentes y monocapas sustentadoras celulares fetales y neonatales por su capacidad para sostener el cultivo de células madre pluripotentes humanas. Richards y otros autores, manifiestan: "las líneas de células madre de embriones humanos cultivadas en la piel de un adulto con sustentadores de fibroblasto mantienen la morfología de las células madre de embriones humanos y permanecen pluripotentes".

La patente de EE. UU. 20020072117 divulga las líneas celulares que producen medios que sostienen el crecimiento de las células madre pluripotentes de primates en un cultivo libre de sustentadores. Las líneas celulares empleadas son mesenquimales y similares a los fibroblastos obtenidos a partir de tejido embrionario o diferenciado de las células madre embrionarias. La patente de EE. UU. 20020072117 también divulga el uso de líneas celulares como una monocapa sustentadora celular primaria.

En otro ejemplo, Wang y otros autores (*Stem Cells* 23, 1.221-1.227, 2005) divulgan los métodos para el crecimiento a largo plazo de las células madre pluripotentes de humanos en monocapas sustentadoras celulares derivadas de células madre de embriones humanos.

En otro ejemplo, Stojkovic y otros autores (*Stem Cells* 2005 23, -306-314, 2005) divulgan un sistema sustentador celular derivado de la diferenciación espontánea de células madre de embriones humanos.

En un ejemplo más, Miyamoto y otros autores (*Stem Cells* 22, 433-440, 2004) divulgan una fuente de células sustentadoras obtenidas a partir de placenta humana.

Amit y otros autores (*Biol. Reprod.* 68, 2.150-2.156, 2003) divulgan una monocapa sustentadora celular derivada del prepucio humano.

En otro ejemplo, Inzunza y otros autores (*Stem Cells* 23, 544-549, 2005) divulgan una monocapa sustentadora celular a partir de fibroblastos del prepucio humano postnatal.

La patente de EE. UU. 6642048 divulga los medios que sostienen el crecimiento de las células madre pluripotentes de primates (pPS) en un cultivo libre de sustentadores, así como líneas celulares aptas para la producción de dichos medios. La patente de EE. UU. 6642048 manifiesta: "esta invención contiene mesenquimales y líneas celulares similares a los fibroblastos obtenidos a partir de tejido embrionario o diferenciado de las células madre embrionarias. Los métodos para derivar dichas líneas celulares son: procesar los medios y conseguir que las células madre crezcan utilizando para ello los medios acondicionados que se describen e ilustran en esta divulgación.

En otro ejemplo, el WO 2005014799 divulga un medio acondicionado para la conservación, proliferación y diferenciación de las células de mamíferos. El WO 2005014799 manifiesta: "el medio de cultivo producido de acuerdo con la presente invención se acondiciona mediante la actividad secretora celular de las células de murino y, en particular, aquellos hepatocitos transgénicos diferenciados e inmortales denominados MMH (*Met Murine Hepatocyte*).

En otro ejemplo, Xu y otros autores (*Stem Cells* 22, 972-980, 2004) divulgan un medio acondicionado obtenido a partir de derivados de células madre de embriones humanos que han sido modificados genéticamente para sobreexpresar la telomerasa transcriptasa inversa humana.

En otro ejemplo, la patente de EE. UU. 20070010011 divulga un medio de cultivo definido químicamente para la conservación de las células madre pluripotentes.

En un sistema de cultivo alternativo se emplea un medio libre de suero y suplementado con factores de crecimiento capaces de promover la proliferación de células madre embrionarias. Por ejemplo, Cheon y otros autores (*BioReprod DOI*, 10.1095/biolreprod. 105.046870, 19 de octubre, 2005) divulgan un sistema de cultivo libre de suero y de sustentadores en el cual las células madre embrionarias se conservan en un medio no acondicionado de reemplazo de suero (SR) suplementado con diferentes factores de crecimiento capaces de desencadenar la auto-renovación de células madre embrionarias.

En otro ejemplo, Levenstein y otros autores (*Stem Cells* 24, 568-574, 2006) divulgan métodos para el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias, en ausencia de fibroblastos o medio acondicionado y utilizando para ello medios suplementados con bFGF.

En otro ejemplo, la patente de EE. UU. 20050148070 divulga un método de cultivo de células madre de embriones humanos en medios definidos sin suero y sin células sustentadoras de fibroblasto, el método comprende: el cultivo de las células madre en un medio de cultivo que contiene albúmina, aminoácidos, vitaminas, minerales, al menos una transferrina o sustituto de transferrina y al menos una insulina o sustituto de insulina. El medio de cultivo debe estar, esencialmente, libre de suero fetal de mamíferos y debe contener al menos unos 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto que sea capaz de activar un receptor de señalización del factor de crecimiento de fibroblasto, donde no solo la monocapa sustentadora de fibroblasto, sino también otra fuente proporcionan el factor de crecimiento; el medio sostuvo la proliferación de células madre en un estado indiferenciado, sin células sustentadoras ni medio acondicionado.

En otro ejemplo, la patente de EE. UU. 20050233446 divulga unos medios definidos aptos para el cultivo de células madre y que incluyen células madre primordiales e indiferenciadas de primate. En la solución, los medios son considerablemente isotónicos si se comparan con las células madre que han venido siendo cultivadas. En un cultivo dado, el medio particular se compone de un medio base y de una cantidad de cada de: bFGF, insulina y ácido ascórbico, necesarios para sostener considerablemente el crecimiento indiferenciado de las células madre primordiales.

En otro ejemplo, en la patente de EE. UU. 6800480 se manifiesta: "en una materialización, un medio de cultivo celular para el crecimiento de las células madre primordiales derivadas de primates en un estado que se proporciona y que se encuentra considerablemente indiferenciado, el cual incluye una baja presión osmótica, un medio básico con baja endotoxina que es efectivo para soportar el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates. El medio básico se combina con un suero nutriente efectivo para sostener el crecimiento de células madre primordiales derivadas de primates y un sustrato seleccionado a partir del grupo consistente en células sustentadoras y un componente de matriz extracelular derivado de células sustentadoras. El medio incluye además aminoácidos no esenciales, un antioxidante y un primer factor de crecimiento seleccionado a partir del grupo consistente en nucleósidos y sal piruvato".

En otro ejemplo, en la patente de EE. UU. 20050244962 se manifiesta: " en un aspecto, la invención proporciona un método de cultivo de células madre de embriones de primates. En uno, las células madre se cultivan en un cultivo esencialmente libre de suero fetal de mamíferos (preferiblemente que también esté esencialmente libre de cualquier suero animal) y en presencia del factor de crecimiento de fibroblasto que se proporciona a partir de, no solo la monocapa sustentadora de fibroblasto, sino también a partir de otra fuente. En la forma elegida, la monocapa sustentadora de fibroblasto, requerida previamente para preservar un cultivo de células madre, deja de ser necesaria mediante la adición de factor de crecimiento de fibroblasto en cantidad suficiente.

En un ejemplo adicional, el WO 2005065354 divulga un medio de cultivo definido e isotónico que está esencialmente libre de sustentadores y de suero y que comprende: a. un medio basal, b. una cantidad suficiente de bFGF para sostener el crecimiento de células madre de mamíferos considerablemente indiferenciadas, c. una cantidad suficiente de insulina para sostener el crecimiento de células madre de mamíferos considerablemente indiferenciadas y d. una cantidad suficiente de ácido ascórbico para sostener el crecimiento de células madre de mamíferos considerablemente indiferenciadas.

En otro ejemplo, el WO 2005086845 divulga un método para la conservación de una célula madre indiferenciada, dicho método comprende la exposición de una célula madre a un miembro de la familia de factores de crecimiento transformantes beta (TGF β) de proteínas, un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto (FGF) de proteínas o una cantidad suficiente de nicotinamida (NIC) para conservar la célula en un estado indiferenciado durante el tiempo suficiente para alcanzar el resultado deseado.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en un sustrato de cultivo adecuado. En una materialización, el sustrato de cultivo adecuado es un componente de matriz extracelular como, por ejemplo, aquel derivado de una membrana basal o que puede formar parte de la unión de los ligandos de moléculas de adhesión receptoras. En una materialización, el sustrato de cultivo adecuado es Matrigel® (Becton Dickeson). Matrigel® es una preparación soluble a partir de las células tumorales Engelbreth-Holm-Swarm que, a temperatura ambiente, queda en estado de gel para formar una membrana basal reconstituida.

Una alternativa adecuada consiste en otros componentes de matriz extracelular y mezclas de componentes. En función del tipo de célula que viene proliferando, esta puede contener laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, heparán sulfato y análogos, solos o en varias combinaciones.

Las células madre pluripotentes pueden colocarse en el sustrato, en una distribución adecuada y en presencia de un medio que promueva la supervivencia celular, la propagación y la retención de las características deseables. Todas estas características se benefician de una cuidadosa atención para la distribución de la siembra y uno de los expertos en la materia puede determinarlas fácilmente.

Los medios de cultivo adecuados pueden estar hechos de los siguientes componentes: como, por ejemplo, el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Gibco # 11.965-092, medio de Eagle modificado de Dulbecco de Knockout (KO DMEM), Gibco # 10.829-018, medio basal de Ham F12/50%, 200 mM de L-glutamina, Gibco # 15.039-027, solución de aminoácidos no esenciales, Gibco 11.140-050, β -mercaptoetanol, Sigma # M7522, factor de crecimiento básico humano recombinante del fibroblasto (bFGF) y Gibco # 13.256-029.

Diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino

Las células madre pluripotentes adecuadas para su uso en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, la línea H9 de células madre de embriones humanos (código NIH: WA09), la línea H1 de células madre de embriones humanos (código NIH: WA01), la línea H7 de células madre de embriones humanos (código NIH: WA07) y la línea SA002 de células madre de embriones humanos (Cellartis, Suecia). También son adecuadas para su uso en la presente invención las células que expresan, al menos, uno de los siguientes marcadores característicos de las células pluripotentes: ABCG2, cripto, CD9, FoxD3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

Los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se seleccionan a partir del grupo consistente en: Sox-17, GATA4, HNF-3beta, GSC, Cerl, Nodal, FGF8, Brachyury, Mix similar a la proteína de homeosecuencia, FGF4 CD48, eomesodermin (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 y OTX2. Existe una célula adecuada para su uso en la presente invención y que expresa, al menos, uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula precursora de la línea primitiva. En otro aspecto, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del mesendodermo. En otro aspecto, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es una célula del endodermo definitivo.

Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se seleccionan a partir del grupo consistente en: Pdx1, HNF-1beta, PTF1A, HNF-6, HB9 y PROX1. Existe una célula adecuada para su uso en la presente invención y que expresa, al menos, uno de los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es una célula del endodermo pancreático.

Los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino se seleccionan a partir del grupo consistente en: NGN-3, NeuroD, islote-1, Pdx1, NKX6.1, Pax4, NGN-3 y PTF1alfa. En una materialización, una célula pancreático endocrina es capaz de expresar, al menos, una de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Existe una célula adecuada para su uso en la presente invención y que expresa, al menos, uno de los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje pancreático endocrino es una célula pancreático endocrina. La célula pancreático endocrina puede ser una hormona pancreática que exprese células. Alternativamente, la célula pancreático endocrina puede ser una hormona pancreática que segregue células.

En un aspecto de la presente invención, la célula pancreático endocrina es una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β y que expresa Pdx1 y, al menos, uno de los siguientes factores de transcripción:

NGN-3, Nkx2.2, Nkx6.1, NeuroD, isl-1, HNF-3beta, MAFA, Pax4 y Pax6. En un aspecto de la presente invención, una célula que expresa marcadores característicos del linaje celular β es una célula β .

5 Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante cualquier método existente en la materia o cualquier otro propuesto en esta invención.

10 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en D'amour y otros autores, *Nature Biotechnology* 23, 1.534-1.541 (2005).

15 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en Shinozaki y otros autores, *Development* 131, 1.651-1.662 (2004).

20 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en McLean y otros autores, *Stem Cells* 25, 29-38 (2007).

Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, según los métodos divulgados en D'amour y otros autores, *Nature Biotechnology* 24, 1.392-1.401 (2006).

25 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y en ausencia de suero; luego, mediante el cultivo de las células con activina A y suero y, finalmente, mediante el cultivo de las células con activina A y suero de una concentración diferente. En la obra *Nature Biotechnology* 23, 1.534-1.541 (2005) se recoge un ejemplo de este método.

30 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y en ausencia de suero; luego, mediante el cultivo de las células con activina A y suero de otra concentración. En la obra *Nature Biotechnology* 23, 1.534-1.541 (2005) se recoge un ejemplo de este método.

35 Por ejemplo, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes en un medio que contiene activina A y un ligando Wnt, en ausencia de suero; luego, mediante la extracción del ligando Wnt y el cultivo de células con activina A y suero. En la obra *Nature Biotechnology* 24, 1.392-1.401 (2006) se recoge un ejemplo de este método.

40 En un aspecto de la presente divulgación, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el recubrimiento de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y durante un período de tiempo y, finalmente, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A en un segundo medio de cultivo que contiene una gran concentración de suero, durante otro período de tiempo.

45 La concentración de suero en el primer medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de cero a, aproximadamente, un 0,5% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días. La concentración de suero en el segundo medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de, aproximadamente, un 0,5% a un 2% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a cuatro días.

50 En otra materialización de la presente divulgación, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo mediante el recubrimiento de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular; luego, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo que contiene suero y durante un período de tiempo y, finalmente, mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt en un segundo medio de cultivo que contiene una gran concentración de suero, durante otro período de tiempo.

55 La concentración de suero en el primer medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de, aproximadamente, cero a un 0,5% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días. La concentración de suero en el segundo medio de cultivo divulgado más arriba puede ser de, aproximadamente, un 0,5% a un 2% y el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, uno a cuatro días.

En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo y que comprende las fases de:

- a) recubrimiento de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y
- b) cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt.

El cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt puede realizarse en un medio de cultivo individual. El medio de cultivo individual puede suplementarse con suero. Alternativamente, el medio de cultivo individual puede definirse químicamente y se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt puede realizarse de forma separada o conjunta, en más de un medio de cultivo. En una materialización, el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt se realiza en dos medios de cultivo. Más de un medio de cultivo puede suplementarse con suero. Alternativamente, más de un medio de cultivo puede definirse químicamente y se compone de medios suplementados con B27.

Matriz extracelular

En un aspecto de la presente invención, las células madre pluripotentes se cultivan y diferencian en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular. La matriz extracelular puede ser una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de células de ratón (que comercializa BD Biosciences bajo el nombre comercial de Matrigel). Alternativamente, la matriz extracelular puede ser un factor de crecimiento reducido Matrigel. Alternativamente, la matriz extracelular puede tener fibronectina. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan y diferencian en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con suero humano.

La matriz extracelular puede diluirse antes de recubrir el sustrato de cultivo de tejido. En las obras de Kleinman, H.K. y otros autores (*Biochemistry* 25, 312 (1982) y Hadley, M.A. y otros autores (*J. Cell. Biol.* 101, 1.511(1985) pueden encontrarse ejemplos de métodos adecuados para diluir la matriz extracelular y para recubrir el sustrato de cultivo de tejido.

En una materialización, la matriz extracelular es Matrigel. En una materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:10. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:15. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:30. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con Matrigel en una dilución de 1:60.

En una materialización, la matriz extracelular es un factor de crecimiento reducido Matrigel. En una materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:10. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:15. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:30. En otra materialización, el sustrato de cultivo de tejido se recubre con un factor de crecimiento reducido Matrigel en una dilución de 1:60.

Diferenciación de células madre pluripotentes que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en una matriz extracelular, utilizando para ello un medio de cultivo individual

Cuando se utiliza un medio de cultivo individual, este debería contener las suficientes concentraciones en baja cantidad de algunos factores para permitir la diferenciación de células madre pluripotentes en el endodermo definitivo como, por ejemplo, la insulina y el IGF (tal y como se divulga en el WO 2006020919). Esto puede alcanzarse mediante la disminución de la concentración de suero o, alternativamente, mediante el uso de medios químicamente definidos que carecen de insulina e IGF. En la obra de Wiles y otros autores (*Exp Cell Res.*, 25 de febrero de 1999, 247 (1)- 241 – 8) se recogen ejemplos de medios definidos químicamente.

El medio de cultivo puede tener una concentración de suero en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 10%. En otra materialización, la concentración puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 5%. En otra materialización, la concentración puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 2%. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, el 2%.

Alternativamente, el medio de cultivo puede suplementarse con B27 en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 1%.

El tiempo de cultivo con activina A y un ligando Wnt puede oscilar entre, aproximadamente, uno y siete días. En otra materialización, el tiempo de cultivo puede oscilar entre, aproximadamente, uno y tres días. En otra materialización, el tiempo de cultivo puede ser de, aproximadamente, tres días.

- La activina A puede utilizarse en cualquier concentración adecuada para causar la diferenciación de las células madre pluripotentes. La concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 1 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 50 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml.
- La elección del ligando Wnt puede optimizarse para mejorar la eficiencia del proceso de diferenciación. El ligando Wnt puede seleccionarse a partir del grupo consistente en: Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una materialización, el ligando Wnt es Wnt-1. En otra materialización, el ligando Wnt es Wnt-3a.
- El ligando Wnt puede estar en una concentración de, aproximadamente, 1 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 10 ng/ml a 100 ng/ml.
- El medio de cultivo individual también puede contener un inhibidor de GSK-3B. El inhibidor de GSK-3B puede seleccionarse a partir del grupo consistente en el IX inhibidor de GSK-3B y el XI inhibidor de GSK-3B. En una materialización, el inhibidor de GSK-3B es el IX inhibidor de GSK-3B.
- Cuando se cultivan células madre pluripotentes con un inhibidor de GSK-3B, la concentración del inhibidor de GSK-3B puede ser de 1 nM a, aproximadamente, 1.000 nM. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan con el inhibidor de GSK-3B en una concentración de, aproximadamente, 10 nM a 100 nM.
- El medio de cultivo individual también puede contener, al menos, otro factor adicional que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes. Alternativamente, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.
- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede ser, por ejemplo : la nicotinamida, miembros de la familia TGF-β (incluye TGF-β1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β- mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butilato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.
- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241) y células primarias o endoteliales transformadas.
- Diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en un matriz extracelular, utilizando para ello dos medios de cultivo
- La diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células de un linaje del endodermo definitivo puede llevarse a cabo mediante el cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, utilizando para ello dos medios de cultivo. Por tanto, la diferenciación de las células madre pluripotentes puede llevarse a cabo como sigue:
- se recubren las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular ,
 - se cultivan las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt, en un primer medio de cultivo y
 - se cultivan las células madre pluripotentes con activina A, en un segundo medio de cultivo.
- El primer medio de cultivo puede contener suero en baja concentración y el segundo medio de cultivo puede contener *scrum* en una mayor concentración que en el primer medio de cultivo.

El segundo medio de cultivo puede contener un ligando Wnt.

Primer medio de cultivo: el primer medio de cultivo debería contener suficientes concentraciones en baja cantidad de algunos factores para permitir la diferenciación de células madre pluripotentes en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo como, por ejemplo, la insulina e IGF (tal y como se divulga en el WO 20006020919). Esto puede alcanzarse mediante la disminución de la concentración de suero o, alternativamente, mediante el uso de medios químicamente definidos que carecen de insulina e IGF. En la obra de Wiles y otros autores (*Exp Cell Res.*, 25 de febrero de 1999, 247 (1)- 241 – 8) se recogen ejemplos de medios definidos químicamente.

En el primer medio de cultivo puede haber una concentración de suero más baja en relación con el segundo medio de cultivo. Al incrementar la concentración de suero en el segundo medio de cultivo, se incrementa la supervivencia de las células o, alternativamente, se puede potenciar la proliferación de las células. La concentración de suero del primer medio puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 10%. Alternativamente, la concentración de suero del primer medio puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 2%. Alternativamente, la concentración de suero del primer medio puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0% a un 1%. Alternativamente, la concentración de suero del primer medio puede ser de, aproximadamente, un 0,5%.

Cuando se cultivan las células madre pluripotentes con activina A y un ligando Wnt utilizando, al menos, dos medios de cultivo, el tiempo de cultivo en el primer medio puede oscilar entre, aproximadamente, uno y tres días.

La activina A puede utilizarse en cualquier concentración adecuada para causar la diferenciación de las células madre pluripotentes. La concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 50 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml.

La elección del ligando Wnt puede optimizarse para mejorar la eficiencia del proceso de diferenciación. El ligando Wnt se puede seleccionar a partir del grupo consistente en: Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una materialización, el ligando Wnt es Wnt-1. En otra materialización, el ligando Wnt es Wnt-3a.

El ligando Wnt puede estar en una concentración de, aproximadamente, 1 ng/ml a 1.000 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml a 100 ng/ml.

El primer medio de cultivo también puede contener un inhibidor de GSK-3B. El inhibidor de GSK-3B puede añadirse al primer medio de cultivo, al segundo medio de cultivo o a ambos (a los medios primero y segundo).

El inhibidor de GSK-3B puede seleccionarse a partir del grupo consistente en el IX inhibidor de GSK-3B y el XI inhibidor de GSK-3B. En una materialización, el inhibidor de GSK-3B es el IX inhibidor de GSK-3B.

Cuando se cultivan células madre pluripotentes con un inhibidor de GSK-3B, la concentración del inhibidor de GSK-3B puede ser de, aproximadamente, 1 nM a 1.000 nM. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan con el inhibidor de GSK-3B en una concentración de, aproximadamente, 10 nM a 100 nM.

El primer medio de cultivo también puede contener, al menos, otro de los factores adicionales que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

Al menos uno de los otros factores adicionales puede ser, por ejemplo: la nicotinamida, miembros de la familia TGF-β (incluye TGF-β1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β- mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butilato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a

la. neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.

Al menos uno de los otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).

Segundo medio de cultivo: el segundo medio de cultivo debería contener algunos factores como, por ejemplo, la insulina e IGF (tal y como se divulga en el WO 20006020919) en una concentración suficiente como para promover la supervivencia de las células cultivadas. Esto puede alcanzarse mediante el incremento de la concentración de suero o, alternativamente, mediante el uso de medios químicamente definidos donde las concentraciones de insulina e IGF se incrementan en relación con el primer medio de cultivo. En la obra de Wiles y otros autores (*Exp Cell Res.*, 25 de febrero de 1999, 247 (1)- 241 – 8) se recogen ejemplos de medios definidos químicamente.

En un segundo medio de cultivo con mayores concentraciones de suero, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 10%. Alternativamente, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 5%. Alternativamente, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede estar en el intervalo de, aproximadamente, un 0,5% a un 2%. Alternativamente, la concentración de suero del segundo medio de cultivo puede ser de, aproximadamente, un 2%. Cuando se cultivan células madre pluripotentes con el segundo medio de cultivo, el tiempo de cultivo puede oscilar entre, aproximadamente, uno y cuatro días.

Al igual que en el primer medio de cultivo, la activina A puede utilizarse en cualquier concentración adecuada para causar la diferenciación de las células madre pluripotentes. La concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 1 µg/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 1 pg/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 50 ng/ml a 100 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 100 ng/ml.

El ligando Wnt puede estar en una concentración de, aproximadamente, 1 ng/ml a 1.000 ng/ml. En otra materialización, la concentración puede ser de, aproximadamente, 10 ng/ml a 100 ng/ml.

El ligando Wnt puede seleccionarse a partir de un grupo consistente en: Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a y Wnt-7a. En una materialización, el ligando Wnt es Wnt-1. En otra materialización, el ligando Wnt es Wnt-3a.

El segundo medio de cultivo también puede contener un inhibidor de GSK-3B. El inhibidor de GSK-3B puede añadirse al primer medio de cultivo, al segundo medio de cultivo o a ambos (a los medios primero y segundo).

El inhibidor de GSK-3B puede seleccionarse a partir del grupo consistente en el IX inhibidor de GSK-3B y el XI inhibidor de GSK-3B. En una materialización, el inhibidor de GSK-3B es el IX inhibidor de GSK-3B.

Cuando se cultivan células madre pluripotentes con un inhibidor de GSK-3B, la concentración del inhibidor de GSK-3B puede ser de, aproximadamente, 1 nM a 1.000 nM. En otra materialización, las células madre pluripotentes se cultivan con el inhibidor de GSK-3B en una concentración de, aproximadamente, 10 nM a 100 nM.

Al igual que en el primer medio de cultivo, el segundo medio de cultivo también puede contener, al menos, otro de los factores adicionales que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

Al menos uno de los otros factores adicionales puede ser, por ejemplo: la nicotinamida, miembros de la familia TGF-β (incluye TGF-β1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidroclorona, etanolamina, β- mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butilato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a

la. neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.

Al menos uno de los otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).

Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo

La formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo puede determinarse examinando la presencia de los marcadores antes y después de seguir un protocolo particular. Por lo general, las células madre pluripotentes no expresan dichos marcadores. Por tanto, la diferenciación de células pluripotentes se detecta cuando las células empiezan a expresarlos.

La eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

Los métodos para valorar la expresión de los marcadores de ácido nucleico y proteico en células aisladas o cultivadas son estándar en la materia. Estos incluyen: reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR), ensayo Northern, hibridación *in situ* (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y otros autores, Ediciones Suplemento, 2001) e inmunoensayos como, por ejemplo, el análisis de inmunohistoquímica del material seccionado, Western blot y, para marcadores accesibles en células intactas, el análisis de la citometría de flujo (FACS) (véase, p. ej., la obra de Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Los ejemplos de anticuerpos aptos para detectar algunos marcadores de proteínas se enumeran en la **tabla 1A**. Cabe señalar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores, que se reconocen en los anticuerpos enumerados en la **tabla 1A**, están disponibles o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para valorar la expresión de marcadores en las células aisladas, de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, las características de las células madre pluripotentes son bien conocidas por los expertos en la materia y las características adicionales de las células madre pluripotentes continúan siendo identificadas. Los marcadores de las células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, la expresión de uno o más de los siguientes: ABCG2, cripto, FoxD3, Connexin43, Connexin45, Oct4, Sox-2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

Tras tratar células madre pluripotentes con los métodos de la presente invención, las células diferenciadas pueden purificarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas como, por ejemplo, el CXCR4, expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo.

Formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático

Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático mediante cualquier método existente en la materia o mediante cualquier otro propuesto en esta invención.

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, según los métodos divulgados en la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology*-24, 1.392-1.401 (2006).

Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con un factor de crecimiento de fibroblasto y el inhibidor KAAD-ciclopamina por la vía señalizadora del erizo, luego se extrae el medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblasto y la KAAD-ciclopamina y, posteriormente, las células se cultivan en un medio que contiene ácido retinoico, un factor de crecimiento de fibroblasto y la KAAD- ciclopamina. En la obra *Nature Biotechnology*-24, 1.392-1.401 (2006) se recoge un ejemplo de este método.

En un aspecto de la presente divulgación, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del

linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico y, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante un período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser de, aproximadamente, uno a seis días.

5 En otro aspecto de la presente divulgación, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, mediante el tratamiento de células con ácido retinoico durante un período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días. Posteriormente, se extrae el ácido retinoico y se tratan las células con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante otro período de tiempo. Ese período de tiempo puede ser de, aproximadamente, uno a tres días.

10 En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y que comprende las fases de:

- 15 a. cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo y
b. tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo con ácido retinoico y, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

20 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

25 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, uno a seis días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, seis días.

30 Al menos un factor de crecimiento de fibroblasto se selecciona a partir del grupo consistente en: FGF2, FGF4 y FGF10.

35 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

40 En otra materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y que comprende las fases de:

- 45 a. cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo y
b. tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo, tratándolas con ácido retinoico y
c. extracción del ácido retinoico y, posteriormente, tratamiento de las células con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto.

50 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

55 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico durante, aproximadamente, uno a tres días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico durante, aproximadamente, tres días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, uno a tres días. En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del endodermo definitivo se tratan con, al menos, un factor de crecimiento de fibroblasto durante, aproximadamente, tres días.

60 Al menos un factor de crecimiento de fibroblasto se selecciona a partir del grupo consistente en: FGF2, FGF4 y FGF10.

65 Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que

se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

5 En una materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico. Alternativamente, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con FGF2 o, alternativamente, con FGF4 o FGF10. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con, al menos, uno de los siguientes factores: ácido retinoico, FGF2, FGF4 o FGF10. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con, al menos, uno de los siguientes factores de crecimiento de fibroblasto: FGF2, FGF4 o FGF10. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con FGF-2. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con FGF4. En otra materialización, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se tratan con ácido retinoico y con FGF10.

15 El ácido retinoico puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 1 nM a 1mM. En una materialización, el ácido retinoico se utiliza en una concentración de 1 μ M.

20 El FGF2 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 50 pg/ml a 50 μ g/ml. En una materialización, el FGF2 se utiliza en una concentración de 50 ng/ml.

El FGF4 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 50 pg/ml a 50 μ g/ml. En una materialización, el FGF4 se utiliza en una concentración de 50 ng/ml.

25 El FGF10 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 50 pg/ml a 50 μ g/ml. En una materialización, el FGF10 se utiliza en una concentración de 50 ng/ml.

30 Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo definitivo se pueden tratar con, al menos, otro de los factores adicionales que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, formado por los métodos de la presente invención. Alternativamente, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

40 Al menos uno de esos otros factores adicionales puede ser, por ejemplo : la nicotinamida, miembros de la familia TGF- β (incluye TGF- β 1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β - mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butilato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.

55 Al menos uno de esos otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo:, PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).

Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático

60 Los marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático son bien conocidos por los expertos en la materia y las características adicionales de los marcadores del linaje del endodermo pancreático continúan siendo identificadas. Estos marcadores pueden utilizarse para confirmar que las células que se tratan de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje del endodermo pancreático. Los marcadores específicos del linaje del endodermo pancreático incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo: Hlx9, PTF1a, PDX-1, HNF-6 y HNF-1beta.

La eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático.

5 Los métodos para valorar la expresión de los marcadores de ácido nucleico y proteico en células aisladas o cultivadas son estándar en la materia. Estos incluyen: reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR), ensayo Northern, hibridación *in situ* (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y otros autores, Ediciones Suplemento, 2001) e inmunoensayos como, por ejemplo, el análisis de inmunohistoquímica del material seccionado, Western blot y, para marcadores accesibles en células intactas, el análisis de la citometría de flujo (FACS) (véase, p. ej., la obra de Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

10 Los ejemplos de anticuerpos aptos para detectar algunos marcadores de proteínas se enumeran en la **tabla 1A**. Cabe señalar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores, que se reconocen en los anticuerpos enumerados en la **tabla 1A**, están disponibles o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para valorar la expresión de marcadores en las células aisladas, de acuerdo con la presente invención.

20 **Formación de las células que expresan marcadores del linaje pancreático endocrino:**

Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante cualquier método existente en la materia o mediante cualquier otro divulgado en esta invención.

25 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, según los métodos divulgados en la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology*-24, 1.392-1.401 (2006).

30 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene DAPT y Exendin-4; luego, se extrae el medio que contiene DAPT y Exendin y, posteriormente, se cultivan las células en un medio que contiene Exendin-4, IGF-1 y HGF. En la obra *Nature Biotechnology*-24, 1.392-1.401 (2006) se recoge un ejemplo de este método.

35 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene Exendin-4; luego, se extrae el medio que contiene Exendin-4 y, posteriormente, se cultivan las células en un medio que contiene Exendin-4, IGF-1 y HGF. En la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology* (2006) se recoge un ejemplo de este método.

40 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene DAPT y Exendin-4. En la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology* (2006) se recoge un ejemplo de este método.

45 Por ejemplo, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático, en un medio que contiene Exendin-4. En la obra de D'Amour y otros autores, *Nature Biotechnology* (2006) se recoge un ejemplo de este método.

50 En un aspecto de la presente divulgación, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático están más diferenciadas en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino mediante el tratamiento de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático con un factor que inhibe la vía señalizadora de Notch, El factor que inhibe la vía señalizadora de Notch puede ser antagonico al receptor extracelular de Notch. Alternativamente, el factor puede inhibir la actividad biológica del receptor de Notch. Alternativamente, el factor puede inhibir o ser el antagonista de un elemento en la vía de transducción de señales Notch, dentro de una célula. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio

65 suplementado con suero.

En una materialización, el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch es un inhibidor y-secretasa. En una materialización, el inhibidor de y-secretasa es: 1SBencilo-4R-[1-(1S-carbamoil-2-carbamoil fenetílico)-IS-3-metilbuticarbamoil]-5 2R-hidroxy-5- fenilpentil] carbámico], éster de ácido terc-butilo, también conocido como L-685,458.

El L-685,458 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 0,1 μM a 100 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 90 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 80 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 70 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 60 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 50 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 40 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 30 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 20 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 10 μM .

En una materialización, la presente divulgación proporciona un método para diferenciar células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático en el interior de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino y que comprende las fases de:

- a. cultivo de células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático y
- b. tratamiento de las células con un factor que inhibe la vía señalizadora de Notch.

Cualquier célula que exprese marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático es adecuada para diferenciarse en el interior de una célula que expresa marcadores característicos del linaje pancreático endocrino, utilizando para ello este método. Las células pueden tratarse en un medio químicamente definido que se compone de un medio suplementado con B27. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio libre de suero. Alternativamente, las células pueden tratarse en un medio suplementado con suero.

En una materialización, el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch es un inhibidor y-secretasa. En una materialización, el inhibidor de y-secretasa es: 1SBencilo-4R-[1-(1S-carbamoil-2-carbamoil fenetílico)-IS-3-metilbuticarbamoil]- 2R-hidroxy-5- fenilpentil] carbámico], éster de ácido terc-butilo, también conocido como L-685,458.

Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se tratan con el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch durante, aproximadamente, uno a cinco días. Alternativamente, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se tratan con el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch durante, aproximadamente, tres a cinco días. Alternativamente, las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático se tratan con el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch durante, aproximadamente, cinco días.

En una materialización, el factor que inhibe la vía señalizadora de Notch es un inhibidor y-secretasa. En una materialización, el inhibidor de y-secretasa es: 1SBencilo-4R-[1-(1S-carbamoil-2-carbamoil fenetílico)-IS-3-metilbuticarbamoil]- 2R-hidroxy-5- fenilpentil] carbámico], éster de ácido terc-butilo, también conocido como L-685,458.

El L-685,458 puede utilizarse en una concentración de, aproximadamente, 0,1 μM a 100 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 90 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 80 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 70 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 60 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 50 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 40 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 30 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 20 μM . En una materialización, el L-685,458 se utiliza en una concentración de, aproximadamente, 10 μM .

Las células que expresan marcadores característicos del linaje del endodermo pancreático pueden tratarse con, al menos, otro factor adicional que puede potenciar la formación de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. Alternativamente, al menos uno de los otros factores adicionales puede potenciar la proliferación de las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino formado por los métodos de la presente invención. Además, al menos uno de esos otros factores adicionales puede potenciar la capacidad de las células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino formado por los métodos de la presente invención, para formar otros tipos de células o bien para mejorar la eficiencia de cualquier otra fase de diferenciación adicional.

- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede ser, por ejemplo : la nicotinamida, miembros de la familia TGF- β (incluye TGF- β 1, 2 y 3), albúmina de suero, miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -11), péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, β - mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gastrina I y II, quelantes de cobre como, por ejemplo, pentamina trietilena, forskolina, Na-butilato, activina, betacelulina, ITS, Noggin, factor de crecimiento de neurita, Nodal, ácido valproico, Trichostatin A, butirato de sodio, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esfingosina 1, VEGF, MG132 (EMD, California), suplementos N2 y B27 (Gibco, California), alcaloides esteroideos como, por ejemplo, la ciclopamina (EMD, California), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), familia de proteínas Dickkopf, extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP), erizo indio, erizo Sonic, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la vía de Notch, inhibidores del erizo Sonic o combinaciones de los mismos.
- Al menos uno de esos otros factores adicionales puede suministrarse por medios acondicionados obtenidos a partir de líneas celulares pancreáticas como, por ejemplo: PANC-1 (ATCC nº CRL -1.469), CAPAN-1(ATCC nº HTB- 79), BxPC-3 (ATCC nº CRL -1.687), HPAF-II (ATCC nº CRL -1.997), líneas celulares hepáticas como, por ejemplo, HepG2 (ATCC nº HTB-8.065), líneas celulares intestinales como, por ejemplo, FHs 74 (ATCC nº CCL -241).
- Detección de células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino
- Los marcadores característicos del linaje pancreático endocrino son bien conocidos por los expertos en la materia y los marcadores adicionales característicos del linaje pancreático endocrino continúan siendo identificados. Se pueden utilizar estos marcadores para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje pancreático endocrino. Los marcadores específicos del linaje pancreático endocrino incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo, NGN-3, NeuroD e islote-1.
- Los marcadores característicos del linaje celular β son bien conocidos por los expertos en la materia y los marcadores adicionales característicos del linaje celular β continúan siendo identificados. Se pueden utilizar estos marcadores para confirmar que las células tratadas de acuerdo con la presente invención se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje celular β . Las características específicas del linaje celular β incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción como, por ejemplo: Pdx1 (gen de homeosecuencia 1 pancreático duodenal), Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1, Pax6, Pax4, NeuroD, HNF-1b, HNF-6, HNF-3beta y MAFA, entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la materia para la identificación de células endocrinas, véase, p. ej., la obra de Edlund (*Nature Reviews Genetics* 3, 524-632 (2002)).
- La eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje pancreático endocrino. Alternativamente, la eficiencia de la diferenciación puede determinarse mediante la exposición de una población celular tratada a un agente (como, por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce específicamente un marcador de proteínas expresado por células que expresan marcadores característicos del linaje celular β .
- Los métodos para valorar la expresión de los marcadores de ácido nucleico y proteico en células aisladas o cultivadas son estándar en la materia. Estos incluyen: reacción en cadena de la transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR), ensayo Northern, hibridación *in situ* (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y otros autores, Ediciones Suplemento, 2001) e inmunoensayos como, por ejemplo, el análisis de inmunohistoquímica del material seccionado, Western blot y, para marcadores accesibles en células intactas, el análisis de la citometría de flujo (FACS) (véase, p. ej., la obra de Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).
- Los ejemplos de anticuerpos aptos para detectar algunos marcadores de proteínas se enumeran en la **tabla 1A**. Cabe señalar que otros anticuerpos dirigidos a los mismos marcadores, que se reconocen en los anticuerpos enumerados en la **tabla 1A**, están disponibles o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para valorar la expresión de marcadores en las células aisladas, de acuerdo con la presente invención.
- En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente que sufre o tiene riesgo de desarrollar una diabetes de tipo 1. Este método conlleva el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células madre pluripotentes *in vitro*, en el interior de un linaje celular β y la implantación de las células del linaje celular β en un paciente.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente que sufre o tiene riesgo de desarrollar una diabetes de tipo 2. Este método conlleva el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación

de las células madre pluripotentes *in vitro*, en el interior de un linaje celular β y la implantación de las células del linaje celular β en un paciente.

- Si procede, se puede tratar adicionalmente al paciente con agentes farmacéuticos o bioactivos que faciliten la supervivencia y la función de las células trasplantadas. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo: insulina, miembros de la familia TGF- β (incluye TGF- β 1, 2 y 3), proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores 1 y 2 de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -7, -8, -10 y -15), factor de crecimiento celular derivado del endotelio vascular (VEGF), pleiotrophin y endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo: nicotinamida, péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1 y GLP-2, Exendin-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea e inhibidores de MAPK como, por ejemplo, los componentes que se divulgan en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0209901 y en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0132729.
- Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en el interior de una célula productora de insulina, antes de trasplantarlas dentro de un recipiente. En una materialización específica, las células madre pluripotentes están completamente diferenciadas en el interior de células β , antes de trasplantarlas dentro de un recipiente. Alternativamente, las células madre pluripotentes pueden trasplantarse dentro de un recipiente en un estado indiferenciado o parcialmente diferenciado. Otra diferenciación puede tener lugar en el recipiente.
- Las células del endodermo definitivo o, alternativamente, las células del endodermo pancreático o, alternativamente, las células β pueden implantarse como células dispersas o formadas en el interior de clústeres que pueden administrarse en la vena porta hepática. Alternativamente, las células se pueden proporcionar en soportes poliméricos degradables y biocompatibles o bien en dispositivos porosos no degradables o encapsulados para protegerse de la respuesta inmune del huésped. Las células pueden implantarse en un lugar apropiado del receptor. Los lugares de implantación comprenden, por ejemplo, el hígado, el páncreas innato, el espacio subcapsular renal, el epiplón, el peritoneo, el espacio subserosal, el intestino, el estómago o un bolsillo subcutáneo.
- Para potenciar una mayor diferenciación, supervivencia o actividad de las células implantadas, los factores adicionales como, por ejemplo, los factores de crecimiento o los agentes antioxidantes o antiinflamatorios pueden administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de las células. En algunas materializaciones, los factores de crecimiento se utilizan para diferenciar las células administradas *in vivo*. Las células endógenas pueden segregar estos factores los cuales se exponen a las células administradas *in situ*. Las células implantadas pueden inducirse para diferenciarse mediante cualquier combinación de factores de crecimiento administrados de forma endógena o exógena y que son conocidos en la materia.
- La cantidad de células utilizadas en la implantación depende de un número de varios factores que incluyen la condición del paciente y su respuesta a la terapia y que un experto en la materia puede llegar a determinar.
- En un aspecto, esta divulgación describe un método para tratar a un paciente que sufre o tiene riesgo de desarrollar una diabetes. Este método conlleva el cultivo de células madre pluripotentes, la diferenciación de las células cultivadas *in vitro*, en el interior de un linaje celular β y la incorporación de las células en un soporte tridimensional. Las células pueden conservarse *in vitro* en este soporte antes de su implantación en el paciente. Alternativamente, el soporte que contiene las células puede implantarse directamente en el paciente, sin un cultivo adicional *in vitro*.
- Opcionalmente, el soporte puede incorporarse con, al menos, un agente farmacéutico que facilite la supervivencia y la función de las células trasplantadas.
- Los materiales de soporte adecuados para utilizarlos con los fines de la presente invención incluyen modelos de tejido, conductos, barreras y depósitos aptos para la reparación del tejido. En particular, los materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas que se han utilizado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar el tejido biológico, así como para llevar agentes quimiotácticos para inducir el crecimiento del tejido, son aptos para utilizarlos en la práctica de los métodos de la presente invención. Véanse, por ejemplo, los materiales divulgados en las patentes de EE. UU.: nº 5.770.417, nº 6.022.743, nº 5.567.612, nº 5.759.830, nº 6.626.950, nº 6.534.084, nº 6.306.424, nº 6.365.149, nº 6.599.323, nº 6.656.488, nº 4.557.264, nº 6.333.029 y en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0062753 A1.
- Para formar un soporte con un agente farmacéutico incorporado, el agente farmacéutico puede mezclarse con la solución polimérica antes de formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico podría recubrirse sobre un soporte fabricado, preferiblemente en presencia de un portador farmacéutico. El agente farmacéutico puede estar presente como un líquido, un sólido minuciosamente dividido o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, se pueden añadir excipientes al soporte para alterar la tasa de liberación del agente farmacéutico. En otra materialización, se incorpora al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente antiinflamatorio como, por ejemplo, los componentes divulgados en la patente de EE. UU nº 6.509.369.
- Se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente antiapoptótico como, por ejemplo, los componentes divulgados en la patente de EE. UU nº 6.793.945.

También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente inhibidor de la fibrosis como, por ejemplo, los componentes divulgados en la patente de EE. UU nº 6.331.298.

5 También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es capaz de potenciar la angiogénesis como, por ejemplo, los componentes divulgados en la solicitud de EE. UU publicada en 2004/0220393 y en la solicitud de EE. UU publicada en 2004/0209901.

10 También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un componente inmunosupresor como, por ejemplo, los componentes divulgados en la solicitud de EE. UU publicada en 2004/0171623.

15 También se puede incorporar al soporte, al menos, un componente farmacéutico que es un factor de crecimiento como, por ejemplo: miembros de la familia TGF- β (incluye TGF- β 1, 2 y 3), proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores 1 y 2 de crecimiento de fibroblasto, factores de crecimiento -AA y -BB derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-1, 2), factor de diferenciación de crecimiento (GDF -5, -6, -8, -10 y -15), factor de crecimiento celular derivado del endotelio vascular (VEGF), pleiotrophin y endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo: nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1 alfa, péptidos 1 y 2 similares al glucagón (GLP-1 y 2), *mimetobody* GLP-1, GLP-2 y 3, Exendin-4, Nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascin C, tropoelastina, péptidos derivados de la trombina, cathelicidins, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen células y dominios de unión a la heparina de proteínas adhesivas de la matriz extracelular como, por ejemplo, la fibronectina y la vitronectina, inhibidores de MAPK como, por ejemplo, los componentes que se divulgan en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0209901 y en la solicitud de EE. UU. publicada en 2004/0132729.

25 La incorporación de las células de la presente invención en el interior de una matriz puede lograrse depositando, simplemente, las células en la matriz. Las células pueden introducirse en el interior de la matriz por simple difusión, *J. Pediatr. Surg.* 23 (1Pt 2), 3-9, 1988. Se han venido desarrollando otros enfoques para potenciar la eficiencia de la siembra celular. Por ejemplo, se han utilizado frascos de agitación en la siembra de condrocitos en matrices de ácido poliglicólico (*Biotechnol. Prog.* 14 (2), 139-202, 1998). Otro enfoque para las células de siembra es el uso de la centrifugación que produce un esfuerzo mínimo en las células sembradas y potencia la eficiencia de la siembra. Por ejemplo, Yang y otros autores desarrollaron un método de siembra celular (*J. Biomed. Mater. Res.* 55(3), 379-86, 2001) que se refiere a la inmovilización celular por centrifugación (CCI).

30 La presente invención se ilustra mejor aunque no queda limitada a los siguientes ejemplos.

35 EJEMPLOS

Referencia: ejemplo 1

40 Cultivo de células madre de embriones humanos

Las líneas H1, H7 y H9 de células madre de embriones humanos se obtuvieron en el Centro de Investigación WiCell, Inc., (Madison, Wisconsin) y se cultivaron según las instrucciones proporcionadas por el centro de origen. Resumiendo, las células se cultivaron en unas células sustentadoras de fibroblasto embrionario de ratón (MEF) en un medio celular ES que consiste en DMEM/F12 (Invitrogen/Gibco) suplementado con 20% de suero sustituto, 100 nM (MEM) de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de β -mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina con 4 ng/ml de factor de crecimiento básico humano de fibroblastos (bFGF) (todos de Invitrogen/Gibco). Las células MEF, derivadas de E13 a 13,5 embriones de ratón, se adquirieron en Charles River. Las células MEF se expandieron en un medio DMEM suplementado con 10% de FBS (HyClone), 2 mM de glutamina y 100 mM (MEM) de aminoácidos no esenciales. Los cultivos de células MEF subconfluentes se trataron con 10 μ g/ml de mitomicina C (Sigma, St. Louis, Misuri) durante 3 horas de detención de la división celular, luego se tipsinizaron y se recubrieron a 2x10⁴ /cm² en 0,1% de platos recubiertos de gelatina bovina. Las células MEF, que pasaron de ser dos a cuatro, se utilizaron como capas sustentadoras. Las células madre de embriones humanos recubiertas en capas sustentadoras celulares se cultivaron a 37° C en una atmósfera del 5% de CO₂, en una incubadora de cultivo de tejido humidificado. Cuando confluyen (aproximadamente 5-7 días tras el recubrimiento), las células madre de embriones humanos se trataron con 1 mg/ml de collagenasa de tipo IV (Invitrogen/Gibco) durante 5-10 minutos y luego se raspó suavemente de la superficie utilizando para ello una pipeta de 5ml. Las células giraron durante 5 minutos a 900 rpm y el sedimento volvió a quedar suspendido y recubierto a una proporción de 1:3 a 1:4 células en un medio de cultivo fresco.

60 Referencia: ejemplo 2

Formación del endodermo definitivo

65 Se examinaron los efectos de la activina A en la expresión de los marcadores del endodermo definitivo. Se añadió activina A (100 ng/ml) a poblaciones de células madre de embriones humanos cultivadas en fibroblastos

embrionarios de ratón. Las células se cultivaron de forma continuada en presencia de activina A y se cosecharon en los tiempos indicados. Se examinó el nivel de expresión de los marcadores del endodermo definitivo mediante PCR (**figura 1**), FACS (resultados resumidos en la **tabla II**) e inmunohistoquímica (**figura 2**).

La activina A provocó un incremento dependiente del tiempo en la expresión del CXCR4, GATA4, HNF-3beta, Mixl-1 y Sox-17 mRNA en la línea H9 (**figura 1, panel a**). También se observó una regulación significativa hasta los marcadores del endodermo anterior: Cerberus, Otx-1 y los genes de Hex (**figura 1, panel b**). Se observó un incremento en la proteína CXCR4 mediante análisis por FACS, siguiendo un tratamiento con activina A. La expresión de E-cadherina y N-cadherina no cambió el tratamiento que se seguía con activina A (**tabla 11A**). Las células positivas del CXCR4 también fueron sumamente positivas para C-kit, EPCAM y CD99 y negativas para CD9. La pauta de expresión para estos marcadores fue constante entre las tres líneas hEs examinadas (**tabla 11B** para H7 y **tabla 11C** para H1). La inmunocitoquímica llevada a cabo en las células tratadas durante cinco días con activina A reveló que el 30%-40% de las células en el cultivo tratado eran positivas para Sox-17 y HNF-3beta. Paralelamente, casi el 100% de las células diferenciadas eran todavía positivas para Oct4 (**figura 2**). Con la reducción en la expresión de los marcadores de superficie de pluripotencia, combinada con un incremento en la expresión de los marcadores del endodermo definitivo, estos datos sugieren que la activina A promueve la diferenciación de las células madre de embriones humanos del endodermo definitivo.

Referencia: ejemplo 3

Formación del endodermo pancreático

Se añadieron los factores de crecimiento, conocidos por inducir la diferenciación de células madre de embriones humanos del endodermo pancreático, a los cultivos celulares. En particular, se añadieron a los cultivos celulares: activina A, bFGF y ácido retinoico, conocidos por inducir la formación del endodermo pancreático.

En las primeras series de experimentos se añadió activina A a las poblaciones de células madre de embriones humanos cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón y hasta siete días en DMEM/F12, suplementado con un 0% a 2% de suero y activina A (100 ng/ml). Las células se cosecharon en los momentos indicados en la **figura 3** y se sensayaron mediante PCR para la expresión de los genes mostrados (**figuras 3, 4 y 5**). En la **figura 3** el análisis de PCR indicó que las células tratadas con activina expresaron un amplio espectro de genes asociados con el desarrollo del endodermo y que incluye: GATA4 (**figura 3, panel a**), Sox-17 (**figura 3, panel b**), HNF-3beta (**figura 3, panel c**) y Mixl-1 (**figura 3, panel d**). Sin embargo, no se observó la expresión génica de Pdx1. Se observó la misma pauta de expresión de los marcadores del linaje del endodermo en activina A tratada con células H7 (**figura 6, paneles a al f**). En esta etapa no hubo una reducción significativa de la expresión de Oct4.

La activina A provocó una reducción dependiente del tiempo en la expresión de los marcadores Sox-7 del endodermo extraembrionario (**figura 4, panel a**) y AFP (**figura 4, panel b**). La activina A redujo la expresión de Brachyury (**figura 5, panel a**) pero no tuvo efecto en la expresión del marcador neuronal Zic1 (**figura 5, panel b**).

Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que la expresión incrementada de Sox-17, Mixl-1, GATA4 y HNF-3beta juntos, con la sobreexpresión de los anteriores marcadores del endodermo (Otx1, Cer1 y los genes de Hex), corresponde a la formación del endodermo definitivo en respuesta al tratamiento con activina A. El análisis de los marcadores del endodermo definitivo mediante inmunocitoquímica revelaron que la expresión de la proteína para estos genes reflejaba también las tendencias observadas en la expresión de mRNA. Los niveles de expresión para HNF-3beta, Sox-17 y GATA4 fueron bajos en las células sin tratar de, aproximadamente un 10% a un 20% de todas las células. El tratamiento durante cinco días con activina A (100 ng/ml) incrementó la expresión de HNF-3beta, Sox-17 y GATA4 hasta, aproximadamente, un 50% a un 90% de todas las células (**figura 7**).

En una segunda serie de experimentos, los cultivos de células madre de embriones humanos se conservaron en condiciones de cultivo indiferenciado durante 2-3 días, según los métodos descritos en el ejemplo 1. Una vez que las células fueron confluentes en un 70-80%, el medio cambió a DMEM/F12 con un 0 a un 2% de FB, con la adición de 100 ng/ml de activina A y se cultivaron en presencia de activina A durante cualquiera de los tres, cinco o siete días. Tras este intervalo de tiempo, las células se trataron adicionalmente durante cinco a seis días con combinaciones de ácido retinoico y bFGF, tal y como se muestra en la **figura 8**. Se cosecharon los cultivos y se recogieron muestras de mRNA para su análisis. También se incluyeron cultivos de control consistentes en células tratadas solo con activina A.

El análisis de expresión génica reveló que esa activina A o el ácido retinoico solos no inducían la expresión de Pdx1. Se observaron resultados similares en cultivos de células tratadas con ácido retinoico combinado con FGF y en presencia de activina A (**figura 8, panel a**). Sin embargo, el tratamiento de las células con ácido retinoico y FGF en ausencia de activina A incrementó todavía más la expresión de Pdx1 (**figura 8, panel a**). Se trataron las células, durante tres días, con activina A, luego se trataron durante cinco días con 1 µM de ácido retinoico y 50 ng/ml de bFGF (también conocido como FGF-2) en ausencia de activina A y se mostró un nivel de expresión de Pdx1 que fue de, aproximadamente, 3.500 veces superior que la observada en muestras con tratamiento de solo activina A

durante cinco días (**figura 8, panel a**). La inmunocitoquímica mostró que de un 5 a un 20% de todas las células expresaron Pdx1 (**figura 9**).

El tratamiento con con 1 μ M de ácido retinoico y bFGF, en ausencia de activina A, también causó un incremento en la expresión de GLUT-2 y PTF1a (**figura 8, panel c**) que no se había observado en células tratadas en presencia de solo activina A. El mayor incremento en la expresión de GLUT-2 y PTF1a se observó en células tratadas con 1 μ M de ácido retinoico y 50 ng/ml de bFGF. Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que se potenció más la formación del endodermo pancreático mediante la extracción de la activina A de los cultivos celulares, tras la formación del endodermo definitivo.

Referencia: ejemplo 4

Formación de las células endocrino pancreáticas

Los cultivos de células madre de embriones humanos se conservaron en condiciones de cultivo indiferenciado durante 3-4 días, según los métodos descritos en el **ejemplo 1**. Una vez que las células fueron confluentes en un 50%-60%, el medio, que contiene 100 ng/ml de activina A, cambió a DMEM/F12 sin FBS y las células se cultivaron en este medio durante un día. Tras el primer día de cultivo, se extrajo el medio y se volvió a colocar con el medio que contiene 0,5% de FBS con 100 ng/ml de activina A y las células se cultivaron durante un día. Tras el segundo día de cultivo, se extrajo el medio y se volvió a colocar con el medio que contiene 2% de FBS con 100 ng/ml de activina A y las células se cultivaron durante un día. Tras este intervalo de tiempo, las células se trataron durante seis días con combinaciones de ácido retinoico y FGF, tal y como se recoge en la referencia 2, luego se extrajo el medio de cultivo y se volvió a colocar con el medio que se compone de DMEM/F12 con 2% de FBS y que contiene los inhibidores de y-secretasa L-685,458, a 10 μ M durante tres días. Se cosecharon los cultivos y se recogieron muestras de mRNA para su análisis. También se incluyeron los cultivos de control consistentes en células tratadas solo con activina A durante cinco días.

Los análisis de expresión génica revelaron que esa activina A, sola o combinada con ácido retinoico y FGFs, no indujo la expresión de Ngn3 o insulina (**figura 10, paneles a y c**). También se observó una reducción en la expresión de Hes-1, siguiendo el tratamiento con L- 685,458. La máxima inhibición se observó el tercer día posterior al tratamiento (**figura 10, panel d**). Sin embargo, el tratamiento de células con L-685,458 indujo la expresión de Ngn3 a , aproximadamente, un nivel 50 veces superior que el observado en las muestras tratadas solo con activina A o ácido retinoico combinado con FGFs. Se observó un incremento de 70 veces en la expresión de insulina en las muestras tratadas con el inhibidor de y-secretasa. La expresión de NeuroD1 también se incrementó más gracias al tratamiento con L- 685,458 (**figura 10, panel a**). Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que la formación de las células endocrinas se potencia más mediante la extracción del ácido retinoico y FGFs del cultivo celular y por la adición de inhibidores de y-secretasa tras la formación del endodermo pancreático.

Referencia: ejemplo 5

Formación de las células endocrino pancreáticas que expresan Nkx2,2

Las células del endodermo definitivo se obtuvieron según los métodos que se recogen en la referencia (ejemplo) 2 donde se trataron como sigue: las células se cultivaron en un medio basal que se compone de DMEM/F12 con 2% de FBS más 50 ng/ml de activina A, 50 ng/ml de FGF básico y 1 μ M de ácido retinoico durante tres a cinco días. Las células se cultivaron de forma continuada durante otros tres a cinco días, en un medio basal con solo 1 μ M de ácido retinoico o con bFGF. Las muestras de RNA se cosecharon a partir de células en varios momentos de este proceso para ayudar a evaluar la diferenciación dirigida de las células. Además, el medio de cultivo y los factores se extrajeron regularmente y se repusieron a lo largo del protocolo de diferenciación. La adición de activina A mostró un incremento de unas 35 veces en la expresión de Nkx2,2, si se compara con las muestras sin activina A. Las muestras tratadas con activina A durante los tres primeros días de cultivo conservaron la expresión de Pdx1a un nivel similar al de las muestras que no contienen activina A (**figura 11**). Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que la expresión del marcador endocrino pancreático Nkx2,2 se potencia más mediante la adición de activina A en los tres primeros días del tratamiento con ácido retinoico y bFGF.

Ejemplo 6

Paso y expansión de las células del endodermo pancreático en cultivo

Este ejemplo demuestra que las células del endodermo pancreático derivadas de células madre de embriones humanos descritas aquí pueden conservarse en un cultivo celular y pasar sin mayor diferenciación. Las células del endodermo pancreático se diferenciaron en presencia de 100 ng/ml de activina A y en baja concentración de suero DMEM/F12. La baja concentración de suero DMEM/F12 contenía 0% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) en el día 1, 0,5% (v/v) de FBS en el día 2 y 2% (v/v) de FBS cada día que siguió. Tras cuatro días de diferenciación, las células se cultivaron en baja concentración de suero DMEM/F12 que contenía 2% (v/v) de FBS, 1 μ M de ácido retinoico y 50 ng/ml de bFGF durante un total de más de seis días. Tras los seis días de diferenciación, las células se

conservaron en cultivo con baja concentración de suero DMEM/F12 y que contenía 2% (v/v) de FBS, en presencia de 50 ng/ml de FGF10 y durante un total de seis días. Durante el período de cultivo de seis días, las células del endodermo pancreático pasaron dos veces y el tiempo de duplicación de la población celular es de unas 36 a 48 horas durante este sexto día de cultivo. En los días 0, 3 y 6 de cultivo, el Q-PCR se utilizó para medir la expresión de los genes marcadores indicativos del endodermo pancreático. La **figura 12** muestra que las células que crecieron en presencia de 50 ng/ml de FGF10 conservaron la expresión del marcador del endodermo pancreático Pdx1 durante el período de cultivo del sexto día posterior a su derivación.

Referencia: ejemplo 7

Derivación de los hepatocitos a partir de células madre de embriones humanos

Los cultivos de células madre de embriones humanos se conservaron en condiciones de cultivo indiferenciado durante 2-3 días, según los métodos descritos en la referencia (ejemplo) 1. Una vez que las células fueron confluentes en un 70-80%, el medio cambió a DMEM/F12 con 2% de FBS que contiene 100 ng/ml de activina A y las células se cultivaron en presencia de activina A durante siete días. Tras siete días de tratamiento con activina A, las células se trataron durante cinco días en las condiciones mostradas en la **figura 13**. Tras este tiempo, se cosecharon las células y se recogieron muestras de mRNA para su análisis.

Se observó un incremento en la expresión de la alfa-fetoproteína (AFP) y de la albúmina (**figura 13, panel a**) para células cultivadas en ausencia de activina A. Este incremento fue mayor por el ácido retinoico y el FGF-4 (**figura 13, panel b**). Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que los cultivos de células madre de embriones humanos son capaces de expresar marcadores de hepatocitos siguiendo el tratamiento descrito más arriba. Además, las células madre de embriones humanos son capaces de diferenciarse en el interior de células que expresan marcadores que son característicos de los hepatocitos.

Referencia: ejemplo 8

Caracterización de la línea H9 de células madre de embriones humanos

La calidad de las células H9 se monitorizó a lo largo del tiempo mediante la evaluación de la expresión de varios marcadores expresados por células ES (células madre de embriones humanos), Carpenter y otros autores, 2001; Reubinoff y otros autores, 2000; Thomson y otros autores, 1998a. Las células H9 manifestaron una expresión recíproca de antígenos embrionarios de etapa específica (**tabla III**). Las células H9 representan una fuerte inmunoreactividad para SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, AP y antígenos CD9, todos los cuales son característicos de las células madre indiferenciadas de embriones humanos.

La RT-PCR se realizó para valorar la expresión de los genes característicos de las células madre embrionarias como, por ejemplo, Oct3/4, Sox-2, UTF-1, REX-1, Cx43, Cx45, ABCG-2 y TERT que confirman que las células que crecieron en este ejemplo parecían similares a las células madre indiferenciadas embrionarias descritas previamente (**tabla III**). La expresión de la proteína Oct3/4 y la actividad fosfatasa alcalina (Chemicon) se confirmaron mediante inmunotinción. Una mayoría de células de H9 fueron positivas para Oct3/4 y AP (**figura 14**). Generalmente, estos resultados demuestran que las células H9 utilizadas en este ejemplo no eran significativamente diferentes en su morfología, inmunotinción de antígenos o expresión del marcador de pluripotencia cuando se compararon con los informes de otros laboratorios.

Referencia: ejemplo 9

Análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

Se extrajeron las células adheridas de la placa de cultivo mediante una incubación de cinco minutos con la solución TrypLE™ Express (Invitrogen, California). Las células liberadas se volvieron a suspender en un medio de cultivo de células madre de embriones humanos y se recuperaron mediante centrifugación, seguida del lavado y la resuspensión de las células en un tampón de tinción consistente en 2% de BSA y 0,05% de ázida sódica en PBS (Sigma, Missouri). Según proceda, las células se bloquearon durante 15 minutos con el receptor de Fc utilizando un 0,1% de solución de y-globulina (Sigma). Las alícuotas (aproximadamente 105 células) se incubaron con cualquier anticuerpo monoclonal conjugado de ficoeritrina (PE) o alofocianina (APC) (5µl de anticuerpos por 106 células), tal y como se indica en la **tabla I** o con anticuerpos primarios no conjugados. Los controles incluyeron anticuerpos de isotipo combinados apropiados, células no teñidas y células teñidas solo con anticuerpos secundarios no conjugados. Todas las incubaciones con anticuerpos se realizaron durante 30 minutos a 4°C, después de lo cual se lavaron las células con el tampón de tinción. Las muestras que se tiñeron con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante otros 30 minutos a 4°C con anticuerpos secundarios conjugados marcados con PE o APC. Véase la **tabla I** con una lista de los anticuerpos secundarios utilizados. Las células lavadas se sedimentaron y se volvieron a suspender en el tampón de tinción y se identificaron las moléculas de la superficie celular utilizando para ello un instrumento de FACS Aria (BD Biosciences) que recoge, al menos, 10.000 pruebas.

Referencia: ejemplo 10**Inmunocitoquímica**

- 5 Las células que se sembraron en platos recubiertos de 0,1% de Matrigel (BD) se fijaron con 4% de paraformaldehído, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Se bloquearon las células fijadas, durante una hora y a temperatura ambiente, con 0,1% de PBS, 10% de BSA, 0,5% de suero normal de pollo Triton-X-100 y luego se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios en suero normal de pollo, con 0,1% de PBS y 10% de BSA a 4°C. En la **tabla IB** se muestra la lista de los anticuerpos primarios y sus diluciones de trabajo. Tras tres lavados en 0,1% de PBS y BSA, los anticuerpos secundarios fluorescentes en una dilución de 1:100 en PBS se incubaron con células, durante una hora y a temperatura ambiente, para permitir la unión. Las muestras de control incluyeron reacciones donde se omitió el anticuerpo primario o se sustituyó por las correspondientes inmonoglobulinas combinadas de control negativo en la misma concentración que los anticuerpos primarios. Se aclararon las muestras teñidas; se añadió una gota de PROLONG® (Invitrogen, California), que contiene diamino-2-fenilindol, dihidroclorido (DAPI), a cada muestra para la contratinción del núcleo y para su función como reactivo antifade. Las imágenes se tomaron utilizando para ello una Nikon Confocal Eclipse C-1 con microscopio invertido (Nikon, Japón) y con un objetivo de 10-60x.

Referencia: ejemplo 11

20

Análisis de PCR de las células indiferenciadas

- 25 Extracción de RNA, purificación y síntesis del ADNc. Las muestras de RNA se purificaron mediante la unión con una membrana de gel de sílice (Rneasy Mini Kit, Qiagen, California) en presencia de un etanol que contiene un tampón hipersalino, seguido del lavado para extraer contaminantes. Se purificó más el RNA utilizando para ello un kit TURBO libre de ADN (Ambion, Inc.) y luego, se eluyó en agua un RNA de alta calidad. El rendimiento y la pureza se valoraron mediante las lecturas de A260 y A280 en un espectrofotómetro. Los ADN copia (ADNc) se hicieron a partir de RNA purificados, utilizando para ello un kit de archivo ABI (ABI, California) de ADNc de alta capacidad.

- 30 Amplificación de PCR en tiempo real y análisis cuantitativo. A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos se adquirieron en Applied Biosystems. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando para ello el sistema de detección secuencial ABI PRISM®7900. Se utilizó el TAQMAN® UNIVERSAL PCT MASTER MIX® (ABI, California) con 20 ng de transcriptasa inversa de RNA, en un volumen de reacción total de 20 µl. Cada muestra de ADNc se ensayó por duplicado para corregir errores de la pipeta. Los iniciadores y las sondas TAQMAN® marcadas con FAM se utilizaron en concentraciones de 200 nM. El nivel de expresión de cada gen diana se normalizó utilizando para ello gliceraldehído humano-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), control endógeno previamente desarrollado por Applied Biosystem. Los juegos de iniciadores y sondas se enumeran como sigue: Oct3/4 (Hs00742896), Sox-2 (Hs00602736), UTF-1 (Hs00747497), Rex-1 (Hs00399279), Connexin 43 (Hs00748445), Connexin 45 (Hs00271416), ABCG2 (Hs00184979), Tert (Hs00162669), HNF- 3β (Hs00232764), GATA4 (Hs00171403), Mixl1 (Hs00430824), Sox-7 (Hs00846731), AFP (Hs00173490), Brachyury (Hs00610080), GSC (Hs00418279_ml), Pdx-1 (Hs00426216), PTF1a (Hs00603586), Ngn3 (Hs00360700), NeuroD1 (Hs00159598), insulina (Hs00355773) y Glu2 (Hs00165775). Los iniciadores Sox-17 se diseñaron utilizando para ello el programa de iniciadores (ABI, California) y donde se encuentran las siguientes secuencias: TGGGGCAGCAGATACCA (ID SEC. nº:1), AGCGCCTTCCACGACTTG (ID SEC. nº: 2) y CCAGCATCTTGCTCAACTCGGCG (ID SEC. nº: 3). Tras una incubación inicial a 50°C durante 2 minutos le siguió otra a 95°C durante 10 minutos, las muestras se sometieron 40 veces a ciclos en dos etapas: una fase de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, seguida de una fase de hibridación-extensión a 60°C durante 1 minuto. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando para ello el programa de sistema de detección secuencial GENEAMP®7000. Para cada juego de iniciadores y sondas se determinó un valor C_t como número de ciclo al cual la intensidad fluorescente alcanzó un valor específico en mitad de la región exponencial de la amplificación. Los niveles de la expresión génica relativa se calcularon utilizando el método comparativo C_t. Resumiendo, para cada muestra de ADNc, el control endógeno de valor C_t se sustrajo a partir del gen de interés C_t para dar el valor delta C_t (ΔC_t). La cantidad normalizada de la diana se calculó como 2^{-ΔC_t}, suponiendo que la amplificación es 100% eficiente. Los datos finales se expresaron en relación a una muestra de calibrador.

55

Referencia: ejemplo 12**Análisis de cariotipos**

- 60 El cariotipo de las células H9 se determinó mediante un análisis estándar de cariotipos con bandeado G. Se evaluaron un total de 100 metafases extendidas (Laboratorios Applied Genetics, Inc.). En las 100 células analizadas no se encontraron aberraciones cromosómicas. El análisis citogenético demostró que las células tenían un número normal de autosomas y un número modal de cromosomas de 46. La figura 15 representa un ejemplo típico de cariotipo obtenido a partir de la línea celular H9 de células madre de embriones humanos.

65

Referencia: ejemplo 13

Cultivo de células madre de embriones humanos en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular

Las líneas H1, H7 y H9 de células madre de embriones humanos se obtuvieron en el Centro de investigación WiCell, Inc. (Madison, Wisconsin) y se cultivaron según las instrucciones proporcionadas por el centro de origen. Resumiendo, las células se cultivaron en células sustentadoras del fibroblasto embrionario de ratón (MEF) en un medio celular ES consistente en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) complementado con un 20 % de sustitución de suero por explosión, 100 nM MEM de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM beta-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina con factor de crecimiento de fibroblasto básico humano de 4ng/ml (bFGF). Las células MEF, derivadas de embriones de ratón de E13 a 13,5, se adquirieron a Charles River. Las células MEF se expandieron en un medio DMEM complementado con un 10 % de FBS (Hyclone), 2mM de glutamina y 100 mM MEM aminoácidos no esenciales. Los cultivos de células MEF sub-confluentes se trataron con 10 µg/ml de mitomicina C (Sigma, St. Louis, MO) durante 3 horas para detener la división celular y a continuación se tripsinizaron y prensaron a 2x10⁴/cm² en placas con cobertura de gelatina bovina al 0,1 %. Las células MEF del fragmento dos al cuatro se usaron como capas sustentadoras. Las células madre embrionarias humanas prensadas en capas sustentadoras de células MEF se cultivaron a 37 ° C en una atmósfera del 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada de cultivos de tejidos humanos. Cuando se trataron células madre embrionarias humanas confluyentes con 1 mg/ml de colagenasa tipo IV (Invitrogen/GIBCO) durante 5-10 min y a continuación se raspó la superficie con cuidado usando una pipeta de vidrio de 5 ml. Las células se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos y el sedimento se volvió a suspender y prensar a una proporción de 1:3 a 1:4 de células sobre placas cubiertas con una dilución de 1:30 de MATRIGEL™ (BD Biosciences) reducido por factor de crecimiento. A continuación, las células se cultivaron en un medio condicionado por MEF complementado con 8 ng/ml de bFGF y colagenasa pasada por placas con capa de MATRIGEL por lo menos cinco veces. Las células cultivadas en MATRIGEL™ se pasaron rutinariamente con colagenasa IV (Invitrogen/GIBCO), Dispase (BD Biosciences) o enzima Liberase (Roche, IN).

Referencia: Ejemplo 14

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos cubierto con matriz extracelular a endodermo definitivo

La diferenciación de células madre embrionarias a endodermo definitivo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (diciembre de 2005). Brevemente, se expusieron cultivos de H9 con una confluencia de 60 a 70% a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días, y a continuación se trataron con medio DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Las células de H9 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL reducido por factor de crecimiento a una dilución de 1:30 a 1:10 o en MATRIGEL normal a una dilución a 1:30 a 1:10. Las placas se recubrieron con MATRIGEL durante 1 hora a temperatura ambiente.

El día 5 se analizaron los cultivos por medio de FACS por expresión de CXCR4, E-cadherina, CD9, y N-cadherina y en PCR de tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (Bry), goosecoide (GSC), HNF-3 beta y GATA4. AFP y SOX-7 se ven como marcadores endodérmicos viscerales, mientras que GATA4, HNF-3 beta y SOX-17 representan marcadores endodérmicos definidos y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de línea primitiva. La **Figura 17** describe la expresión de CXCR4 por FACS. Ha habido un aumento significativo en la expresión de CXCR4 por células cultivadas en placas cubiertas con MATRIGEL a una dilución de 1:10 en comparación con concentraciones más bajas de MATRIGEL. Además, el MATRIGEL reducido por factor de crecimiento no ha sido tan eficaz en la formación de células endodérmicas definitivas en comparación con el MATRIGEL normal.

La **Figura 18** muestra los resultados de PCR en tiempo real que demuestran que las células cultivadas en placas recubiertas con una dilución de 1:10 de MATRIGEL mostraron un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con las células cultivadas en una dilución de 1:30 de MATRIGEL.

Referencia: Ejemplo 15

Análisis de micromatriz de los cambios en la expresión genética de las células madre embrionarias tras la formación de endodermo definitivo

El ARN total se aisló de los siguientes cultivos de células madre embrionarias usando un mini kit RNeasy (Qiagen): células H9P83 cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL y expuestas a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 suplementado con 2 % FBS y 100 ng/ml Activina A (AA) tres días más; células H0P44 cultivadas en MEFs y expuestas a medio DMEM/F12 complementadas con 0,5 % FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A otros tres días. Los controles para cada grupo incluyeron células prensadas en placas recubiertas con MATRIGEL y cultivadas en un medio condicionado por MEF o células prensadas en MEFs y cultivadas en un medio ES.

La preparación, hibridización de la muestra y el análisis de la imagen se llevaron a cabo de acuerdo con la matriz Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0. Tras la normalización y transformación logarítmica, se llevó a cabo el análisis de datos usando software OmniViz® (MA) y GENESIFTER (VizX Labs, WA). La variabilidad dentro de cada tratamiento y entre los diferentes tratamientos se comparó usando el coeficiente de correlación Pearson. La variación en los perfiles de expresión genética entre los diferentes tratamientos junto con el coeficiente de correlación entre las líneas se muestra en la **Figura 19**. Se evaluaron diferencias significativas en la expresión genética entre las muestras usando el análisis de la variación y un test-F con un valor-P ajustado (corrección de Benjamini y Hochberg) de $\leq 0,05$. Solo se incluyeron en el análisis genes que figuraron. La **Tabla IV** muestra los genes que se expresan de forma diferencial con una diferencia de por lo menos 5 entre los varios ejemplos. Se muestra el valor de intensidad normalizada de los genes que se expresan de forma significativa junto con el valor estándar del medio (SEM) para cada gen.

Referencia: Ejemplo 16

15 **Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos cubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo**

La diferenciación de células madre embrionarias a endodermo definitivo se llevó a cabo como se ha descrito previamente en Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (diciembre de 2005). Brevemente, las células H9, H7 o H1 sembradas en cultivos de MATRIGEL™ reducido por factor de crecimiento (dilución 1:30) a una confluencia de aproximadamente 60 a 70 % se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) durante dos días, tras tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. En todos los ejemplos posteriores, a no ser que se indique lo contrario, este régimen de tratamiento se denominará protocolo de endodermo definitivo (DE). Paralelamente, células H9, H7 o H1 cultivadas en distribuidores MEF también se expusieron al mismo protocolo DE indicado anteriormente.

El día 5, los cultivos se analizaron con FACS para expresión de CXCR4, E-cadherina, CD9, CD99 y N-cadherina (CD56) y con PCR en tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (BRy), goosecoide (GSC), HNF-3 beta y GATA4. AFP y SOX-7 se consideran marcadores endodérmicos viscerales, mientras que GATA4, HNF-3beta y SOX-17 representan marcadores endodérmicos definitivos y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de línea primitiva.

Las líneas H cultivadas en distribuidores de ratón y expuestas al protocolo DE tuvieron como resultado una expresión robusta de marcadores DE y expresión de CXCR4 por FACS (**Figura 20**). La **Figura 21** muestra un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con H7 sin tratar (**Figura 21, panel a**) y células H9 (**Figura 21, panel b**).

A diferencia de las líneas H cultivadas en distribuidores MEF, las líneas H cultivadas en MATRIGEL™ (dilución 1:30) y tratadas con el protocolo endodérmico definitivo no mostraron expresión robusta de marcadores endodérmicos definitivos. En concreto, la expresión de CXCR4 por FACS y PCR en tiempo real fue considerablemente más baja para las células cultivadas en MATRIGEL™ en comparación con las células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón. La expresión de marcadores endodérmicos definitivos sigue a un patrón general de respuesta en el que H1 es mayor que H9, que es mayor que H7 (**Figuras 22 y 23**). A partir de la **Figura 22**, las células H1 mostraron un aumento significativo en la expresión de CXCR4 en comparación con las líneas H7 y H9. Nótese que en todos los casos la expresión de CXCR4 fue menor para células cultivadas en MATRIGEL™ (dilución 1:30) en comparación con células cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón. La **Figura 23 (paneles a-c)** muestra los resultados del PCR en tiempo real que muestran que ha habido un incremento modesto del aumento de los marcadores endodérmicos definitivos en las líneas de H7 (**Figura 23, panel a**) y H9 (**Figura 23, panel b**). De todas formas, la línea de H1 (**Figura 23, panel c**) mostró un aumento más sólido de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con las líneas H7 y H9.

Referencia: Ejemplo 17

55 **Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo (DE)- papel de los ligandos Wnt**

Las células madre embrionarias H7P44 y H9P46 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:10) y se expusieron a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. En algunos de los cultivos, se añadió 20 ng/ml Wnt-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN), 20 ng/ml Wnt-5a (Catálogo# 3008-WN-025, R&D Systems, MN) o 25 ng/ml Wnt-5b (Catálogo# 3006-WN-025, R&D Systems, MN) a lo largo del tratamiento de cinco días. La **Figura 25** muestra imágenes de contraste de las fases del cultivo de endodermo definitivo de H9P46 en presencia de altas concentraciones de (a) AA o (b) AA+20 ng/ml Wnt-3a. La **Figura 25** muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 para H7P44 y líneas H9P46 cultivadas en MATRIGEL™ (dilución 1:30) y expuestas al protocolo DE + Wnt-3a

(Figura 25, paneles b y d) y Wnt-3a (Figura 25, paneles a y c). La presencia de Wnt-3a en cultivos DE tuvo como resultado la expresión sólida de CXCR4 (CD184) en comparación con cultivos DE tratados con bajo nivel de suero de más alta concentración de AA. La Figura 26 muestra los datos de PCR en tiempo real para los cultivos de a) H7 y b) H9 tratados con ligandos de + AA +/- Wnt de bajo suero. Para las dos líneas H, la adición de WNT-3a tuvo como resultado un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos. En contraste, Wnt 5a, Wnt-5b y Wnt-7a tuvieron un impacto mínimo sobre la expresión de los marcadores endodérmicos definitivos.

Referencia: Ejemplo 18

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos con MATRIGEL™ a endodermo definitivo: dosis eficaz de Wnt-3a

Las células madre embrionarias se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (1:10) y se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de Activina A (AA) y 10-50 ng/ml de Wnt-3a (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) y 10-50 ng/ml de Wnt-3a otros tres días. Los cultivos de control no se trataron con Wnt-3a. La Figura 27, panel a muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 en ausencia de Wnt-3a, b) 10 ng/ml Wnt-3a, c) 20 ng/ml Wnt-3a y d) 50 ng/ml Wnt-3a. En ausencia de Wnt-3a, la expresión de CXCR4 fue muy baja. En contraste, la adición de 10-50 ng/ml de Wnt-3a incrementó de forma significativa el número de células positivas CXCR4. Además, la adición de 10 ng/ml de Wnt-3a fue tan eficaz como la adición de 50 ng/ml de Wnt-3a. Los resultados de PCR en tiempo real (Figura 28, panel a) también confirman este resultado.

En un estudio independiente, las células H9p52 se prensaron en MATRIGEL™ de factor de crecimiento bajo 1:30. Los primeros 2 días del protocolo DE, se usó un rango de dosis de Wnt3a: 10 ng/ml, 5 ng/ml y 1 ng/ml. La Figura 28, panel b muestra el análisis por PCR de los marcadores DE tras 5 días de tratamiento. El número de células al final del experimento se indica en la Figura 28, panel c. Esto indica que las células proliferan cuando se usan dosis más altas de Wnt-3a. La extensión de 5 días de tratamiento Wnt3a (5D) tuvo escaso efecto sobre los marcadores DE por PCR y no tuvo un aumento significativo de los números celulares (Figura 28, panel c). Estos datos indican que 10 ng/ml Wnt3a durante dos días es suficiente para obtener una expansión celular óptima y una diferenciación endodérmica definitiva.

Referencia: Ejemplo 19

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejidos con MATRIGEL™ a efecto de endodermo definitivo (DE) de inhibidor GSK-3B

Para confirmar que el efecto de Wnt-3a se llevó a cabo por la vía de Wnt, se usó un inhibidor de GSK-3 para activar los objetivos inferiores de Wnt, como la catenina beta. Las células madre embrionarias H9P46-48 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:10) y se expusieron a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de activina-A (AA) y un inhibidor IX 10-100 nM GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA), durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % FBS, 100 ng/ml activina A (AA) y 0-1000 nM GSK-3B inhibidor IX (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA) otros tres días. Los cultivos de control se trataron con una dosis de suero bajo más otra de suero alto de activina A +/- Wnt-3a. La Figura 29, panel a muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 en ausencia de Wnt-3a o inhibidor de GSK-3B, b) +20 ng/ml Wnt-3a, c) +1000 nM GSK-3B inhibidor IX, d) +500 nM GSK-3B inhibidor IX, e) +100 nM GSK-3B inhibidor IX, f) +10 nM GSK-3B inhibidor IX, g) +100 nM GSK-3B inhibidor IX para los días 1-2 y h) +10 nM GSK-3B inhibidor IX los días 1-2.

En ausencia de Wnt-3a o en un inhibidor 10 nm GSK-3B, la expresión de CXCR4 fue muy baja. En contraste, la adición de 20 ng/ml de Wnt-3a o inhibidor de 100-1000 nM GSK-3B aumentó de forma significativa el número de células positivas CXCR4. Además, la adición de inhibidor de 100 nM GSK-3B los días 1-2 fue tan eficaz como la adición de inhibidor 100 nM GSK-3B durante el período de cinco días completo. La Figura 30 muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos para células H9P48 del (panel a) y células H9P46 del (panel b).

La Figura 16 muestra el esquema de un protocolo de diferenciación en esta invención, mientras que las células madre embrionarias se diferencian en el endodermo definitivo en un sistema sin distribuidor.

Referencia: Ejemplo 20

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a dosis eficaz de endodermo definitivo (DE)- de Activina A en presencia de inhibidor de GSK-3B o Wnt-3A

Las células madre embrionarias H9P49 y H1P46 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (Dilución 1:10) y se expusieron a un medio DMEM/F12 complementadas con 0,5 % FBS, 10-100 ng/ml de activina A (AA) y

100 nM de inhibidor IX GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA) o 20 ng/ml de Wnt-3a durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS, 10-100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los cultivos de control se trataron con suero bajo más 100 ng/ml de activina A. La **Figura 31** muestra la expresión de CXCR4 por FACS para H9P49 y H1P46 el día 5 con a) 10 ng/ml activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los primeros dos días, b) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días c) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días d) 10 ng/ml de activina A los cinco días más 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días, e) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días, y f) 10 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días. La **Figura 31 paneles a-d** se refiere a las células H9P49 y los **paneles e-f** se refieren a las células H1P46. La **Figura 32** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos para cultivos de H9P49 tratados con 10, 50 o 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a: **panel a**: expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (oct-4) y **panel b**: SOX-17 y GATA4, que no suman. Parece ser un problema con las cifras o podría ser un problema derivado de cortar y pegar. Parece que la expresión sólida de los marcadores endodérmicos sólidos puede obtenerse usando 50 ng/ml de AA + 20 ng/ml de Wnt-3A o inhibidor 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B. Las dosis más bajas de activina A provocan la formación de endodermo extraembrionario.

Referencia: Ejemplo 21

Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a combinación (DE)- de endodermo definitivo de Wnt-3a e inhibidor GSK-3B

Las células madre embrionarias H9P53 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) y 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA), +/- 20 ng/ml de Wnt-3a durante dos días seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS, 10-100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Paralelamente, los cultivos de H9P53 se trataron con 25 ng/ml de PMP-4 (Catálogo# 314-PB-010, R&D Systems, MN) +/- 20 ng/ml de Wnt-3A +/- 100 ng/ml de activina A. Los cultivos de control se trataron con suero bajo más 100 ng/ml de activina A. La **Figura 33** muestra la expresión de CXCR4 por FACS el día 5 con a) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los dos primeros días y 25 ng/ml de BMP-4 los días 3-5, b) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A los primeros dos días c) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días d) 20 ng/ml de Wnt-3a + 25 ng/ml de BMP-4 los cinco días, e) 100 ng/ml de activina A los cinco días más 20 ng/ml de Wnt-3A + 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B los dos primeros días y f) 100 ng/ml de activina A + 25 ng/ml de BMP-4 los cinco días. La **Figura 34** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos, como viene determinado por PCR en tiempo real para los cultivos de la línea H1 de células madre embrionarias humanas en el pasaje 46, tratado con 10 o 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3a o 100 nM de inhibidor de GSK-3B: panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC y POU5F (Oct-4) y panel (b): SOX-17, HNF-3B y GATA4. Los resultados se expresan en forma de aumento a respecto de las células no tratadas. La **Figura 35** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos, como determina el PCR en tiempo real para los cultivos de la línea H9 de células madre embrionarias en el pasaje 49, tratado con 50 o 100 ng/ml de activina A más 10 o 100 nM de inhibidor de GSK-3B: panel (a): expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y POU5F (Oct-4) y panel (b): SOX-17 y GATA4. Los resultados se expresan en forma de aumento a respecto de las células no tratadas. La **Figura 36** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos para el cultivo de H9P53 tratado con combinaciones de activina A, Wnt-3a, inhibidor de GSK-3 y BMP-4: a) expresión de AFP, Bry, CXCR4, GSC, HNF-3B y SOX7 y b) SOX-17, HNF-3B y GATA4. La adición de BMP-4 al protocolo DE parece inducir la formación de marcador mesodérmico BRY y la combinación de Wnt-3A e inhibidor GSK-4B no produce un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos en comparación con la adición de cada agente por sí mismo en presencia de activina A.

Referencia: Ejemplo 22

Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en MEFs a combinación de endodermo definitivo (DE)- de Wnt-3a, Activina A, Wnt-5a, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, IL-4 y SDF-1 en suero bajo

Las células H9P44 se prensaron en 6 placas previamente recubiertas con fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina (MEF). Las células se cultivaron hasta confluencia de 70 a 80 % en un medio de célula ES que consiste en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) complementado con 20 % de sustitución de suero desactivado, 100 nM MEM de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM de beta-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina (todos a partir de Invitrogen/GIBCO) y 8 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico humano (bFGF) (R&D Systems).

Para la formación de DE, se trataron células en presencia o ausencia de Activina A (100 ng/ml) además de otros factores de crecimiento que se detallan a continuación. Se añadieron factores de crecimiento a la concentración en aumento de FBS paso a paso de la forma que se indica a continuación:

Día 0: 0 % FBS en DMEM/F12

Día 1: 0,5 % FBS en DMEM/F12

Día 2: 2 % FBS en DMEM/F12

Día 3: Las células se recogieron para análisis FACS y RT-PCR.

Todos los factores de crecimiento se adquirieron a R&D Systems, MN. A continuación se muestra una descripción y concentración detallada de los factores de crecimiento para cada uno de los grupos de tratamiento:

- 5 1. Control – no se ha añadido factor de crecimiento
2. Activina A (100 ng/ml)
3. Activina A (100 ng/ml) + Wnt-3a (10 ng/ml) + Wnt5a (10 ng/ml)
4. Activina A (100 ng/ml) + Wnt-3a (10 ng/ml) + Wnt5a (10 ng/ml) + BMP2 (100 ng/ml)
- 10 5. Activina A (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml)
6. Activina A (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml)
7. Activina A (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
8. Activina A (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
9. IL-4 (10 ng/ml)
10. SDF1a (20 ng/ml)
- 15 11. Activina A (100 ng/ml) + IL-4 (10 ng/ml) + SDF1a (20 ng/ml)
12. BMP2 (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
13. Activina A (100 ng/ml) BMP-2 (100 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml) + BMP-6 (100 ng/ml) + BMP-7 (100 ng/ml)
14. Activina A (100 ng/ml) + IL-4 (10 ng/ml)
15. Activina A (100 ng/ml) + SDF1a (20 ng/ml)
- 20 16. Activina A (100 ng/ml) + Wnt-3a (10 ng/ml) + Wnt-5a (10 ng/ml) + Wnt-7a (10 ng/ml)
17. Activina A (100 ng/ml) + IL-4 (10 ng/ml) + SDF1a (20 ng/ml) + BMP-4 (100 ng/ml)

Resultados:

- 25 Las células se recogieron el Día 3 del tratamiento con protocolo DE. Para su análisis, se usó una parte alícuota de células tratadas para la preparación de ARN para RT-PCR y el resto de las células se usó para análisis por FACS. La frecuencia (%) de CXCR4 se muestra en la **Figura 37**. La adición de los sistemas de crecimiento anteriores no mejoró la expresión del tratamiento anterior por CXCR4 con 100 ng/ml AA en suero bajo.
- 30 Para el análisis por RT-PCR, las células se analizaron para la expresión de un panel seleccionado de marcadores endodérmicos definitivos. Los resultados que se muestran se calibraron sobre células que crecieron en el medio base pero no se trataron con Activina A o cualquier otro de los factores de crecimiento. De acuerdo con los datos FACS, la **Tabla V** muestra que no ha habido un aumento significativo de los marcadores endodérmicos definitivos por adición de factores de crecimiento, como Wnt-3A a cultivos tratados con una alta dosis de activina A en suero bajo. Contrasta con los ejemplos previos, que muestran un aumento significativo de los marcadores DE para células ES cultivadas en condiciones sin distribuidor en presencia de activina A, WNT3A y suero bajo.

Referencia: Ejemplo 23

- 40 **Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ o fibronectina humana a endodermo definitivo (DE)**

- 45 Las células H9P55 se cultivaron y diferenciaron en fibronectina humana o factor de crecimiento normal MATRIGEL™ (BD Biosciences). Se añadió 1 ml de DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) con 1 ug/ml de fibronectina humana (R&D Systems, MN) a cada recipiente de cada 6 placas de cultivo de tejido tratado. De forma alternativa, el factor de crecimiento MATRIGEL™ normal se diluyó 1:10 en DMEM/F12 y se añadió 1 ml de MATRIGEL™ diluido a cada recipiente de 6 placas de cultivo de cultivo de tejido tratado. Las células se pasaron con colagenasa. Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se trataron de la siguiente manera: 2 días de 0,5 % de FBS con 10 ng/ml de Wnt3a (R&D) recombinante de ratón y 100 ng/ml de Activina A (R&D). A continuación, 3 días de 2 % de FBS más
- 50 100 ng/ml de Activina A. La **Figura 38, paneles a-b** muestran la expresión de CXCR4 por células madre embrionarias cultivadas en fibronectina y MATRIGEL, respectivamente. Los resultados de PCR en tiempo real (**Figura 39**) confirman que la formación del endodermo definitivo fue equivalente en fibronectina y placas recubiertas de MATRIGEL™.

- 55 **Referencia: Ejemplo 24**

Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido con concentraciones variables de MATRIGEL™ a endodermo definitivo

- 60 Los cultivos de H9 a una confluencia de aproximadamente 60 a 70 % se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 20 ng/ml de Wnt-3a y 100 ng/ml de activina A durante 2 días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS, 20 ng/ml de Wnt-3a y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Las células H9 se cultivaron en placas recubiertas de MATRIGEL normal en una dilución de 1:60 a 1:10. Las placas se recubrieron con MATRIGEL durante 1 hora a temperatura ambiente.

65

Los resultados de PCR a tiempo real se muestran en la **Figura 40**. El tratamiento de células madre embrionarias con suero bajo, Activina A y Wnt3a llevó a la expresión de genes CXCR4, GATA4, Goosecoide, HNF-3beta y SOX-17, sugiriendo que las células se diferenciaban al estadio endodérmico definitivo. De todas formas, no parece que el recubrimiento de MATRIGEL™ juegue un papel importante en la diferenciación.

Referencia: Ejemplo 25

Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con matriz extracelular y en consecuencia cultivado en MEFS y diferenciado al papel de endodermo definitivo de Wnt-3a

Las células de la línea H9 de células madre embrionarias humanas cultivadas en MATRIGEL™ por lo menos cinco pasadas se cultivaron en distribuidores MEF en un medio ES. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60 al 70 % se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los grupos de tratamiento adicionales incluyen Wnt-3a a 20 ng/ml los cinco días + 10-100 ng/ml de activina A.

Los días 3 y 5, los cultivos se analizaron en PCR a tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (Bry), goosecoide (GSC), HNF-3 beta, GATA4, hTERT y Oct4. AFP y SOX-7 se ven como marcadores endodérmicos viscerales mientras que GATA4, HNF-3beta y SOX-17 representan los marcadores endodérmicos definitivos y GSC, Bry y CXCR4 representan marcadores de línea primitiva. hTERT y Oct-4 son marcadores para auto renovación y pluripotencia, respectivamente. Los resultados de PCR en tiempo real se muestran en la **Figura 41, paneles a-d**. El análisis por FACS también se llevó a cabo los días 3 y 5. Los niveles de expresión de CXCR-4 y CD9 se analizaron e informaron en la **Figura 41, panel e**.

En ausencia de Wnt3a, los niveles de expresión de AFP de las células cultivadas en 100 ng/ml de Activina A son similares a los vistos en los controles sin tratar. De todas formas, con la adición de Wnt3a a células cultivadas en 100 ng/ml de activina A, hay un aumento en la expresión de AFP que se incrementa con el tiempo. Cuando se usa una concentración más baja de Activina A, la expresión de AFP es muy alta, independientemente de la presencia de Wnt3a (**Figura 41, panel a**). Esto sugiere que es necesaria una alta concentración de Activina A para mantener la diferenciación de las células a tejidos extra-embrionarios.

Por análisis FACS, las células positivas CXCR4 tuvieron un rango de 32-42 % de la población de muestras tratadas con una alta concentración de Activina A pero no tratadas con Wnt3a en comparación con el 23-33 % de la población de muestras tratadas con una alta concentración de Activina A y Wnt3a el día 3 (**Figura 41, panel e**). Para el día 5 de tratamiento, el 28-32 % de las células tratadas con una alta concentración de activina A pero no tratadas con CXCR4 de expresión de Wnt-3a en comparación con el 43-51 % de las células tratadas con una alta concentración de Activina A y Wnt3a (**Figura 41, panel f**). En las células tratadas con una baja concentración de Activina A, ha habido más células positivas CXCR4 en el grupo de tratamiento sin Wnt3a (de 11 a 20 %) en comparación con el grupo tratado con Wnt-3a (de 3 a 4 %) (**Figura 41, panel g**). En general, Wnt-3a no parece tener un papel significativo en la diferenciación de células madre embrionarias, cultivadas en MEFS, al endodermo definitivo. Esto sugiere que la capa de distribuidor probablemente segrega una cantidad suficiente de Wnt-3a o de ligando análogo para mejorar la formación de endodermo definitivo inducido por activina A.

Referencia: Ejemplo 26

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con matriz extracelular a endodermo definitivo seguido de tratamiento con un inhibidor Wnt DKK-1

Para determinar si la adición de Wnt-3a ha provocado el aumento de la diferenciación, se añadió un inhibidor de la señalización de Wnt-3 a los cultivos. Se expusieron cultivos de H9 a una confluencia de aproximadamente 60 a 70 % a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 20 ng/ml de Wnt3a, 100 ng/ml de Dkkopf-1 (Dkk-1) y 100 ng/ml de activina A durante dos días y a continuación tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Las células H9 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL de factor de crecimiento reducido a una dilución de 1:30. Las placas se recubrieron con MATRIGEL durante 1 hora a temperatura ambiente.

El día 5, los cultivos se analizaron con PCR a tiempo real para SOX-17, SOX-7, proteína Alfa-fetal (AFP), CXCR4, Briquiuro (Bry), goosecoide (GSC), HNF-3 beta, GATA4, hTERT y Oct4. AFP y SOX-7 se ven como marcadores endodérmicos viscerales mientras que GATA4, HNF-3beta y SOX-17 representan los marcadores endodérmicos definitivos y GSC, Bry y CXCR4 representa marcadores de línea primitiva. hTERT y Oct-4 son marcadores de auto renovación y pluripotencia, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 42.

En presencia de Wnt3a, las células expresan CXCR4, GATA4, HNF-3beta y SOX17, todos marcadores de endodermo definitivo. Los marcadores de formación de línea primitiva como goosecoide también se detectaron a

niveles más altos que los detectados en controles no tratados. Con la adición de DKK1, el nivel de expresión de los marcadores de diferenciación antes mencionados disminuye claramente a niveles similares a los de células no tratadas.

5 Referencia: Ejemplo 27

Tintado de inmunofluorescencia de marcadores DE para células madre embrionarias H9 cultivadas en sustrato cultivado de tejido recubierto con MATRIGEL y diferenciado en suero bajo más activina-a y +/- Wnt-3a

Los cultivos de las células H9 se tintaron de acuerdo con la Referencia del Ejemplo 10 para SOX-17, HNF-3B, GATA-4, N-cadherina y E-cadherina. Todos los núcleos se contra-tintaron con DAPI. 20 ng/mg Wnt-3a tuvo como resultado un número notablemente mayor de núcleos tintados positivos para SOX-17, HNF-3beta y GATA-4 en comparación con los cultivos diferenciados en ausencia de Wnt-3a. Además, la adición de Wnt-3a tuvo como resultado una pérdida significativa de expresión de e-cadherina y una expresión mejorada para N-cadherina (**Figura 43, panel a y Figura 43, panel B**).

Referencia: Ejemplo 28

Análisis por micromatriz de cambios en la expresión genética en las células madre embrionarias seguido de formación de endodermo definitivo sobre MEFS vs MATRIGEL™

El ARN total se aisló de los siguientes cultivos de células madre embrionarias usando un mini kit RNeasy (Qiagen): A) células H9P33 cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución de 1:30) y expuestas a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días; B) células H9P44 cultivadas en MEFs y expuestas a un medio DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de Activina A durante dos días, seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de Activina A otros tres días, y C) células H9P48 cultivadas en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y expuestas a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A más 20 ng/ml de Wnt-3A durante dos días, seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % e FBS y 100 ng/ml de Activina A (AA) otros tres días. Los controles para cada grupo incluyeron células prensadas en placas recubiertas con MATRIGEL y cultivadas en un medio condicionado por MEF o células prensadas en MEFs y cultivadas en un medio de ES. Todos los grupos contenían tres réplicas biológicas y cada réplica biológica se repitió en dos chips de genes separados.

La preparación e hibridación de las muestras y el análisis de las imágenes se llevó a cabo de acuerdo con la matriz del Genoma Humano Affymetrix U133 Plus 2.0. Tras la normalización y transformación logarítmica, se llevó a cabo el análisis de los datos usando software OmniViz® y GENESIFTER (VizX Labs, WA). Se evaluaron diferencias significativas en la expresión genética entre las muestras usando un análisis de la variación y un test F con valor P ajustado (corrección de Benjamini y Hochberg) de $\leq 0,05$. Solo se incluyeron en el análisis genes presentes en por lo menos un grupo. La **Tabla VI** relaciona la intensidad de la señal normalizada transformada logarítmicamente de los genes que muestran por lo menos una diferencia de 5 entre el grupo A, grupo B y grupo C junto con el valor P ajustado para cada gen.

Referencia: Ejemplo 29

Diferenciación de línea ES cultivada en sustrato de cultivo de tejido SA002 recubierta con MATRIGEL™ a endodermo definitivo

Las células SA002 (Cellartis, Suecia) cultivadas previamente por lo menos tres pasadas en placas recubiertas con MATRIGEL (dilución 1:30) en MEF-CM complementadas con 8 ng/ml de bFGF se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) +/- 20 ng/ml de Wnt-3a o 100 nm GSK-3B inhibidor IX durante dos días, seguido de tratamiento con medio DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los resultados de PCR en tiempo real se muestran en la **Figura 44, paneles a & b**. Similar a las líneas H1, H7 y H9, la línea SA002 también necesitó de la adición de Wnt-3A para la expresión sólida de marcadores DE. La expresión de CXCR4 se muestra en la **Figura 45: a) tratamiento de AA b) AA + Wnt-3a c) AA + inhibidor GSK-3B**.

Referencia: Ejemplo 30

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con suero humano a endodermo definitivo (DE)

Los cultivos de la línea de células madre embrionarias humanas H1 en el pasaje 55 se cultivaron y diferenciaron en placas recubiertas de suero humano (Sigma, #H1388, MO). Se añadió 0,5 ml de suero humano a cada recipiente de

las 6 placas tratadas con cultivo de tejido, se incubó a 1 hora a temperatura ambiente y se aspiró antes de añadir células madre embrionarias humanas. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 %, se trataron de la siguiente manera: 2 días 0,5 % de FBS con 10 nI/ml de Wnt3a (R&D) recombinante de ratón o 100 nM de inhibidor IX de GSK-3B (Catálogo # 361550, Calbiochem, CA) y 100 ng/l de Activina A (R&D). A continuación, 3 días de 2 % de FBS más 100 ng/ml de Activina A. Los cultivos se analizaron por PCR en tiempo real (**Figura 46, paneles a & b**). La expresión sólida de los marcadores de endodermo definitivo se anotaron para células tratadas con Activina A + inhibidor GSK-3B o Wnt-3A en comparación con células tratadas solo con activina A. Estas conclusiones son paralelas a las nuestras para células madre embrionarias humanas cultivadas en MATRIGEL™ o placas recubiertas de fibronectina humana.

Referencia: Ejemplo 31

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo (DE) – Evaluación de varios inhibidores de GSK-3B

La eficacia de varios inhibidores GSK-3B disponibles comercialmente se estudió en formación de DE a partir de células madre embrionarias humanas. Los siguientes inhibidores GSK-3B se evaluaron a 100 nM: inhibidor VIII de GSK-3B (Catálogo # 361549, Calbiochem, CA), GSK-3B inhibidor IX (Catálogo # 361550, Calbiochem, CA), inhibidor IX de GSK-3B (Catálogo# 361553, Calbiochem, CA), inhibidor XII GSK-3B (Catálogo# 361554, Calbiochem, CA). Las células H1P54 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) + /- varios inhibidores de GSK-3B durante dos días y a continuación tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. Los cultivos de control se trataron con suero bajo más una alta dosis de AA. La **Figura 47, paneles a y b** muestra la expresión genética de los marcadores endodérmicos definitivos el día 5. Los inhibidores IX y XI de GSK-3B fueron eficaces en la inducción de formación DE en comparación con inhibidores VIII y XII GSK-3B.

Referencia: Ejemplo 32

Formación de endodermo pancreático por células madre embrionarias humanas cultivadas en condiciones libres de distribuidor: evaluación de análogos de ácido retinoico

Las células madre embrionarias se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y expuestas a un medio de DMEM/F12 complementadas con 0,5 FBS, 20 ng/ml Wnt-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) y 100 ng/ml de activina A (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con medio de DMEM/F12 complementado con 2 % de FBS y 100 ng/ml de activina A (AA) otros tres días. El día 5, se recogieron las células para su evaluación por FACS y PCR en tiempo real. Como se ha indicado en ejemplos anteriores, este protocolo tuvo como resultado un aumento sólido de los marcadores endodérmicos definitivos, como CXCR4 y SOX-17. Las células endodérmicas definitivas resultantes el día 5 se expusieron a las siguientes situaciones para inducir la formación de endodermo pancreático: cultivo en medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 1 µM de ácido holo-trans-retinoico (RA) (Catálogo# R2625, Sigma, MO) o 0,1-10 µM AM-580 (4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilo-2-naftalenilo)carboxamido]ácido benzoico, Catálogo#A8843, Sigma, MO), o 0,1-1 µM TTNPB (4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilo-2-naftalenilo)-1-propenilo]ácido benzoico, ácido Arotinoide, Catálogo#T3757, Sigmam, MO) durante 3 días. AM-580 y TTNPB son análogos de ácido retinoico con afinidad para receptores de ácido retinoico. Tras el tratamiento por RA, siguió tres días más de tratamiento en medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 20-50 ng/ml bFGF (Catálogo#F0291, Sigma, MO). Los cultivos se recogieron y se obtuvieron muestras de mRNA para su análisis.

El análisis de la expresión genética reveló que (Figura 48, paneles a-d) la adición de 1 µM RA seguida de exposición a bFGF aumenta de forma significativa los marcadores endodérmicos pancreáticos, como PDX-1. Además, este protocolo tuvo como resultado la expresión robusta de marcadores del intestino delgado anterior, como CDX-2 y AFP. A una concentración de 1 µM, la adición de análogos de RA tuvo como resultado marcadores equivalentes para endodermo pancreático e intestino anterior. De todas formas, la adición de análogos de 1 µM RA tuvo como resultado una expresión de AFP más sólida en comparación con el ácido holo-trans-retinoico. De todas formas, la adición de 10 µM AM-580 suprimió la expresión de AFP y CDX-2 al mismo tiempo que mantuvo una alta expresión de PDX-1.

Referencia: Ejemplo 34

El efecto del tratamiento de Wnt-3a sobre la expresión de la citoquina en las células madre embrionarias humanas

El efecto que tiene el tratamiento de Wnt-3a sobre la expresión de la citoquina se analizó usando una matriz proteica. Se cultivaron células de la línea H9 de células madre embrionarias humanas de acuerdo con los métodos descritos en la **Referencia: Ejemplo 15**. En el pasaje 54, las células se diferenciaron en presencia de 100 ng/ml de Activina A +/- 10 ng/ml Wnt3a durante 2 días en 0,5 % FBS DMEM/F12. Posteriormente, las células se cultivaron tres

días más en 100 ng/ml de Activina A y 2 % de FBS DMEM/F12. Al final del día 5, la expresión de CXCR4 se determinó por FACS para cada uno de los grupos de tratamiento. Las células tratadas con Activina A solo tuvieron un 1 % de células que expresasen CXCR4. Las células tratadas con Activina A y Wnt3 tuvieron un 73 % de células positivas para expresión de CXCR4.

Los lisados celulares se prepararon a partir de células de cada uno de los grupos de tratamiento con un kit de lisado celular de mamíferos (Sigma-Aldrich, MO). Los medios condicionados para cada grupo de tratamiento se recogieron y concentraron. El análisis de matriz de citoquina se completó usando paneles de Matriz de Citoquina proporcionados por RayBiotech, GA (<http://www.raybiotech.com/>). La **Tabla VII** relaciona citoquina, factor de crecimiento y la expresión de receptores que sigue a la normalización de los datos y la sustracción del fondo. Para cada uno de los paneles, también se incluyen controles positivo y negativo. Los datos son dos muestras independientes para cada grupo de tratamiento celular (1,2).

En los medios condicionados de células tratadas Wnt3 se percibe un claro aumento de Antiogenina, IGFBP-1 y EGF. Numerosas proteínas aumentan en los lisados de células tratadas Wnt3a incluidos IGFBP-1, TGFbeta-1 y TGFbeta-3. Estas proteínas aumentadas pueden volver a añadirse a los medios de diferenciación para sustituir o mejorar los efectos de Wnt3a sobre la formación de endodermo definitivo.

Referencia: Ejemplo 35

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido recubierto con MATRIGEL™ a endodermo definitivo: papel del Wnt1

Las células H1P55 se cultivaron en placas recubiertas con MATRIGEL™ (dilución 1:30) y se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con 0,5 % de FBS, y 100 ng/ml de activina A +/- 10-20 ng/ml de WNT-1 (PeproTech, NJ, Catálogo#120-17) durante dos días seguido de tratamiento con un medio de DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS, 100 ng/ml de activina A (AA) y +/- de 10 o 20 ng/ml de WNT-1 otros tres días. Se experimentaron las siguientes combinaciones de WNT1 + AA:

a) 20 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 0,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2, seguido de 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA el día tres, b) 20 ng/ml de WNT + 100 ng/ml AA en 0,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA los días 3-5, c) 10 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 9,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA el día tres, d) 10 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 0,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de un 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA los días 3-5, e) 20 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 9,5 % de FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de un 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT1 el día tres, f) 20 ng/ml de WNT1 + 100 ng/ml AA en 9,5 % FBS + DM-F12 los días 1-2 seguido de un 2 % de FBS + DM-F12 + 100 ng/ml AA + 20 ng/ml de WNT1 los días 3-5. La **Figura 40, paneles a y b** muestra los datos de PCR a tiempo real para marcadores endodérmicos definitivos siguiendo el tratamiento de las células H1 con suero bajo, AA y Wnt-1. La adición de 20 ng/ml de Wnt1 en presencia de 100 ng/ml de AA tuvo como resultado un aumento significativo de marcadores endodérmicos definitivos (Bry, CXCR4, GSC, SOX17, HNF-3B y GATA-4).

Referencia: Ejemplo 36

Diferenciación de células madre embrionarias humanas cultivadas en sustrato de cultivo de tejido a endodermo definitivo en medios definidos

Las células madre embrionarias H1 cultivadas en condiciones hipóxicas (aproximadamente un 3 % de O₂) y prensadas en placas recubiertas de MATRIGEL™ (dilución 1:30) se cultivaron en un medio condicionado por MEF a aproximadamente una confluencia entre el 60 y el 70 % y a continuación se expusieron a un medio de DMEM/F12 complementado con un 0,5 % FBS, 20 ng/ml de WNT-3a (Catálogo# 1324-WN-002, R&D Systems, MN) y 100 ng/ml de Activina-A (R&D Systems, MN) durante dos días, seguido de tratamiento con un medio DMEM/F12 complementado con un 2 % de FBS y 100 ng/ml de Activina-A (AA) 3 o 4 días más. Paralelamente, las células H1 cultivadas en MATRIGEL se expusieron a DMEM-F12 o DMEM-LG complementado con 0,5-1 % B27 (Invitrogen, Ca) + 20 ng/ml WNT-3a + 100 ng/ml de Activina-A +/- inhibidor IX GSK-3B (Catálogo# 361550, Calbiochem, CA) durante 4-5 días. En algunas culturas, se usó un suplemento 1%N2 (Invitrogen, Ca) en lugar de un 1 % de B27.

Además, las líneas celulares aisladas de la línea H9 ES parental denominadas células "EXPRES" (Células expansibles de línea pre-primitiva) también se expusieron a la misma formulación de medio descrita antes para inducir la formación de endodermo definitivo (DE). Las propiedades de las células EXPRES se han descrito previamente en la solicitud de los EE. UU. 60/913.475. Finalmente, las células de la línea BGO1V obtenida a partir de Invitrogen y cultivada en placas recubiertas de MATRIGEL en un medio condicionado por MEF + 8 ng/ml bFGF, se expusieron a los medios de diferenciación antes mencionados para inducir la formación de DE. La **Figura 50** muestra la expresión de CXCR4 y CD4 por medio de FACS el día 4-5 para líneas celulares EXPRES01, BGO1V y H1 P50 expuestas a medios de diferenciación definida o medios de diferenciación basados en suero bajo. Para todas las líneas testadas, la expresión de CXCR4 fue equivalente cuando se usó el medio definido basado en

suplemento 1 % B27 en oposición a medio basado en FBS. Además, el suplemento de 1 % N2 no pudo inducir la formación de DE, probablemente debido a una alta concentración de insulina (8,6 μ M) en el suplemento N2. La **Figura 51** muestra los datos de PCR a tiempo real para cultivos EXPRES01, BGO1V y H1 tratados con suero bajo o medio definido + AA + WNT3A los días 4-5. Este protocolo tuvo como resultado un aumento significativo de los marcadores DE. La **Figura 52** muestra imágenes de inmunofluorescencia de células EXPRES 01 P49 diferenciadas en DE usando un 1 % de b27 + DM-F12 + Activina-A + WNT3A + inhibidor de GSK03B durante cinco días. La mayoría de las células tinte positivo para GATA-4, SOX-17 y HNF-3B y una minoría de células tinte en positivo para OCT-4, SOX-2 y Nanog.

10 Referencia: Ejemplo 37

Diferenciación de células madre embrionarias cultivadas en MEFs a endodermo definitivo en medio definido

15 Las células H1 se prensaron en 6 placas previamente cultivadas con fibroblastos embrionarios de ratón tratado con mitomicina (MEF). Se hizo crecer las células hasta una confluencia del 70 al 80 % en medio de célula ES consistente en DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO) complementado con un 20 % de sustitución de suero desactivado, 100 nM MEM de aminoácidos no esenciales, 0,5 mM beta-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina (todo de Invitrogen/GIBCO) y 8 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico humano (bFGF) (R&D Systems).

20 Para la formación de DE, las células se trataron en presencia o ausencia de Activina-A (100 ng/ml), además de otros factores de crecimiento que se detallan más adelante. Los factores de crecimiento se añadieron para aumentar la concentración de FBS paso a paso como se indica en el siguiente patrón de tratamiento:

Día 0: 0 % FBS o 1 % de B27 en DMEM-LG o RPMI

Día 1: 0,5 % FBS o 1 % de B27 en DMEM/F12 o RPMI

25 Día 2-5: 2 % de FBS o 1 % B27 en DMEM/F12 o RPMI

De forma alternativa, las células se trataron en un medio HESGro (Chemicon, Ca) + 100 nM LY-Compuesto (EMD, CA) + 100 ng/ml de AA los días 1-5.

30 Las células se recogieron para análisis de FACS y RT-PCR los días 1-5. Todos los factores de crecimiento se adquirieron a R&D Sistemas, MN. La **Figura 53** muestra los datos de PCR en tiempo real para células H1 expuestas a bajo suero + Activina-A o medio definido + Activina-A los días 1-5. El cambio en los niveles de expresión se normaliza a los niveles del día 1.

35

40

45

50

55

60

65

TABLA IA: LISTA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA FACS Y ANÁLISIS DE INMUNO-TINTADO

Anticuerpo	Proveedor	Isotipo	Clon
SSEA-1	Chemicon (CA)	Ratón IgM	MC-480
SSEA-3	Chemicon (CA)	Ratón IgG3	MC-631
SSEA-4	Chemicon (CA)	IgM de Rata	MC-813-70
TRA 1-60	Chemicon (CA)	IgM de Ratón	TRA 1-60
TRA 1-81	Chemicon (CA)	IgM de Ratón	TRA 1-81
TRA 1-85	Chemicon (CA)	IgG1 de ratón	TRA 1-85
AP	R&D Systems	IgG1 de ratón	B4-78
HNF3 β	R&D Systems	IgG de cabra	
PDX1	Santa Cruz Biotechnology, INC	IgG de cabra	A-17
GATA4	R&D Systems	IgG de cabra	
Sox 17	R&D Systems	IgG de cabra	
CD9	BD	IgG1 de ratón	M-L 13

TABLA IB: LISTA DE ANTICUERPOS CONJUGADOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA FACS Y ANÁLISIS DE INMUNO-TINTADO

Anticuerpo conjugado secundario	Proveedor	Dilución
Cabra anti-ratón IgG Conjugado de APC	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
Cabra anti-ratón IgG Conjugado de PE	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
Mono anti-conejo conjugado de PE o -APC	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
Mono anti-cabra conjugado de PE o -APC	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
Cabra anti-ratón PE IgM	SouthernBiotech (AL)	1:200
Cabra anti-rata IgM PE	SouthernBiotech (AL)	1:200
Cabra anti-ratón IgG3 PE	SouthernBiotech (AL)	1:200

TABLA IIA: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN EL TIEMPO, TRAS TRATAMIENTO DE ACTIVINA A

	DÍA 0	DÍA 2	DÍA 5	DÍA 8
SSEA-3	98,67 %	92,14 %	42,9 %	22,05 %
CD9	92,64 %	29,42 %	7,27 %	4,1 %
ECAM	61,23 %	20,87 %	14,17 %	1,02 %
NCAM	7,33 %	5,04 %	21,1 %	8,86 %
CXCR4	8,53 %	20,2 %	55,26 %	56,92 %

TABLA IIB: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN EL TIEMPO, TRAS TRATAMIENTO POR ACTIVINA A

	Día 1		Día 3		Día 5	
	No tratada	AA 100 ng/ml	No tratada	AA 100 ng/ml	No tratada	AA 100 ng/ml
CXCR4+	13 %	6 %	7,6 %	38 %	3 %	65,5 %
CXCR4+ C-Kit+	5,32 %	2,97 %	2,9 %	31,56 %	3 %	55,21 %
CXCR4+ EPCAM+	11,5 %	14,58 %	5,26 %	36,67 %	3 %	54,5 %
CXCR4+ CD9+	12,27 %	8,13 %	2,72 %	24,11 %	3 %	2,1 %

TABLA IIC: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS EN EL TIEMPO, TRAS TRATAMIENTO POR ACTIVINA A

	Tramamiento de 5 días con AA
CXCR4+	92,78 %
CXCR4+C-kit+	92,90 %
CXCR4+/EPCAM	87,99 %
CXCR4+/CD99	88,78 %
CXCR4+/CD9	7,03 %

TABLA III: PERFIL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA PARA CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS USADAS EN LA PRESENTE INVENCION

Marcador	H9		
	FACS	RT-PCR	Tintado
OCT3/4		+	+
SOX-2		+	
UTF-1		+	
REX-1		+	
HTERT		+	
Cx 43		+	
Cx 45		+	
ABCG-2		+	
SSEA-1	± (36,35 %)		
SSEA-3	+ (94,38 %)		+
SSEA-4	+ (98,77 %)		+
TRA-1-81	+ (85,85 %)		+
TRA-1-60	+ (78,14 %)		+
TRA-1-85	+ (95,96 %)		
CD9	+ (92,02 %)		
AP	+ (99 %)		+

TABLA IV: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES ENTRE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS INDIFERENCIADAS Y CÉLULAS DE ESTÁGIO ENDODERMICAS DEFINITIVAS CULTIVADAS EN MATRIGELTM O FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN DESPUES DE 5 DÍAS DE TRATAMIENTO

	Identificador de gen	Título del Gen	ID de Gen	H9P83 en Madrigel	SEM	Fase H9P83 en Madrigel DE	SEM	H9P44 en MEFs	SEM	Fase H9P44 en Madrigel DE	SEM
5											
10											
15	D87811	Homo sapiens mRNA for GATA-6, complete cds.	GATA6	-2.12	0.19	2.82	2.20	-2.56	0.46	5.34	1.79
20		/PROD=GAT									
25		A-6									
30		/FL=gb:U66075.1									
		gb:NM_005257.1									
		gb:D87811.1									
35	AW157548	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	-3.28	0.17	3.31	2.11	-3.78	0.36	5.35	2.00
40		/FL=gb:M65062.1									
		gb:M62782.1									
		gb:NM_000599.1									
45		gb:AF055033.1									
50	NM_001898	Homo sapiens cystatin SN (CST1), mRNA.	CST4	-2.15	1.26	2.54	1.95	-2.71	0.98	4.64	1.63
55		/PROD=cystatin SN									
		/FL=gb:J03870.1									
60		gb:NM_001898.1									
	AK000680	Homo sapiens cDNA	PAG1	-2.87	0.91	1.61	0.22	-4.08	0.50	1.68	0.10
65											

5		FLJ20673										
		fis, clone										
		KAlA4464.										
		/FL=gb:AF24										
		0634.1										
10	NM_022642	gb:NM_0184										
		40.1										
		Homo	-	-2.24	0.12	2.97	0.42	-3.78	0.07	2.51	0.44	
		sapiens										
		chorionic										
15		somatomam										
		motropin										
		hormone 1										
		(placental										
20		lactogen)										
		(CSH1),										
		transcript										
		variant 4,										
25		mRNA.										
		/PROD=chori										
		onic										
		somatomam										
30		motropin										
		hormone 1,										
		isoform4										
		/FL=gb:NM_										
35	NM_001317	022642.1										
		Homo	CSH1	-2.95	0.57	2.69	0.36	-4.04	0.51	1.86	0.68	
		sapiens										
		chorionic										
40		somatomam										
		motropin										
		hormone 1										
		(placental										
45		lactogen)										
		(CSH1),										
		transcript										
		variant 1,										
50		mRNA.										
		/PROD=chori										
		onic										
		somatomam										
55		motropin										
		hormone 1,										
		isoform										
		1precursor										
60		/FL=gb:NM_										
		001317.2										
		gb:J00118.1										
65												

5	BC005921	Homo sapiens, chorionic somatomamotropin hormone 1 (placental lactogen), clone MGC:14518, mRNA, complete cds.	CSH1	-2.26	0.09	3.26	0.23	-2.96	0.37	2.58	0.45
		/PROD=chorionic somatomamotropin hormone 1 (placentallactogen)									
		/FL=gb:BC005921.1									
10											
15											
20											
25											
30	AI796169	GATA-binding protein 3 /FL=gb:NM_002051.1 gb:M69106.1 gb:BC003070.1	GATA3	-4.45	0.10	0.24	1.30	-4.72	0.13	0.80	2.05
35											
40	NM_020991	Homo sapiens chorionic somatomamotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 1, mRNA.	CSH1	-1.27	0.48	3.19	0.23	-2.91	0.35	2.62	0.54
45		/PROD=chorionic somatomamotropin hormone 2, isoform 1precursor									
50		/FL=gb:NM_020991.2									
55											
60											
65											

		gb:BC00271									
		7.1									
5	NM_021827	Homo sapiens hypothetical protein FLJ23514 (FLJ23514), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ23514 /FL=gb:NM_021827.1	CCDC81	-0.37	0.35	3.16	2.05	-2.02	1.27	5.25	1.98
10											
15											
20	AB028021	Cluster Incl. AB028021:Homo sapiens HNF-3beta mRNA for hepatocyte nuclear factor-3 beta, complete cds /cds=(196,1569) /gb=AB028021 /gi=4958949 /ug=Hs.155651 /len=1944	FOXA2	-2.97	0.25	0.59	3.25	-3.43	0.57	4.12	2.57
25											
30											
35											
40											
45	NM_002521	Homo sapiens natriuretic peptide precursor B (NPPB), mRNA. /PROD=natriuretic peptide precursor B /FL=gb:NM_002521.1 gb:M25296.1	NPPB	1.54	0.11	5.47	1.17	-0.15	0.38	6.24	1.23
50											
55											
60	AA352113	ESTs	ST8SIA4	-4.01	1.24	-0.99	2.04	-4.79	1.00	1.05	1.62
65	BM128432	Homo sapiens full length insert	IGFBP5	-2.73	1.11	2.31	2.30	-3.48	0.56	4.45	2.02

cDNA clone											
YA81B05											
5	NM_002770	Homo	PRSS1	-2.77	0.33	1.59	2.68	-3.13	0.48	3.88	2.95
		sapiens									
		protease,									
10		serine, 2									
		(trypsin 2)									
		(PRSS2),									
		mRNA.									
15		/PROD=prot									
		ease, serine,									
		2 (trypsin 2)									
		/FL=gb:M276									
20		02.1									
		gb:NM_0027									
		70.1									
25	NM_022579	Homo	CSH1	-1.58	0.91	2.48	0.38	-3.33	0.13	1.77	0.49
		sapiens									
		chorionic									
		somatomam									
		motropin									
30		hormone-like									
		1 (CSHL1),									
		transcript									
35		variant 3,									
		mRNA.									
		/PROD=chori									
		onic									
40		somatomam									
		motropin									
		hormone-like									
		1, isoform 3									
45		precursor									
		/FL=gb:NM_									
		022579.1									
50	NM_005454	Homo	CER1	2.82	0.09	5.78	1.04	1.48	0.05	6.74	1.18
		sapiens									
		cerberus 1									
		(Xenopus									
		laevis)									
55		homolog									
		(cysteine									
		knot									
		superfamily)									
60		(CER1),									
		mRNA.									
		/PROD=cerb									
		erus 1									
65		/FL=gb:NM_									

5	NM_022645	005454.1	CSH1	-2.30	0.33	2.95	0.31	-2.78	0.24	2.45	0.34
		Homo sapiens									
		chorionic somatomam									
10		motropin									
		hormone 2									
		(CSH2),									
15		transcript									
		variant 3,									
		mRNA.									
20		/PROD=chori									
		onic									
		somatomam									
25		motropin									
		hormone 2,									
		isoform									
30	AI821586	3precursor	LOC440981	-3.22	0.97	0.66	3.19	-2.97	0.13	4.22	2.76
		/FL=gb:NM_									
		022645.1									
35		ESTs,									
		Moderately									
		similar to									
40	AL121722	JE0284 Mm-		-2.95	0.36	-0.01	2.69	-3.43	0.38	2.95	2.66
		1 cell derived									
		transplantabi									
45		lity-									
		associated									
		protein 1b									
50		(H.sapiens)									
		Human DNA -									
		sequence									
55		from clone									
		RP4-788L20									
		on									
60		chromosome									
		20 Contains									
		the HNF3B									
65	NM_001311	(hepatocyte	CRIP1	1.66	0.17	1.90	0.07	-2.96	0.66	1.80	0.24
		nuclear									
		factor 3,									
		beta) gene. a									
		novel gene									
		based on									
		ESTs, ESTs,									
		STSs, GSSs									
		and CpG									
		Islands									

5	sapiens	cysteine-rich	protein 1	(intestinal)	(CRIP1),	mRNA.						
10	/PROD=cyst	eine-rich	protein 1	(intestinal)	/FL=gb:U586	30.1						
15	gb:BC00273	8.1	gb:NM_0013	11.1	gb:U09770.1							
20	AY177407	Homo	GSC	-4.59	0.18	-1.08	2.89	-4.64	0.06	1.89	2.79	
25	sapiens	homeobox	protein	goosecoid	mRNA,	complete	cds.	/PROD=hom	eobox	protein	goosecoid	/FL=gb:AY17
30	7407.1	gb:NM_1738	49.1	NM_005442	Homo	EOMES	-0.16	0.29	2.89	1.70	0.13	0.16
35	sapiens	eomesoderm	in (Xenopus	laevis)	homolog	(EOMES),	mRNA.	/PROD=eom	esodermin	(Xenopus	laevis)	homolog
40	/FL=gb:AB03	1038.1	gb:NM_0054									
45												
50												
55												
60												
65												

5	L01639	42.1 Human (clone HSY3RR) neuropeptide Y receptor (NPYR) mRNA, complete cds. /PROD=neur opeptide Y receptor /FL=gb:L067 97.1 gb:NM_0034 67.1 gb:AF02537 5.1 gb:AF14720 4.1 gb:M99293.1 gb:L01639.1	CXCR4	0.64	0.26	3.71	1.78	-0.16	0.50	5.48	1.77
10											
15											
20											
25											
30											
35	NM_022646	Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 4, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone 2, isoform4 /FL=gb:NM_022646.1	-	-1.57	0.60	2.67	0.26	-1.88	0.98	2.22	0.35
40											
45											
50											
55	AW007532	Human insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) mRNA	IGFBP5	0.31	0.25	4.59	1.53	0.72	0.09	6.19	1.58
60											
65	NM_002160	Homo	TNC	-0.24	0.29	2.23	0.80	-0.81	0.81	2.85	0.82

5		sapiens									
		hexabrachio									
		n (tenascin									
		C, cytactin)									
		(HXB),									
10		mRNA.									
		/PROD=hexa									
		brachion									
		(tenascin C,									
15		cytolactin)									
		/FL=gb:M556									
		18.1									
		gb:NM_0021									
20	AA149250	ESTs,	LOC645638	1.27	0.61	4.23	1.26	-0.64	0.40	2.47	1.23
		Weakly									
		similar to									
25		WDNM RAT									
		WDNM1									
		PROTEIN									
		PRECURSO									
30		R									
		(R.norvegicu									
		s)									
	AW977527	ESTs	-	-0.91	0.99	1.18	0.68	-2.52	1.01	1.59	0.64
35	NM_022454	Homo	SOX17	-1.01	0.33	2.29	2.08	-0.14	0.15	4.60	1.73
		sapiens									
		hypothetical									
40		protein									
		FLJ22252									
		similar to									
		SRY-box									
45		containing									
		gene 17									
		(FLJ22252),									
		mRNA.									
50		/PROD=hypo									
		thetical									
		protein									
		FLJ22252									
55		similar to									
		SRY-									
		boxcontainin									
		g gene 17									
60		/FL=gb:NM_									
		022454.1									
	AI640307	protocadheri	PCDH10	-1.89	1.37	1.53	1.32	-1.33	0.38	2.99	1.19
		n 10									
65	AJ224869	Homo	-	0.98	0.18	4.22	1.88	1.34	0.17	6.36	1.49

5		sapiens CXCR4 gene encoding receptor CXCR4									
10	AI824037	ESTs, Weakly similar to FCE2 MOUSE LOW AFFINITY IMMUNOGL OBULIN EPSILON FC RECEPTOR (M.musculus)	FREM1	-1.42	0.36	1.22	1.95	-1.37	0.61	3.48	1.49
15											
20											
25	BE222344	splicing factor, arginineserin e-rich 5	-	0.50	0.05	3.01	0.93	-0.94	1.18	4.27	0.94
30											
35	NM_001643	Homo sapiens apolipoprotei n A-II (APOA2), mRNA. /PROD=apoli poprotein A- II precursor /FL=gb:M298 82.1 gb:NM_0016 43.1 gb:BC00528 2.1	APOA2	-2.25	1.05	1.72	2.60	-1.20	0.44	4.47	2.42
40											
45											
50	AI821669	ESTs	-	-0.94	0.79	1.71	2.19	-0.89	0.21	3.91	1.94
55	NM_002608	Homo sapiens platelet- derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis)	PDGFB	-0.23	0.82	1.87	0.15	-2.27	0.65	1.92	0.13
60											
65											

5	oncogene homolog) (PDGFB), mRNA. /PROD=plate let-derived growth factor beta polypeptide(simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog) /FL=gb:M127 83.1 gb:NM_002									
25	AW444761 ESTs CDKN2B -3.35 0.90 0.39 0.52 -3.11 0.88 0.80 0.25									
	BF223214 ESTs - -0.48 0.08 1.69 2.04 -1.51 0.25 4.09 1.98									
	AF154054 Homo GREM1 1.68 0.26 4.61 0.74 0.62 0.04 3.58 0.87									
30	sapiens DRM (DRM) mRNA, complete ods. /PROD=DR M /FL=gb:NM_ 013372.1 gb:AF11013 7.2 gb:AF04580 0.1 gb:AF15405 4.1									
45	NM_021223 Homo MYL7 1.81 0.05 4.28 0.81 0.17 0.08 4.87 0.96									
50	sapiens myosin light chain 2a (LOC58498), mRNA. /PROD=myo sin light chain 2a /FL=gb:NM_ 021223.1									
60	AI817041 G protein- CMKOR1 -0.19 0.27 2.67 1.97 0.06 0.18 5.05 1.64									
65	coupled receptor									

	NM_003670	Homo sapiens basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (BHLHB2), mRNA. /PROD=differe	BHLHB2	1.09	0.08	3.85	0.10	-0.11	0.17	3.46	0.03
5											
10											
15											
20											
25	NM_023915	Homo sapiens G protein-coupled receptor 87 (GPR87), mRNA. /PROD=G	GPR87	-1.70	0.61	1.64	0.18	-2.99	0.06	1.40	0.23
30											
35											
40											
45	NM_003867	Homo sapiens fibroblast growth factor 17 (FGF17), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 17	FGF17	-3.05	0.39	0.03	2.07	-2.13	0.41	2.49	1.35
50											
55											
60	NM_024426	Homo sapiens	WT1	-3.23	0.37	-1.11	0.62	-4.20	0.56	-2.44	1.26

65

5		Wilms tumor 1 (WT1), transcript variant D, mRNA. /PROD=Wilms tumor 1 isoform D /FL=gb:NM_024424.1 gb:NM_024426.1									
10	NM_033136	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 2, mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 1 (acidic) isoform 2precursor /FL=gb:NM_033137.1 gb:NM_033136.1	FGF1	-3.10	1.42	0.09	0.83	-3.16	0.63	-0.78	1.21
20											
25											
30											
35											
40	X99268	H.sapiens mRNA for B-HLH DNA binding protein. /PROD=B-HLH DNA binding protein /FL=gb:NM_000474.1	TWIST1	0.10	0.33	3.94	0.24	0.34	0.22	3.45	0.34
45											
50											
55	AL524520	G protein-coupled receptor 49	LGR5	-2.27	1.43	0.76	1.40	-1.58	0.40	2.51	1.35
60	NM_022557	Homo sapiens growth hormone 2	CSH1	-0.91	0.19	1.40	0.22	-2.12	0.08	1.47	0.14
65											

5	(GH2), transcript variant 2, mRNA. /PROD=growth hormone 2, isoform 2 precursor /FL=gb:J037 56.1									
10	gb:NM_0225 57.1									
15	AL544576 ESTs TMEM88 -1.96 0.68 1.75 0.58 -1.45 0.86 2.08 0.70									
20	NM_022580 Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone-like 1 (CSHL1), transcript variant 4, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone-like 1, isoform 4 /FL=gb:NM_022580.1	CSH1	-1.20	0.86	2.30	0.39	-1.78	0.64	1.55	0.63
25										
30										
35										
40	J03580 Human, parathyroid-like protein (associated with humoral hypercalcemia of malignancy) mRNA, complete cds. /FL=gb:J03580.1	PTH1H	-2.72	0.33	-0.80	0.40	-4.05	0.41	-1.42	0.73
45										
50										
55										
60	BC029835 Homo sapiens, clone IMAGE:5169759, mRNA.	LOC646867	-2.66	1.12	1.01	1.85	-1.40	0.41	3.03	1.61
65										

ES 2 537 578 T3

	AI452798	ESTs	MYOCD	0.98	0.13	3.31	0.66	-0.07	0.28	2.80	0.98
	NM_022559	Homo sapiens growth hormone 1 (GH1), transcript variant 2, mRNA. /PROD=growth hormone 1, isoform 2 precursor /FL=gb:NM_022559.1	CSH1	-1.56	0.38	2.00	0.32	-2.07	0.42	1.47	0.28
5											
10											
15											
20	NM_001318	Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone-like 1 (CSHL1), transcript variant 1, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone-like 1, isoform 1 /FL=gb:NM_001318.2	CSH1	0.15	0.41	2.83	0.40	-1.30	0.34	2.37	0.50
25											
30											
35											
40											
45	M65062	Human insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5) mRNA, complete cds. /PROD=insulin-like growth factor binding protein 5 /FL=gb:M65062.1	IGFBP5	-2.80	1.17	2.19	2.00	-0.99	0.23	4.11	1.81
50											
55											
60											
65											

5	gb:M62782.1										
	gb:NM_000599.1										
10	gb:AF055033.1										
	AF207990	Homo sapiens fer-1 like protein 3 (FER1L3) mRNA, complete cds.	FER1L3	0.49	0.40	3.00	0.81	-0.16	0.09	4.02	0.92
15	/PROD=fer-1 like protein 3										
	/FL=gb:AF207990.1										
20	AI079944	ESTs	-	-0.78	0.22	0.08	0.59	-3.56	0.24	-0.13	0.73
	BC003070	Homo sapiens, GATA-binding protein 3, clone MGC:2346, mRNA, complete cds.	GATA3	1.07	0.04	3.23	0.96	0.31	0.26	4.45	0.80
25	/PROD=GATA3-binding protein 3										
	/FL=gb:NM_002051.1										
30	gb:M69106.1										
	gb:BC003070.1										
35	BE877796	collagen, type VIII, alpha 1	COL8A1	-3.76	1.17	-1.28	0.73	-4.89	0.54	-1.33	1.64
	/FL=gb:NM_001850.1										
40	gb:M69106.1										
	gb:BC003070.1										
45	NM_022560	Homo sapiens growth hormone 1 (GH1), transcript variant 3, mRNA.	CSH1	-2.23	0.74	1.95	0.08	-2.01	0.51	1.47	0.31
	/PROD=growth hormone 1 (GH1), transcript variant 3, mRNA.										
50	/FL=gb:NM_001850.1										
	gb:M69106.1										
55	gb:BC003070.1										
	gb:BC003070.1										
60	gb:BC003070.1										
	gb:BC003070.1										
65	gb:BC003070.1										
	gb:BC003070.1										

5		th hormone 1, isoform 3 precursor /FL=gb:NM_ 022560.1									
10	BE328496	hypothetical protein PRO2032 /FL=gb:AF11 6683.1 gb:NM_0186 15.1	-	-0.59	0.25	1.76	0.13	-2.01	0.97	1.73	0.26
15	NM_022469	Homo sapiens hypothetical protein FLJ21195 similar to protein related to DAC and cerberus (FLJ21195), mRNA. /PROD=hypo thetical protein FLJ21195 similar to protein relate d to DAC and cerberus /FL=gb:NM_ 022469.1	GREM2	-1.15	0.25	0.09	0.88	-3.43	0.90	0.76	0.47
20											
25											
30											
35											
40											
45	NM_001362	Homo sapiens deiodinase, iodothyronin e, type III (DIO3), mRNA. /PROD=thyr oxine deiodinase type III /FL=gb:NM_ 001362.1 gb:S79854.1	DIO3	-1.73	0.70	1.99	1.92	-1.05	0.79	4.23	1.51
50											
55											
60	NM_022581	Homo	CSH1	-1.56	0.67	2.08	0.42	-1.63	0.80	1.47	0.53
65											

[illegible]

		1, isoform 4 precursor /FL=gb:NM_022561.1									
5	NM_022659	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11500 similar to EBF2 (FLJ11500), mRNA. /PROD=hypo thetical protein FLJ11500 similar to EBF2 /FL=gb:NM_022659.1	-	-1.58	0.75	-1.24	1.79	-3.62	0.20	-1.81	1.25
10											
15											
20											
25											
30	AF006060	Homo sapiens placental growth hormone 20kDa isoform (hGH-V) mRNA, complete cds. /PROD=plac ental growth hormone 20kDa isoform /FL=gb:AF006060.1 gb:NM_022556.1	CSH1	-1.21	0.06	1.13	0.05	-3.08	0.63	0.50	0.17
35											
40											
45											
50											
55	AI688418 M86849	plexin A2 Homo sapiens connexin 26 (GJB2) mRNA, complete cds.	PLXNA2	-0.18	0.14	0.84	1.58	-1.28	0.53	2.74	0.96
60			-	-5.08	0.26	0.54	0.47	-1.64	0.19	-0.09	0.44
65											

5	/PROD=conn exin 26 /FL=gb:NM_004004.1 gb:M86849.2										
	N71923	fibronectin -		0.30	0.24	2.83	1.46	0.53	0.12	4.38	1.46
10		leucine rich transmembra ne protein 3 /FL=gb:AF16 9677.1 gb:NM_0132 81.1									
15	NM_013281	Homo FLRT3	-0.20	0.33	2.14	1.61	0.00	0.15	3.96	1.39	
20		sapiens fibronectin leucine rich transmembra ne protein 3 (FLRT3), mRNA. /PROD=fibro nectin leucine rich transmembra ne protein3 /FL=gb:AF16 9677.1 gb:NM_0132 81.1									
25											
30											
35											
40	AI601101	Homo FAM84A	0.46	0.38	3.07	0.46	-0.32	0.46	3.82	0.48	
45		sapiens cDNA: FLJ21410 fis, clone COL03938									
50	NM_000325	Homo PITX2	1.37	0.17	3.51	0.47	0.89	0.16	4.02	0.47	
55		sapiens paired-like homeodoma in transcription factor 2 (PITX2), mRNA. /PROD=pair ed-like homeodoma in									
60											
65											

5		transcription factor 2									
		/FL=gb:NM_000325.1									
		gb:U69961.1									
10		gb:AF048720.1									
	AI692659	heat shock PRDM1	0.21	0.25	1.67	0.77	-0.67	0.17	2.61	0.80	
		90kD protein									
		1, alpha									
15	NM_000602	Homo sapiens	SERPINE1	2.97	0.16	4.75	1.89	1.55	0.22	2.75	1.87
		serine (or cysteine)									
20		proteinase inhibitor,									
		clade E									
		(nexin,									
25		plasminogen activator									
		inhibitor type									
		1), member									
30		1									
		(SERPINE1),									
		mRNA.									
35		/PROD=serin									
		e (or									
		cysteine)									
		proteinase									
40		inhibitor,									
		cladeE									
		(nexin,									
		plasminogen									
45		activator									
		inhibitor type									
		1), membe									
	NM_001480	Homo sapiens	GALR1	-1.90	0.68	0.04	0.73	-2.42	0.72	-0.34	0.73
50		galanin									
		receptor 1									
		(GALR1),									
55		mRNA.									
		/PROD=gala									
		nin receptor									
		1									
60		/FL=gb:NM_001480.2									
		gb:U23854.1									
		gb:L34339.1									
65											

		gb:U53511.1									
5	NM_000393	Homo sapiens collagen, type V, alpha 2 (COL5A2), mRNA.	COL5A2	4.29	0.14	5.25	0.21	2.62	0.02	5.48	0.13
10		/PROD=collagen, type V, alpha 2									
15		/FL=gb:NM_000393.1									
20	N63706	ESTs	-	0.06	0.18	1.73	1.89	-0.74	0.13	3.75	1.75
25	AF132818	Homo sapiens colon Kruppel-like factor (CKLF) mRNA, complete cds.	KLF5	0.63	0.11	3.16	0.50	0.07	0.42	3.40	0.44
30		/PROD=colon Kruppel-like factor									
35		/FL=gb:AF132818.1									
40		gb:AF28727.2.1									
45		gb:AB03082.4.1									
		gb:NM_001730.1									
50	X59065	H.sapiens FGF gene, exon 3	-	-1.17	1.11	-0.39	1.06	-2.61	0.26	-0.96	1.01
55		/FL=gb:NM_000800.1									
60		gb:M13361.1									
	R73554	Human insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) mRNA	IGFBP5	-0.12	0.15	2.63	1.41	-0.69	0.16	4.00	1.65
65	NM_002149	Homo sapiens	HPCAL1	-0.18	0.28	1.81	0.44	-1.98	0.86	1.18	0.22

5		hippocalcin-like 1 (HPCAL1), mRNA. /PROD=hipp									
10		ocalcin-like 1 /FL=gb:NM_002149.1 gb:D16227.1									
15	AI093327	ESTs	-	0.69	0.11	3.09	0.58	0.45	0.07	2.29	0.85
	NM_003240	Homo sapiens endometrial bleeding associated factor (left-right determinatio n, factor A; transforming growth factor beta superfamily) (EBAF), mRNA. /PROD=tran sforming growth factor, beta 4 /FL=gb:U815 23.1 gb:NM_0032 40.1 gb:AF08151 3.1	PYCR2	6.22	0.16	6.97	0.60	4.16	0.07	7.51	0.68
20											
25											
30											
35											
40											
45											
	AI263909	ras homolog gene family, member B /FL=gb:NM_004040.1	RHOB	3.89	0.16	5.88	0.13	3.01	0.15	5.64	0.10
50											
55	NM_001792	Homo sapiens cadherin 2, type 1, N- cadherin (neuronal) (CDH2), mRNA. /PROD=cadh	CDH2	3.83	0.17	6.01	0.11	2.85	0.13	5.74	0.17
60											
65											

5		erin 2, type 1, N- cadherin (neuronal) /FL=gb:NM_001792.1									
10		gb:M34064.1									
	NM_003897	Homo sapiens immediate early response 3 (IER3), mRNA, /PROD=imm ediate early response 3 /FL=gb:BC005080.1	IER3	5.45	0.15	6.97	0.17	4.33	0.11	6.75	0.2
15		gb:BC000844.1									
20		gb:AF083421.1									
25		gb:NM_003897.1									
30		gb:AF083421.1									
35	AF278532	Homo sapiens beta-netrin mRNA, complete cds, /PROD=beta -netrin /FL=gb:AF119916.1	NTN4	-0.16	0.30	1.70	0.91	-0.67	0.48	2.66	0.7
40		gb:AF297711.1									
45		gb:NM_021229.1									
50		gb:AF278532.1									
55	AF348491	Homo sapiens chemokine receptor CXCR4 mRNA, complete cds,	CXCR4	1.39	0.21	4.05	1.58	1.45	0.07	5.67	1.6
60											
65											

5	/PROD=che										
	mokine										
	receptor										
	CXCR4										
	/FL=gb:AF34										
10	8491.1										
	NM_030781	Homo	COLEC12	1.93	0.13	3.64	1.66	1.96	0.18	5.68	1.51
	sapiens										
	scavenger										
	receptor with										
15	C-type lectin										
	(SRCL),										
	mRNA.										
	/PROD=scav										
	enger										
20	receptor with										
	C-type lectin										
	/FL=gb:NM_										
	030781.1										
	NM_000599	Homo	IGFBP5	-0.31	0.34	3.03	1.85	0.12	0.24	4.51	1.75
25	sapiens										
	insulin-like										
	growth factor										
	binding										
	protein 5										
30	(IGFBP5),										
	mRNA.										
	/PROD=insul										
	in-like growth										
	factor										
35	binding										
	protein 5										
	/FL=gb:M650										
	62.1										
	gb:M62782.1										
40	gb:NM_0005										
	99.1										
	gb:AF05503										
	3.1										
	AI348094	KIAA0882	TBC1D9	0.13	0.26	3.21	1.13	0.96	0.13	4.67	1.08
45	protein										
	BG287862	AHNAK	AHNAK	1.47	0.20	3.72	0.51	1.37	0.17	4.34	0.58
	nucleoprotei										
	n										
	(desmoyokin										
50)										
	AI676059	ESTs	FOXQ1	-0.32	0.55	3.08	1.63	0.50	0.17	4.81	1.47
	AI127440	ESTs	-	-0.85	0.36	0.60	1.22	-0.65	0.27	2.13	1.13
	AL574210	serine (or	SERPINE1	2.81	0.24	5.07	0.88	2.13	0.15	3.96	0.86
65											

		cysteine)									
		proteinase									
5		inhibitor,									
		clade E									
		(nexin,									
		plasminogen									
10		activator									
		inhibitor type									
		1), member									
		1									
15		/FL=gb:NM_									
		000602.1									
		gb:M16006.1									
20	AB037810	Homo	SIPA1L2	3.88	0.04	5.66	0.08	3.18	0.11	5.85	0.11
		sapiens									
		mRNA for									
		KIAA1389									
25		protein,									
		partial cds.									
		/PROD=KIA									
		A1389									
30	NM_001394	protein	DUSP4	0.22	0.37	2.88	1.09	0.50	0.14	4.12	0.99
		sapiens dual									
		specificity									
35		phosphatase									
		4 (DUSP4),									
		mRNA.									
		/PROD=dual									
40		specificity									
		phosphatase									
		4									
45		/FL=gb:NM_									
		001394.2									
		gb:BC00267									
		1.1									
		gb:U48807.1									
50		gb:U21108.1									
	BC029442	Homo	-	2.04	0.20	3.80	0.74	1.18	0.05	4.50	0.65
		sapiens,									
55		Similar to									
		immunity									
		associated									
		protein 1,									
60		clone									
		MGC:32707									
		IMAGE:4618									
		467, mRNA,									
65		complete									

		cds.									
		/PROD=Simil									
5		ar to									
		immunity									
		associated									
10		protein 1									
		/FL=gb:BC02									
		9442.1									
	NM_000700	Homo sapiens	ANXA1	5.00	0.18	6.27	1.28	3.67	0.05	4.96	1.25
15		annexin A1									
		(ANXA1),									
		mRNA.									
20		/PROD=ann									
		exin I									
		/FL=gb:BC00									
		1275.1									
25		gb:NM_0007									
		00.1									
	BC000740	Homo sapiens,	CCKBR	1.08	0.36	3.93	1.84	1.93	0.03	5.86	1.82
30		cholecystoki									
		nin B									
		receptor,									
35		clone									
		MGC:2199,									
		mRNA,									
		complete									
40		cds.									
		/PROD=chol									
		ecystokinin B									
		receptor									
45		/FL=gb:L077									
		46.1									
		gb:L08112.1									
		gb:S70057.1									
50		gb:BC00074									
		0.1									
		gb:L04473.1									
		gb:NM_0007									
55		31.1									
	N36408	hypothetical	FOSL2	-0.09	0.40	2.07	0.04	-0.85	0.24	1.71	0.28
		protein									
60		FLJ23306									
		/FL=gb:NM_									
		024530.1									
	AF072242	Homo sapiens	MBD2	-3.98	0.38	-0.59	0.27	-3.07	0.22	-1.70	0.68
65		methyl-CpG									

5		binding protein MBD2 (MBD2) mRNA, complete cds. /PROD=met hyl-CpG binding protein MBD2 /FL=gb:NM_ 003927.2 gb:AF07224 2.1									
10											
15											
20	AF211891	Homo sapiens Mix-like homeobox protein 1 (MILD1) mRNA, complete cds. /PROD=Mix-like homeobox protein 1 /FL=gb:AF211891.1	MIXL1	-0.63	0.38	0.77	0.95	-2.29	0.44	0.92	1.71
25											
30											
35											
40	BF063186	ESTs	CALD1	1.16	0.19	2.03	0.42	-1.20	1.02	1.65	0.27
45	NM_000362	Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) (TIMP3), mRNA. /PROD=tissue inhibitor of metalloproteinase	TIMP3	0.08	0.32	1.98	0.09	-0.34	0.33	1.80	0.26
50											
55											
60											
65											

5		3precursor /FL=gb:NM_ 000362.2 gb:U14394.1 gb:U67195.1 gb:U02571.1									
10	AK022852	Homo sapiens cDNA FLJ12790	SIPA1L2	2.87	0.12	4.50	0.09	1.87	0.01	4.55	0.09
15		fis, clone NT2RP2001									
20		985, weakly similar to									
25		Homo sapiens high-risk human papilloma									
30		viruses E6 oncoproteins targeted protein									
35	BE500942	E6TP1 alpha mRNA.									
40		Homo sapiens mRNA; cDNA	C6orf155	3.23	0.10	4.68	0.86	1.95	0.03	3.77	0.96
45		DKFZp761M0111 (from clone									
		DKFZp761M0111)									
	AW665892	paternally expressed 3	MFAP5	-1.82	0.54	0.37	0.60	-1.54	0.39	-0.01	0.28
50	AK025063	Homo sapiens cDNA: FLJ21410	FAM84A	-1.34	0.84	0.75	0.45	-2.35	0.85	1.01	0.53
55		fis, clone COL03938.									
60	NM_001828	Homo sapiens Charot-Leyden crystal protein (CLC),	CLC	2.17	0.21	3.53	1.07	0.45	0.08	2.11	1.27
65											

5		mRNA, /PROD=Char ot-Leyden crystal protein /FL=gb:NM_ 001828.3 gb:L01664.1									
10	M15329	Human IL1A interleukin 1- alpha (IL1A) mRNA, complete cds. /PROD=interl eukin 1- alpha /FL=gb:M153 29.1	0.85	0.32	2.72	0.30	-0.88	0.60	2.20	0.22	
15											
20											
25	BC002671	Homo sapiens, dual specificity phosphatase 4, clone MGC:3713, mRNA, complete cds. /PROD=dual specificity phosphatase 4 /FL=gb:NM_ 001394.2 gb:BC00267 1.1 gb:U48807.1 gb:U21108.1	1.79	0.03	4.30	1.39	2.10	0.10	5.60	1.22	
30											
35											
40											
45											
50	AA524250	deleted in liver cancer 1	1.02	0.05	2.35	0.98	0.10	0.38	3.26	0.96	
55	BC001211	Homo sapiens, kinesin family member C3, clone MGC:3226, mRNA,	-1.53	0.72	0.81	0.38	-2.08	0.42	0.75	0.16	
60											
65											

		complete										
		cds.										
5		/PROD=kine										
		sin family										
		member C3										
		/FL=gb:BC00										
10		1211.1										
		gb:Nm_0055										
		50.1										
		gb:AF00442										
15		6.1										
	NM_004560	Homo	ROR2	0.76	0.08	2.20	0.81	0.08	0.14	3.06	0.95	
		sapiens										
		receptor										
20		tyrosine										
		kinase-like										
		orphan										
		receptor 2										
25		(ROR2),										
		mRNA.										
		/PROD=rece										
		ptor tyrosine										
30		kinase-like										
		orphan										
		receptor 2										
		/FL=gb:M976										
35		39.1										
		gb:Nm_0045										
		60.1										
	BC000125	Homo	TGFB1	1.16	0.18	3.43	0.08	0.72	0.14	3.30	0.16	
40		sapiens,										
		Similar to										
		transforming										
		growth										
45		factor, beta										
		1, clone										
		MGC:3119,										
		mRNA,										
50		complete										
		cds.										
		/PROD=Simil										
		ar to										
55		transforming										
		growth										
		factor, beta 1										
		/FL=gb:M384										
60		49.1										
		gb:BC00118										
		0.1										
65												

		gb:BC00012									
		5.1									
5		gb:Nm_0006									
		60.1									
	NM_016931	Homo sapiens	NOX4	1.83	0.06	3.31	1.29	1.20	0.14	2.28	1.27
10		NADPH oxidase 4 (NOX4), mRNA.									
15		/PROD=NADPH oxidase 4									
20		/FL=gb:AF261943.1									
		gb:Nm_016931.1									
25		gb:AF254621.1									
		gb:AB041035.1									
30	BC001830	Homo sapiens, Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1, clone MGC:4078, mRNA, complete cds.	TGFB111	0.95	0.17	3.59	0.73	1.52	0.09	2.74	0.69
35		/PROD=Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1									
40		/FL=gb:Nm_015927.1									
45		gb:BC001830.1									
50		gb:AF116343.1									
55											
60	NM_024576	Homo sapiens	OGFRL1	3.15	0.13	4.49	0.82	1.63	0.06	3.30	0.98
65											

5		hypothetical protein FLJ21079 (FLJ21079), mRNA. /PROD=hypo									
10		thetical protein FLJ21079 /FL=gb:NM_									
15	NM_001963	Homo sapiens epidermal growth factor (beta- urogastrone) (EGF), mRNA. /PROD=epid ermal growth factor (beta- urogastrone) /FL=gb:NM_	EGF	0.12	0.22	1.82	1.15	-0.62	0.36	2.68	1.23
20		001963.2									
25											
30											
35	BE620374 AL359062	ESTs Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAG E 1913076.	C6orf155 COL8A1	1.97 -1.31	0.05 0.25	3.35 2.32	1.01 0.94	0.59 0.03	0.17 0.12	2.10 3.51	1.05 1.02
40											
45	AL117653	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586C 0224 (from clone DKFZp586C 0224).	MITF	-0.12	0.61	2.32	0.10	0.21	0.13	2.56	0.06
50											
55											
60	AL021977	Cluster Incl. - AL021977:b K447C4.1 (novel MAFF (v-maf musculoapo neurotic		1.92	0.14	4.53	0.43	2.15	0.12	4.66	0.22
65											

5		fibrosarcoma (avian) oncogene family, protein F) LIKE protein)									
10		/cds=(0,494) /gb=AL0219 77 /gi=4914526 /ug=Hs.5130 5 /len=2128									
15	NM_003564	Homo sapiens transgelin 2 (TAGLN2), mRNA. /PROD=tran sgelin 2 /FL=gb:D212 61.1 gb:NM_0035 64.1	TAGLN2	5.43	0.12	6.76	0.06	3.48	0.27	6.69	0.04
20											
25											
30	BC005107	Homo sapiens, clone IMAGE:3840 937, mRNA, partial cds. /PROD=Unk nown (protein for IMAGE:3840 937)	-	7.08	0.07	6.42	0.26	2.60	0.07	6.93	0.22
35											
40											
45	NM_001124	Homo sapiens adrenomedul lin (ADM), mRNA. /PROD=adre nomedullin /FL=gb:NM_ 001124.1 gb:D14874.1	ADM	4.70	0.22	7.61	0.19	5.21	0.06	7.58	0.21
50											
55											
60	AF280545	Homo sapiens neuropilin- 2b(5) (NRP2)	NRP2	-0.29	0.33	1.40	0.30	-1.67	0.61	1.22	0.33
65											

5		mRNA, complete cds, alternatively spliced.									
10		/PROD=neur opilin-2b(5) /FL=gb:AF28 0544.1									
15		gb:AF28054 5.1									
	NM_014624	Homo sapiens S100 calcium- binding protein A6 (calcyclin) (S100A6), mRNA. /PROD=S10 0 calcium- binding protein A6 /FL=gb:NM_ 014624.2 gb:BC00143 1.1	S100A6	3.08	0.38	3.10	0.18	-0.57	0.37	3.24	0.19
20											
25											
30											
35											
40	AB030824	Homo sapiens mRNA for transcription factor BTEB2, complete cds. /PROD=tran scription factor BTEB2 /FL=gb:AF13 2818.1 gb:AF28727 2.1 gb:AB03082 4.1 gb:NM_0017 30.1 gb:D14520.1	KLF5	0.57	0.24	2.16	0.49	-0.41	0.05	2.53	0.17
45											
50											
55											
60											
65											

	NM_015675	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45B), mRNA. /PROD=DKF ZP566B133 protein /FL=gb:NM_015675.1 gb:AF090950.1	GADD45B	2.47	0.22	4.44	0.46	2.02	0.09	4.64	0.33
5											
10											
15											
20											
25	BF347089	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) /FL=gb:NM_000362.2 gb:U14394.1 gb:U67195.1 gb:U02571.1	TIMP3	0.57	0.13	2.01	0.29	-0.19	0.20	2.09	0.44
30											
35											
40											
	BF056473	ESTs	-	-0.64	0.87	1.79	0.10	-0.73	0.34	1.57	0.23
	AA809487	Homo sapiens cDNA: FLJ21715 fis, clone COL10287, highly similar to AF071569 Homo sapiens multifunctional calciumcalmodulin-dependent protein kinase II delta2	-	0.52	0.22	3.68	0.43	1.39	0.22	3.89	0.48
45											
50											
55											
60											
65											

5	isoform mRNA										
	AL575735	collagen, -		5.54	0.11	6.65	0.14	4.57	0.08	6.68	0.07
10		type V, alpha 2									
		/FL=gb:NM_000393.1									
	AF003934	Homo	GDF15	2.74	0.20	4.01	0.41	0.72	0.17	4.34	0.50
15		sapiens									
		prostate									
		differentiation factor									
20		mRNA, complete cds.									
		/PROD=prostate									
25		differentiation factor									
		/FL=gb:U88323.1									
30		gb:BC000529.1									
		gb:AF003934.1									
35		gb:NM_004864.1									
		gb:AF019770.1									
40		gb:AB000584.1									
	NM_000313	Homo	PROS1	-1.54	0.10	0.98	0.83	-0.62	0.09	1.79	0.86
45		sapiens									
		protein S (alpha)									
50		(PROS1), mRNA.									
		/PROD=protein S (alpha)									
55		/FL=gb:M15036.1									
		gb:NM_000313.1									
60	NM_016651	Homo	DACT1	2.37	0.26	4.79	0.67	2.46	0.14	3.92	0.78
		sapiens									
		heptacellular carcinoma									
65		novel gene-3 protein									

5		(LOC51339), mRNA. /PROD=hept acellular carcinoma									
10		novel gene-3 protein /FL=gb:NM_ 016651.2									
15		gb:AF25107 9.2									
	NM_020129	Homo sapiens placental protein 13- like protein (LOC56891), mRNA. /PROD=plac ental protein 13-like protein /FL=gb:NM_ 020129.1 gb:AF26785 2.1	LGALS14	1.38	0.30	3.15	0.70	0.79	0.04	2.47	0.66
20											
25											
30											
35											
	NM_013451	Homo sapiens fer-1 (C.elegans)- like 3 (myoferlin) (FER1L3), mRNA. /PROD=fer-1 (C.elegans)- like 3 (myoferlin) /FL=gb:NM_ 013451.1 gb:AF18231 6.1	FER1L3	1.75	0.15	4.02	0.97	1.59	0.13	5.14	0.82
40											
45											
50											
55											
	R72286	microfibrillar- associated protein 4	MFAP4	-1.15	0.60	-1.76	0.61	-2.37	0.22	-0.60	0.72
60											
	AI417362	ESTs, Moderately similar to ALU1_HUM AN ALU	FUT1	2.42	0.14	2.32	0.72	-0.46	0.53	1.70	0.59
65											

		SUBFAMILY									
		J									
5		SEQUENCE									
		CONTAMIN									
		ATION									
10		WARNING									
		ENTRY									
		(H.sapiens)									
	NM_001553	Homo sapiens	IGFBP7	3.41	0.19	4.63	1.07	1.65	0.10	3.34	1.16
15		insulin-like									
		growth factor									
20		binding									
		protein 7									
		(IGFBP7),									
		mRNA.									
25		/PROD=insul									
		in-like growth									
		factor									
		binding									
30		protein 7									
		/FL=gb:NM_									
		001553.1									
		gb:L19182.1									
35	BG285011	Homo sapiens	ARID5B	0.05	0.22	1.79	0.21	-0.95	0.42	1.16	0.55
		mRNA;									
		cDNA									
40		DKFZp586N									
		012 (from									
		clone									
		DKFZp586N									
45		012)									
	BE967311	Homo sapiens	-	1.99	0.06	4.08	0.92	2.28	0.17	5.01	0.87
		mRNA;									
50		cDNA									
		DKFZp762O									
		1615 (from									
		clone									
55		DKFZp762O									
		1615)									
	BC005047	Homo sapiens,	DUSP6	2.50	0.32	4.04	0.67	1.56	0.16	2.94	0.84
60		clone									
		MGC:12852,									
		mRNA,									
65		complete									
		ods.									

5	/PROD=Unk nown (protein for MGC:12852) /FL=gb:NM_ 001946.1										
	gb:AB01338 2.1 gb:BC00356 2.1										
	gb:BC00314 3.1 gb:BC00504 7.1										
	AW005572	putative 47 kDa protein	ANKS1B	-0.59	0.12	0.19	0.70	-1.59	0.07	0.86	0.92
	AW294092	ESTs	RERG	0.54	0.16	-0.68	1.55	-2.78	0.92	-0.58	0.97
25	NM_001899	Homo sapiens cystatin S (CST4), mRNA. /PROD=cyst atin S /FL=gb:NM_ 001899.1	CST4	0.14	0.52	2.46	1.59	0.53	0.14	3.87	1.40
	AI917371	ESTs	-	-1.47	0.95	0.18	1.43	-1.24	0.33	2.21	1.17
	NM_000515	Homo sapiens growth hormone 1 (GH1), transcript variant 1, mRNA. /PROD=grow th hormone 1, isoform 1 precursor /FL=gb:NM_ 000515.2	CSH1	-2.36	0.29	1.92	0.10	-0.73	0.57	1.37	0.21
55	NM_004414	Homo sapiens Down syndrome critical region gene 1 (DSCR1), mRNA.	DSCR1	2.14	0.03	3.85	0.26	1.74	0.16	3.34	0.36
65											

5	/PROD=Dow n syndrome critical region protein 1 /FL=gb:U288										
10	33.2 gb:NM_0044 14.2										
15	AI355441	sprouty	-	0.24	0.48	1.72	0.50	-1.12	0.40	2.03	0.61
		(Drosophila)									
	AB032953	Homo	ODZ2	0.00	0.14	0.65	0.35	-1.74	0.74	0.88	0.03
20		sapiens									
		mRNA for									
		KIAA1127									
		protein,									
25		partial cds.									
		/PROD=KIA									
		A1127									
		protein									
30	BE048571	ESTs	MGC16121	-1.66	0.78	1.44	1.00	-1.31	0.21	0.10	1.22
	AW471145	ESTs	PRSS23	0.87	0.10	3.46	0.35	1.13	0.11	3.37	0.53
	BF196943	ESTs	USP53	1.43	0.03	3.24	0.92	0.85	0.26	2.32	0.88
	AF498927	Homo	ARHGDIB	-0.03	0.19	0.04	0.96	-3.00	0.54	-0.85	0.93
35		sapiens Rho									
		GDP									
		dissociation									
		inhibitor beta									
40		(ARHGDIB)									
		mRNA,									
		complete									
45		ods.									
		/PROD=Rho									
		GDP									
		dissociation									
		inhibitor beta									
50		/FL=gb:AF49									
		8927.1									
	AF329092	Homo	DOC1	-2.38	0.45	1.00	0.19	-1.62	0.74	0.75	0.11
55		sapiens									
		GPBP-									
		interacting									
		protein 90									
60		mRNA,									
		complete									
		ods.									
65		/PROD=GPB									
		P-interacting									
		protein 90									

		/FL=gb:AF32 9092.1									
5	BG250721	Homo sapiens mRNA; cDNA	-	2.48	0.04	4.54	0.95	2.63	0.14	5.31	0.83
10		DKFZp564C2063 (from clone DKFZp564C2063)									
15	N69091	ESTs	PCDH17	0.59	0.10	1.49	0.88	-1.11	0.69	2.49	0.78
	BF589359	ESTs	PAG1	-1.11	0.52	-0.09	0.43	-1.54	0.12	0.50	0.13
	BF968270	ESTs	SLC35F3	0.37	0.02	1.84	0.30	0.10	0.17	2.46	0.36
20	NM_006183	Homo sapiens neurotensin (NTS), mRNA.	NTS	4.77	0.15	4.73	1.45	3.01	0.19	3.21	1.47
25		/PROD=neur									
30		otensin precursor /FL=gb:NM_006183.2									
35	D28124	Cluster Incl. D28124:Human mRNA for unknown product, complete cds /cds=(61,603)	NBL1	2.90	0.03	4.24	0.37	2.09	0.08	4.44	0.38
40		/gb=D28124 /gi=641821 /ug=Hs.76307 /len=1929									
45		tudor repeat associator with PCTAIRE 2	TDRD7	1.19	0.19	2.40	0.87	0.92	0.04	3.27	0.89
50	AW129593	core promoter element binding protein	KLF6	0.29	0.30	2.91	1.02	0.54	0.24	3.68	0.94
55	BE675435	/FL=gb:AF001461.1 gb:BC00031									
60											
65											

5	1.1										
	gb:NM_0013										
	00.2										
10	gb:AB01749										
	3.1										
	gb:BC00430										
15	1.1										
	AI202327	ESTs	CPEB2	1.88	0.09	3.42	0.07	0.99	0.10	3.36	0.03
	NM_002228	Homo	JUN	2.12	0.16	4.09	0.56	1.62	0.13	4.53	0.41
20	sapiens v-jun										
	avian										
	sarcoma										
25	virus 17										
	oncogene										
	homolog										
30	(JUN),										
	mRNA,										
	/PROD=v-jun										
35	avian										
	sarcoma										
	virus 17										
40	oncogene										
	homolog										
	/FL=gb:NM_										
45	002228.2										
	gb:BC00264										
	6.1										
50	AF005775	Homo	CFLAR	2.88	0.18	3.70	1.56	0.35	0.17	5.22	1.69
	sapiens										
	caspase-like										
55	apoptosis										
	regulatory										
	protein 2										
60	(clarp)										
	mRNA,										
	alternatively										
65	spliced,										
	complete										
	cds.										
	/PROD=casp										
	ase-like										
	apoptosis										
	regulatory										
	protein 2										
	/FL=gb:AF00										
	5775.1										
	NM_007173	Homo	PRSS23	3.02	0.10	5.11	0.21	2.90	0.05	5.22	0.23
	sapiens										
	protease,										

5		serine, 23 (SPUVE), mRNA. /PROD=prot ease, serine, 23									
10		/FL=gb:BC00 1278.1 gb:AF19361 1.1									
15		gb:AF01528 7.1 gb:AL13691 4.1									
20		gb:NM_0071 73.1									
25	NM_012413	Homo sapiens glutaminyl- peptide cyclotransfer ase (glutaminyl cyclase) (QPCT), mRNA. /PROD=gluta minyl- peptide cyclotransfer ase precursor /FL=gb:NM_ 012413.2	QPCT	1.44	0.09	0.97	0.85	-2.46	0.65	0.19	1.10
30											
35											
40											
45	BU683415	Homo sapiens, clone IMAGE:4096 273, mRNA	KLF6	3.40	0.06	5.28	0.85	3.46	0.09	6.01	0.85
50											
55	AV729634	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6 /FL=gb:AB00 7942.1 gb:NM_0147 87.1	DNAJC6	0.62	0.20	2.59	0.79	0.99	0.19	3.35	0.65
60											
65	BC038556	Homo	-	-0.79	0.40	0.12	0.99	-2.17	0.62	-0.08	0.38

5		sapiens, clone IMAGE:3446 976, mRNA.									
	NM_014942	Homo sapiens KIAA0957 protein (KIAA0957), mRNA. /PROD=KIAA0957 protein /FL=gb:AB023174.1 gb:NM_014942.1	ANKRD6	0.62	0.04	2.17	1.11	0.59	0.23	3.30	1.07
10											
15											
20											
25	AF260333	Homo sapiens AD036 mRNA, complete cds. /PROD=AD036 /FL=gb:AF260333.1	C4orf18	-1.58	0.10	0.21	1.21	-3.19	1.07	1.60	1.12
30											
35											
40	AA448956	Homo sapiens cDNA: FLJ21715 fis, clone COL10287, highly similar to AF071569 Homo sapiens multifunctional calciumcalmodulin- dependent protein kinase II delta2 isoform mRNA /FL=gb:AF071569.1	CAMK2D	1.47	0.18	2.75	0.42	0.21	0.21	2.97	0.39
45											
50											
55											
60											
65											

	BE349115	ESTs	COL22A1	-0.02	0.52	2.04	0.25	0.24	0.06	2.38	0.22
	BF209337	Homo	LOC541471	4.83	0.17	5.80	0.73	3.13	0.02	4.84	0.81
5		sapiens									
		cDNA									
		FLJ10934									
		fis, clone									
10		OVARC1000									
		640									
	AB019695	Homo	-	2.43	0.01	4.15	0.40	1.42	0.05	3.50	0.29
15		sapiens									
		mRNA for									
		thioredoxin									
		reductase II									
20		beta,									
		complete									
		cds.									
		/PROD=thior									
25		edoxin									
		reductase II									
		beta									
		/FL=gb:AB01									
30		9695.1									
	AK090497	Homo	LOC284576	-3.78	0.56	-2.87	1.42	-4.94	0.07	-4.74	0.53
		sapiens									
		cDNA									
35		FLJ33178									
		fis, clone									
		ADRGL2002									
		753.									
40	NM_006763	Homo	BTG2	2.30	0.10	3.28	0.62	0.85	0.25	3.84	0.74
		sapiens BTG									
		family,									
45		member 2									
		(BTG2),									
		mRNA.									
		/PROD=BTG									
50		family,									
		member 2									
		/FL=gb:U726									
		49.1									
55		gb:NM_0067									
		63.1									
	BC002616	Homo	TAGLN2	5.61	0.20	5.56	0.17	2.91	0.18	5.40	0.12
		sapiens,									
60		transgelin 2,									
		clone									
		MGC:2989,									
65		mRNA,									
		complete									

		ods.									
		/PROD=tran									
		sgelin 2									
5		/FL=gb:BC00									
		2616.1									
	AF078077	Homo	GADD45B	1.30	0.17	3.41	0.31	0.61	0.12	3.05	0.29
		sapiens									
10		growth arrest									
		and DNA-									
		damage-									
15		inducible									
		protein									
		GADD45bet									
		a mRNA,									
20		complete									
		ods.									
		/PROD=grow									
25		th arrest and									
		DNA-									
		damage-									
		inducible									
30		proteinGAD									
		D45beta									
		/FL=gb:AF08									
		7853.1									
35		gb:AF07807									
		7.1									
	NM_001854	Homo	COL11A1	2.90	0.02	4.06	1.44	1.87	0.06	2.68	1.43
		sapiens									
40		collagen,									
		type XI,									
		alpha 1									
45		(COL11A1),									
		mRNA.									
		/PROD=colla									
		gen, type XI,									
50		alpha 1									
		/FL=gb:J041									
		77.1									
		gb:NM_0018									
55		54.1									
	A1830201	ESTs	KIAA0773	-0.75	0.82	1.24	0.22	-1.87	0.51	0.40	0.22
	N95437	ESTs	LMCD1	0.74	0.12	2.72	0.57	0.39	0.14	3.05	0.42
	BC002511	Homo	CBR1	3.72	0.02	1.03	2.43	-4.10	0.16	-1.64	2.36
60		sapiens,									
		carbonyl									
		reductase 1,									
65		clone									
		MGC:1920,									

5		mRNA, complete cds. /PROD=carb onyl reductase 1									
10		/FL=gb:BC00 2511.1 gb:NM_0017 57.1									
15	AV682252	gb:J04056.1 HIV-1 rev	-	-0.33	0.15	1.78	1.36	-0.24	0.17	0.41	1.29
20		binding protein 2									
	AW263497	ESTs	SYTL5	-1.05	0.25	1.44	0.38	-0.55	0.41	2.11	0.47
	AF130095	Homo	-	5.80	0.14	6.80	0.49	4.54	0.10	7.35	0.36
25		sapiens clone FLC0562 PRO2841									
30		mRNA, complete cds. /PROD=PRO 2841									
35		/FL=gb:AF13 0095.1									
40	H92988	tyrosine 3- monooxygen asetryptopha n 5- monooxygen ase	C9orf19	2.00	0.06	3.54	0.91	1.93	0.14	4.61	0.81
45		activation protein, eta polypeptide									
50	X02761	Human	FN1	5.67	0.17	6.65	0.54	4.52	0.21	7.21	0.42
55		mRNA for fibronectin (FN precursor). /PROD=fibro nectin precursor									
60	AI016316	ESTs	-	0.24	0.18	1.19	1.17	-0.33	0.18	0.25	1.18
	NM_006622	Homo	PLK2	4.64	0.14	5.88	0.45	3.50	0.06	5.19	0.47
65		sapiens serum- inducible									

5	kinase (SNK), mRNA. /PROD=seru m-inducible kinase										
10	/FL=gb:AF05 9617.1 gb:NM_0066 22.1 gb:AF22357 4.1										
15											
20	NM_013238 Homo sapiens DNAJ domain-containing (MCJ), mRNA. /PROD=DNAJ domain-containing /FL=gb:NM_013238.1 gb:AF12674 3.1	DNAJC15	-2.27	0.60	3.79	2.03	4.07	0.09	5.58	2.31	
25											
30											
35	AK026737 Homo sapiens cDNA: FLJ23084 fis, clone LNG06602, highly similar to HSFIB1 Human mRNA for fibronectin (FN precursor).	FN1	5.86	0.14	6.85	0.49	4.66	0.08	7.39	0.37	
40											
45											
50											
55	NM_001458 Homo sapiens filamin C, gamma (actin-binding protein-280) (FLNC), mRNA. /PROD=gam	FLNC	3.28	0.17	4.17	0.70	2.11	0.17	3.39	0.64	
60											
65											

5	AK025843	Homo sapiens cDNA: FLJ22190 fis, clone HRC01053. /FL=gb:AF15 1909.1 gb:AF07704 1.1 gb:NM_0160 81.1	PALLD	1.58	0.31	3.38	0.15	1.03	0.20	3.29	0.19
10	BC005858	Homo sapiens, clone MGC:3255, mRNA, complete cds. /PROD=Unk nown (protein for MGC:3255) /FL=gb:BC00 5858.1	FN1	5.86	0.10	6.86	0.49	4.70	0.19	7.37	0.36
15	BG491844	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog /FL=gb:NM_ 002228.2 gb:BC00264 6.1	JUN	3.53	0.08	5.45	0.47	3.42	0.11	5.91	0.34
20	AA284532	tyrosine 3- monooxygen asetryptopha n 5- monooxygen ase activation protein, eta polypeptide	C9orf19	2.19	0.11	4.12	0.84	2.43	0.08	4.93	0.90
25	AA192306	triadin	TRDN	-2.54	0.69	0.02	0.61	-1.99	0.31	0.57	0.63
30											
35											
40											
45											
50											
55											
60											
65											

					/FL=gb:U189							
					85.1							
5					gb:NM_0060							
					73.1							
	AF116676	Homo	-	1.50	0.18	3.31	1.11	1.37	0.15	4.23	1.05	
		sapiens										
10		PRO1957										
		mRNA,										
		complete										
15		cds.										
		/PROD=PRO										
		1957										
		/FL=gb:AF11										
20		6676.1										
	NM_003033	Homo	ST3GAL1	-0.08	0.18	1.68	1.04	0.20	0.16	2.74	0.74	
		sapiens										
		sialyltransfer										
25		ase 4A										
		(beta-										
		galactosidas										
		e alpha-2,3-										
30		sialyltransfer										
		ase)										
		(SIAT4A),										
		mRNA.										
35		/PROD=sialy										
		ltransferase										
		4A (beta-										
40		galactosidas										
		e alpha-2,3-										
		sialyltransfer										
		ase)										
45		/FL=gb:L139										
		72.1										
		gb:L29555.1										
		gb:NM_0030										
50		33.1										
	AI222435	ESTs	-	-4.14	1.52	-0.73	0.32	-2.33	0.62	-0.33	0.12	
	NM_001924	Homo	GADD45A	3.59	0.09	5.04	0.44	3.06	0.17	5.38	0.48	
		sapiens										
55		growth arrest										
		and DNA-										
		damage-										
		inducible,										
60		alpha										
		(GADD45A),										
		mRNA.										
		/PROD=grow										
65		th arrest and										

5		DNA- damage- inducible, alpha									
10		/FL=gb:M609 74.1 gb:NM_0019 24.2									
15	NM_001425	Homo sapiens epithelial membrane protein 3 (EMP3), mRNA.	EMP3	2.76	0.18	3.90	0.64	1.51	0.06	3.13	0.57
20		/PROD=epithelial membrane protein 3 /FL=gb:U521 01.1									
25		gb:NM_0014 25.1									
30		gb:U87947.1									
35	AB017493	Homo sapiens mRNA for DNA-binding zinc finger(GBF), complete cds.	KLF6	1.69	0.20	4.02	1.01	1.80	0.08	4.87	0.87
40		/PROD=DNA -binding zinc finger(GBF) /FL=gb:AF00 1461.1									
45		gb:BC00031 1.1									
50		gb:NM_0013 00.2									
55		gb:AB01749 3.1									
60		gb:BC00430 1.1									
65	X58851	Human MLC1emb gene for embryonic	-	0.99	0.16	2.75	1.28	1.12	0.15	4.04	1.14

5		myosin alkaline light chain, promoter and exon 1									
10	BE327172	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene	-	0.86	0.15	2.94	0.51	1.14	0.08	3.57	0.45
15	U37283	Human microfibril- associated glycoprotein- 2 MAGP-2 mRNA, complete cds. /PROD=micr ofibril- associated glycoprotein- 2 MAGP-2 /FL=gb:NM_ 003480.1 gb:U37283.1	MFAP5	0.48	0.19	1.87	0.26	0.15	0.35	1.36	0.47
20											
25											
30											
35	AI819043	ESTs	CREB5	0.92	0.26	2.63	0.73	0.65	0.15	1.80	0.79
40	NM_001511	Homo sapiens GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha) (GRO1), mRNA. /PROD=GR O1 oncogene (melanoma growth stimulatingac tivity, alpha) /FL=gb:NM_ 001511.1	CXCL1	1.01	0.13	2.95	0.35	0.31	0.08	2.39	0.27
45											
50											
55											
60											
65	NM_006736	Homo sapiens heat	DNAJB2	2.23	0.04	3.46	0.44	1.10	0.02	3.75	0.41

5		shock protein, neuronal DNAJ-like 1 (HSJ1), mRNA. /PROD=heat shock protein, neuronal DNAJ-like 1 /FL=gb:NM_ 006736.1									
10											
15											
20	AA534817	ESTs, EDG3	2.32	0.06	3.28	1.04	2.08	0.04	4.58	1.04	
25		Weakly similar to ALU8_HUM AN ALU SUBFAMILY SX SEQUENCE CONTAMIN ATION WARNING ENTRY (H.sapiens)									
30											
35	U82164	Human CD99	4.73	0.15	5.69	0.73	3.19	0.07	6.36	0.93	
40		transmembra ne protein CD99 type II mRNA, complete cds. /PROD=CD9 9 typeII /FL=gb:BC00 2584.1 gb:NM_0024 14.1 gb:M16279.1 gb:BC00314 7.1 gb:U82164.1									
45											
50											
55											
60	NM_000389	Homo CDKN1A	4.03	0.02	4.20	0.12	1.81	0.07	4.16	0.05	
65		sapiens cyclin- dependent kinase inhibitor 1A									

5	(p21, Cip1) (CDKN1A), mRNA. /PROD=cycli n-dependent kinase											
10	inhibitor 1A (p21,Cip1) /FL=gb:U031 06.1											
15	gb:BC00027 5.1 gb:BC00193 5.1											
20	gb:L25610.1 gb:U09579.1 gb:NM_0003 89.1											
25	gb:L26165.1											
	NM_001299 Homo sapiens	CNN1	3.75	0.15	5.75	0.50	3.47	0.11	5.14	0.43		
30	calponin 1, basic, smooth muscle											
35	(CNN1), mRNA. /PROD=calp onin 1, basic, smooth muscle											
40	/FL=gb:U370 19.1											
45	gb:NM_0012 99.1 gb:D17408.1											
50	M36172 Human embryonic myosin alkali light chain (MLC1) mRNA, complete cds. /FL=gb:M361 72.1 gb:M24121.1 gb:NM_0024 76.1	MYL4	1.55	0.21	3.30	1.05	1.21	0.13	4.11	1.06		
55												
60												
65												

5	AB033831	Homo sapiens hSCDGF mRNA for spinal cord-derived growth factor, complete cds.	PDGFC	0.48	0.21	0.63	0.15	-1.87	0.96	0.21	0.16
10		/PROD=spinal cord-derived growth factor									
15		/FL=gb:NM_016205.1									
20		gb:AB033831.1									
25		gb:AF091434.1									
30		gb:AF244813.1									
35	NM_014333	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 4 (IGSF4), mRNA.	IGSF4	3.11	0.09	4.12	0.27	1.85	0.06	3.79	0.24
40		/PROD=immunoglobulin superfamily, member 4									
45		/FL=gb:NM_014333.1									
50		gb:AF132811.1									
55	AF345910	Homo sapiens NYD-SP14 mRNA, complete cds.	TTC29	0.35	0.26	1.53	0.93	-0.51	0.52	0.91	0.72
60		/PROD=NYD-SP14									
65		/FL=gb:AF345910.1									
	NM_004297	Homo sapiens GNA14	GNA14	4.59	0.06	4.52	1.59	1.95	0.11	2.95	1.50

5	sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14 (GNA14), mRNA. /PROD=gua										
10	nine nucleotide binding protein (G protein),alph a 14 /FL=gb:AF10 5201.1 gb:NM_0042 97.1										
15											
20	AK057525 Homo -	3.60	0.08	4.45	0.44	2.00	0.16	4.80	0.46		
25	sapiens cDNA FLJ32963 fis, clone TESTI20084 05.										
30											
35	BC000893 Homo HIST1H2BK	2.80	0.06	3.99	0.90	2.48	0.09	4.81	0.82		
40	sapiens, H2B histone family, member A, clone MGC:5132, mRNA, complete cds. /PROD=H2B histone family, member A /FL=gb:BC00 0893.1										
45											
50											
55	NM_007038 Homo ADAMTS5	0.23	0.17	1.80	0.48	0.45	0.28	1.11	0.73		
60	sapiens a disintegrin- like and metalloprote ase										
65											

5		(reprolysin type) with thrombospon din type 1 motif, 5 (aggrecanas e-2) (ADAMTS5), mRNA. /PROD=a									
10		disintegrin and metalloprote ase withthrombo spondin motifs-5 preproprotei n /FL=gb:NM_ 007038.1 gb:AF14209									
15	AW241910	ESTs, Weakly similar to JX0369 collagen alpha 1(XIX) chain precursor (H.sapiens)	COL22A1	-0.21	0.12	1.15	0.47	-0.57	0.18	1.90	0.51
20											
25											
30											
35											
40	AI860150	ESTs, Weakly similar to A49134 Ig kappa chain V-I region (H.sapiens)	FOSL2	-0.43	0.55	1.59	0.37	-0.34	0.10	1.08	0.20
45											
50											
55	NM_005902	Homo sapiens MAD (mothers against decapentapl egic, Drosophila) homolog 3 (MADH3), mRNA.	SMAD3	1.09	0.41	1.49	0.25	-1.10	0.89	1.73	0.10
60											
65											

5		/PROD=MA									
		D (mothers									
		against									
		decapentapl									
10		egic,Drosoph									
		ila) homolog									
		3									
		/FL=gb:U680									
		19.1									
15		gb:U76622.1									
		gb:NM_0059									
		02.1									
20	AA777512	Homo	CAMK2D	2.27	0.15	3.67	0.47	1.67	0.08	3.99	0.51
		sapiens									
		cDNA:									
		FLJ21715									
25		fis, clone									
		COL10287,									
		highly similar									
		to AF071569									
30		Homo									
		sapiens									
		multifunction									
		al									
35		calciumcalm									
		odulin-									
		dependent									
		protein									
40		kinase II									
		delta2									
		isoform									
45	AI130705	mRNA									
		ESTs,	FAM89A	0.80	0.00	1.96	0.99	0.43	0.18	2.70	0.97
		Weakly									
		similar to									
50		A46302									
		PTB-									
		associated									
		splicing									
55		factor, long									
		form									
		(H.sapiens)									
60	NM_007061	Homo	CDC42EP1	1.86	0.11	2.51	0.29	0.16	0.27	2.00	0.17
		sapiens									
		serum									
		constituent									
		protein									
65		(MSE55),									
		mRNA.									

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

5		E-like inhibitory protein short form /FL=gb:U970 75.1									
10	AF133207	Homo sapiens protein kinase (H11) mRNA, complete cds. /PROD=prot ein kinase /FL=gb:AF13 3207.1	HSPB8	2.54	0.07	4.47	0.62	2.22	0.04	4.88	0.58
15											
20											
25	NM_005979	Homo sapiens S100 calcium- binding protein A13 (S100A13), mRNA. /PROD=S10 0 calcium- binding protein A13 /FL=gb:BC00 0632.1 gb:NM_0059 79.1	S100A13	4.10	0.11	5.67	1.17	3.92	0.02	6.81	1.20
30											
35											
40											
45	AL040178	ESTs	PEAR1	-0.87	0.08	0.51	0.36	-1.16	0.30	0.48	0.26
	AL117523	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434H 0350 (from clone DKFZp434H 0350); partial cds. /PROD=hypo thetical protein	SAMD4A	0.47	0.06	1.59	0.61	-0.24	0.30	1.28	0.53
50											
55											
60											
65	AB051826	Homo sapiens	RHOU	0.55	0.23	2.18	0.61	0.17	0.29	2.73	0.65

5	hG28K										
	mRNA for										
	GTP-binding										
	protein like										
	1, complete										
10	cds.										
	/PROD=GTP										
	-binding										
	protein like 1										
15	/FL=gb:AF28										
	2258.1										
	gb:NM_0212										
	05.1										
20	gb:AB05182										
	6.1										
	BC005961	Homo	PTHLH	-3.33	0.69	-0.88	0.81	-2.86	0.77	-1.97	1.36
25	sapiens,										
	parathyroid										
	hormone-like										
	hormone,										
30	clone										
	MGC:14611,										
	mRNA,										
	complete										
35	cds.										
	/PROD=para										
	thyroid										
	hormone-like										
40	hormone										
	/FL=gb:BC00										
	5961.1										
45	AI670948	ESTs	NODAL	2.13	0.04	2.37	0.22	0.42	0.13	2.78	0.38
	AI685060	caldesmon 1	CALD1	4.34	0.33	6.42	0.73	4.45	0.09	5.63	0.82
	/FL=gb:M641										
	10.1										
50	gb:NM_0043										
	42.2										
	BF797381	Homo	CAMK2D	3.16	0.13	4.91	0.65	3.10	0.10	5.49	0.61
	sapiens										
55	cDNA:										
	FLJ21715										
	fis, clone										
60	COL10287,										
	highly similar										
	to AF071569										
	Homo										
65	sapiens										
	multifunction										
	al										

5		calciumcalm odulin- dependent protein kinase II delta2									
10		isoform mRNA									
	AF026219	Homo sapiens HP protein (HP) mRNA, complete cds. /PROD=HP protein /FL=gb:AF02 6219.1 gb:AF03511 9.1 gb:NM_0060 94.2	DLC1	1.16	0.07	2.28	1.13	0.61	0.09	3.52	0.84
15											
20											
25											
30	AK024480	Homo sapiens mRNA for FLJ00074 protein, partial cds. /PROD=FLJ 00074 protein	LOC126917	1.64	0.11	2.86	0.24	1.19	0.06	2.58	0.25
35											
40											
	N29837	ESTs	LIX1	-1.43	0.15	-0.11	0.33	-1.50	0.45	-0.22	0.22
45	AK001022	Homo sapiens cDNA FLJ10160 fis, clone HEMBA1003 545, highly similar to INSULIN GENE ENHANCER PROTEIN ISL-2.	ISL2	0.41	0.34	2.14	0.39	0.32	0.08	1.57	0.49
50											
55											
60	NM_000047	Homo sapiens arylsulfatase E	ARSE	1.37	0.11	2.45	1.03	0.59	0.05	3.18	1.23
65											

5		(chondrodys plasia punctata 1) (ARSE), mRNA. /PROD=aryls									
10		ulfatase E precursor /FL=gb:X835 73.1									
15		gb:NM_0000 47.1									
	NM_006379	Homo	SEMA3C	0.24	0.25	1.08	0.00	-0.34	0.05	0.86	0.18
20		sapiens sema domain, immunoglob ulin domain									
25		(Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin)									
30		3C (SEMA3C), mRNA. /PROD=sem									
35		a domain, immunoglob ulin domain									
40		(Ig), shortbasic domain, secreted, (semaphorin)									
45		3C /FL=gb:NM_ 006379.1									
50		gb:AB00022 0.1									
55	NM_007127	Homo	VIL1	0.31	0.30	1.92	0.49	0.02	0.22	2.54	0.68
		sapiens villin 1 (VIL1), mRNA. /PROD=villin									
60		1 /FL=gb:NM_ 007127.1									
65	U76549	Human	KRT8	5.41	0.16	5.87	0.56	3.79	0.05	6.34	0.57

5		cytokeratin 8 mRNA, complete cds. /PROD=cyto keratin 8									
10		/FL=gb:BC00 0654.1 gb:U76549.1 gb:Nm_0022 73.1 gb:M26324.1 gb:M34225.1									
20	NM_004904	Homo sapiens cAMP response element- binding protein CRE- BPα (H_GS165L1 5.1), mRNA. /PROD=cAM P response element- binding protein CRE- BPα /FL=gb:Nm_ 004904.1 gb:L05911.1	CREB5	0.92	0.23	1.84	0.37	0.00	0.06	1.21	0.80
25											
30											
35											
40											
45	AW082836	ESTs, Weakly similar to B34087 hypothetical protein (H.sapiens)	WNK4	-1.17	0.26	0.98	0.38	-0.97	0.20	0.05	0.86
50											
55	BE568134	death receptor 6 /FL=gb:Nm_ 014452.1 gb:AF06886 8.1	TNFRSF21	4.76	0.06	5.90	0.54	3.94	0.08	6.28	0.58
60											
65	NM_002845	Homo sapiens protein tyrosine	PTPRM	2.50	0.10	3.43	0.46	1.34	0.19	3.76	0.50

5		phosphatase									
		, receptor									
		type, M									
		(PTPRM),									
		mRNA.									
10		/PROD=prot									
		ein tyrosine									
		phosphatase									
		, receptor									
15		type,									
		mupolypepti									
		de									
		/FL=gb:NM_									
20		002845.1									
	AI949419	ESTs	-	-0.11	0.21	1.72	0.64	-0.47	0.01	2.39	0.77
	AK024680	Homo	NRP2	0.42	0.02	2.65	0.17	0.98	0.09	2.86	0.17
		sapiens									
25		cDNA:									
		FLJ21027									
		fis, clone									
		CAE071110.									
30		/FL=gb:NM_									
		018534.1									
	BE542563	ESTs	LOC643277	2.20	0.10	0.54	1.49	-3.73	0.40	-1.74	1.96
	AW005572	putative 47	ANKS1B	-1.21	0.52	-0.24	0.82	-1.19	0.55	1.05	0.64
35		kDa protein									
	AW665892	paternally	MFAP5	-3.87	0.82	-1.56	1.24	-2.40	0.24	-3.49	2.10
		expressed 3									
40	NM_006206	Homo	PDGFRA	0.92	0.18	2.34	0.74	0.72	0.09	3.18	0.62
		sapiens									
		platelet-									
		derived									
45		growth factor									
		receptor,									
		alpha									
		polypeptide									
50		(PDGFRA),									
		mRNA.									
		/PROD=plate									
		let-derived									
55		growth factor									
		receptor,									
		alphapolype									
		ptide									
60		/FL=gb:NM_									
		006206.1									
		gb:M21574.1									
	NM_002425	Homo	MMP10	-1.21	0.70	1.21	0.88	-0.37	0.28	0.52	0.45
65		sapiens									

5		matrix									
		metalloprotei									
		nase 10									
		(stromelysin									
		2) (MMP10),									
		mRNA.									
10		/PROD=matr									
		ix									
		metalloprotei									
		nase 10									
15		preproprotei									
		n									
		/FL=gb:BC00									
		2591.1									
20		gb:NM_0024									
		25.1									
	NM_004338	Homo	C18orf1	-0.79	0.22	-0.09	0.39	-1.57	0.43	0.50	0.02
		sapiens									
25		chromosome									
		18 open									
		reading									
30		frame 1									
		(C18ORF1),									
		mRNA.									
		/PROD=chro									
35		mosome 18									
		open reading									
		frame 1									
		/FL=gb:NM_									
40		004338.1									
		gb:AF00942									
		6.1									
	AF052094	Homo	EPAS1	0.75	0.12	2.28	0.19	0.42	0.21	1.74	0.33
45		sapiens									
		clone 23698									
		mRNA									
		sequence.									
50		/FL=gb:U516									
		26.1									
		gb:U81984.1									
		gb:NM_0014									
55		30.1									
	BF126155	ESTs	S100A10	-0.32	0.25	1.24	0.28	-0.65	0.33	1.02	0.44
	AI860212	phosphoprot	PAG1	-0.17	0.22	1.37	0.28	-0.40	0.23	1.25	0.13
		ein									
60		associated									
		with GEMs									
		/FL=gb:AF24									
65		0634.1									

5											
10											
15											
20											

5	/PROD=APR										
	-1 protein										
	/FL=gb:AF32										
	0912.1										
	gb:AF14323										
10	5.3										
	gb:Nm_0140										
	61.1										
	AL577531	caldesmon 1	CALD1	5.79	0.06	6.06	0.75	4.07	0.06	5.13	0.77
	/FL=gb:M641										
15	10.1										
	gb:Nm_0043										
	42.2										
	AI082237	proprotein	TAGLN	1.38	0.21	3.20	0.33	1.55	0.15	2.74	0.44
	convertase										
20	subtilisin-like										
	n type 7										
	BF055171	acyl-	ACOX3	0.88	0.22	2.52	0.83	1.27	0.06	3.73	0.81
	Coenzyme A										
	oxidase 3,										
25	pristanoyl										
	/FL=gb:Nm_										
	003501.1										
	AF231124	Homo	SPOCK1	2.84	0.09	4.17	0.95	2.71	0.07	5.38	1.00
	sapiens										
30	testican-1										
	mRNA,										
	complete										
	cds.										
	/PROD=testi										
35	can-1										
	/FL=gb:Nm_										
	004598.1										
	gb:AF23112										
	4.1										
40	AA588092	ESTs	SLC40A1	-1.53	0.23	-0.94	0.51	-2.42	0.33	0.27	0.27
	AK094809	Homo	RASGRF2	3.20	0.05	3.64	0.77	1.95	0.24	2.95	0.74
	sapiens										
	cDNA										
	FLJ37490										
45	fis, clone										
	BRAWH201										
	4934, highly										
	similar to										
	GUANINE										
50	NUCLEOTID										
	E										
	RELEASING										
	PROTEIN.										
55											
60											
65											

	NM_013959	Homo sapiens neuregulin 1 (NRG1), transcript variant SMDF, mRNA. /PROD=neur egulin 1 isoform SMDF /FL=gb:L418 27.1 gb:NM_0139 59.1	NRG1	1.50	0.20	3.22	0.68	1.34	0.13	3.78	0.75
5											
10											
15											
20											
	NM_004887	Homo sapiens small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (BRAK) (SCYB14), mRNA. /PROD=smal l inducible cytokine subfamily B(Cys-X-Cys), member 14 (BRAK) /FL=gb:AF14 4103.1 gb:AF10691 1.1 gb:AF07395 7.1 gb:BC00351 3.1 gb:NM_0048 87.1	CXCL14	0.70	0.07	1.70	0.37	-0.15	0.11	2.36	0.63
25											
30											
35											
40											
45											
50											
55											
60	T77995	Homo sapiens cDNA FLJ13392	-	-0.20	0.16	0.82	0.50	-1.70	0.24	1.17	0.06
65											

		fis, clone									
		PLACE1001									
5		280									
	NM_030971	Homo sapiens	SFXN3	-0.43	0.59	-0.01	0.78	-1.92	0.17	-1.25	0.43
		similar to rat									
10		tricarboxylate carrier-like									
		protein									
15		(BA108L7.2),									
		mRNA.									
		/PROD=similar to rat									
20		tricarboxylate carrier-like									
		protein									
		/FL=gb:NM_030971.1									
25	H25097	KIAA1350	USP53	3.25	0.05	4.57	0.20	2.96	0.04	4.47	0.13
		protein									
	NM_004932	Homo sapiens	CDH6	-3.58	1.16	-1.12	0.51	-2.14	0.63	-0.88	0.39
30		cadherin 6, type 2, K-									
		cadherin									
35		(fetal kidney)									
		(CDH6),									
		mRNA.									
40		/PROD=cadherin 6, type									
		2, K-									
		cadherin									
45		(fetal kidney)									
		/FL=gb:D31784.1									
		gb:NM_004932.1									
50	N21426	hypothetical protein	SYTL2	2.41	0.09	3.44	1.22	1.70	0.06	2.02	1.21
		FLJ20163									
55	AA234096	KIAA0963	MGC16121	0.38	0.16	1.74	0.63	-0.13	0.04	1.10	0.65
		protein									
	AV734843	hypothetical protein	OBFC2A	0.62	0.06	1.62	0.79	0.09	0.02	1.25	0.73
		FLJ22833									
60	AL519710	immunoglobulin	IGSF4	3.86	0.02	4.95	0.26	3.22	0.12	4.66	0.27
		superfamily, member 4									
65											

5		/FL=gb:NM_014333.1 gb:AF132811.1									
	N32834	HIV-1 rev	-	-0.28	0.36	1.58	0.97	-0.23	0.18	0.33	1.17
10		binding protein 2									
	AF132811	Homo sapiens	IGSF4	2.23	0.07	3.85	0.28	2.17	0.10	3.58	0.34
15		nectin-like protein 2 (NECL2) mRNA, complete cds.									
20		/PROD=nectin-like protein 2									
25		/FL=gb:NM_014333.1 gb:AF132811.1									
30	J04177	Cluster Incl.	COL11A1	3.28	0.22	4.44	1.22	2.32	0.03	3.03	1.31
35		J04177:Human alpha-1 type XI collagen (COL11A1) mRNA, complete cds									
40		/cds=(161,5581)									
45		/gb=J04177 /gi=179729 /ug=Hs.82772 /len=6158									
50	AI982754	clusterin	CLU	0.17	0.14	1.86	0.94	0.39	0.13	0.97	0.83
55		(complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotei									
60											
65											

		n J)									
5	NM_003501	Homo sapiens acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl (ACOX3), mRNA.	ACOX3	0.43	0.32	2.10	0.91	0.79	0.08	3.19	0.95
10		/PROD=acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl									
15		/FL=gb:NM_003501.1									
20	AF144103	Homo sapiens NJAC protein (NJAC) mRNA, complete cds.	CXCL14	1.69	0.13	2.16	0.55	0.40	0.21	2.73	0.69
25		/PROD=NJA C protein									
30		/FL=gb:AF144103.1									
35		gb:AF10691.1									
40		gb:AF07395.7.1									
45		gb:BC00351.3.1									
		gb:NM_004887.1									
50	NM_005451	Homo sapiens enigma (LIM domain protein) (ENIGMA), mRNA.	PDLIM7	2.58	0.12	3.12	0.50	1.30	0.16	2.65	0.37
55		/PROD=enigma protein									
60		/FL=gb:BC001093.1									
65		gb:NM_005451.2									
		gb:AF26520.9.1									

5	NM_004472	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA.	FOXD1	-0.85	0.80	2.04	0.55	0.71	0.23	1.70	0.74
10		/PROD=fork head box D1									
15		/FL=gb:U59832.1									
		gb:NM_004472.1									
20	AF332197	Homo sapiens adult SIX2 (SIX2) mRNA, complete cds.	SIX2	0.36	0.24	0.72	0.12	-0.44	0.35	1.05	0.15
25		/PROD=SIX2									
30		/FL=gb:AF332197.1									
		gb:NM_016932.1									
		gb:AF136940.1									
35	AB046817	Homo sapiens mRNA for KIAA1597 protein, partial cds.	SYTL2	2.88	0.17	4.09	1.09	2.50	0.05	3.12	1.03
40		/PROD=KIAA1597									
45		protein									
	AK093435	Homo sapiens cDNA FLJ36116 fis, clone TESTI20223	FLJ36116	4.75	0.02	4.59	1.53	2.46	0.18	6.15	1.46
50		38.									
55	NM_004815	Homo sapiens PTPL1-associated RhoGAP 1 (PARG1), mRNA.	ARHGAP29	2.18	0.02	3.18	0.82	1.69	0.03	4.15	0.69
60		/PROD=PTP									
65		L1-									

		associated									
		RhoGAP 1									
5		/FL=gb:U909									
		20.1									
		gb:NM_0048									
		15.1									
10	BG028597	ESTs	COL11A1	0.19	0.02	1.61	1.02	-0.11	0.38	0.48	1.09
	AB019562	Homo	SPP1	0.58	0.14	2.79	1.07	1.10	0.02	1.21	1.06
		sapiens									
		mRNA									
15		expressed									
		only in									
		placental									
20		villi, clone									
		SMAP41.									
	NM_002346	Homo	LY6E	3.54	0.06	3.92	1.16	1.81	0.23	4.93	1.39
		sapiens									
25		lymphocyte									
		antigen 6									
		complex,									
		locus E									
30		(LY6E),									
		mRNA.									
		/PROD=lymp									
		hocyte									
35		antigen 6									
		complex,									
		locus E									
		/FL=gb:U423									
40		76.1									
		gb:NM_0023									
		46.1									
		gb:U56145.1									
45	BF589515	ESTs	TMEM16D	0.63	0.24	1.94	0.85	0.90	0.20	1.47	0.75
	AL037401	nuclear	NR2F2	-2.00	0.30	0.58	0.67	-2.19	0.13	0.82	0.66
		receptor									
		subfamily 2,									
50		group F,									
		member 2									
		/FL=gb:M644									
		97.1									
55	NM_000783	Homo	CYP26A1	3.92	0.27	6.28	1.06	6.29	0.09	7.31	0.98
		sapiens									
		cytochrome									
60		P450,									
		subfamily									
		XXVIA,									
		polypeptide									
65		1									

5		(CYP26A1), mRNA. /PROD=cyto chrome P450, subfamily XXVIA, polypeptide 1 /FL=gb:NM_ 000783.1 gb:AF00541 8.1									
10											
15											
20	U16307	Human glioma pathogenesi s-related protein (GliPR) mRNA, complete cds. /PROD=glio ma pathogenesi s-related protein /FL=gb:NM_ 006851.1 gb:U16307.1	GLIPR1	-0.11	0.03	1.16	0.95	-0.46	0.77	0.35	0.77
25											
30											
35											
40	NM_001233	Homo sapiens caveolin 2 (CAV2), mRNA. /PROD=cave olin 2 /FL=gb:AF03 5752.1 gb:BC00525 6.1 gb:NM_0012 33.1	CAV2	4.07	0.07	4.42	0.90	2.82	0.08	3.44	0.85
45											
50											
55											
60	AA211909 AK057525	ESTs Homo sapiens cDNA FLJ32963 fis, clone	C20orf100 -	0.62 2.17	0.17 0.13	1.93 2.97	1.00 0.77	-0.21 0.97	0.11 0.08	0.72 3.68	0.99 0.60
65											

		TESTI20084									
		05.									
5	BF344237	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564N1116 (from clone DKFZp564N1116)	-	-2.82	0.20	-0.92	0.64	-0.73	0.67	-1.25	1.03
10											
15	NM_014481	Homo sapiens apurinicapyrimidinic endonuclease (APEX2)-like 2 protein (APEXL2), mRNA. /PROD=apurinicapyrimidinic endonuclease (APEXnuclease)-like 2 protein /FL=gb:AB049211.1 gb:NM_014481.1 gb:BC002959.1 gb:AB021260.1 gb:AF119046.1	APEX2	2.76	0.15	3.18	0.80	1.57	0.11	3.91	0.93
20											
25											
30											
35											
40											
45											
50											
55	AI912583	HIV-1 rev binding protein 2	KRR1	1.10	0.23	2.68	1.04	1.31	0.06	1.53	1.01
60	BI254089	Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD50E03	ADAMTS5	-1.40	0.26	-0.01	0.31	-1.71	0.64	-0.79	0.52
65	BF197655	caveolin 2 /FL=gb:AF035752.1	CAV2	3.51	0.10	3.54	0.94	2.32	0.09	2.70	0.85

		gb:BC00525									
		6.1									
5		gb:NM_0012									
		33.1									
	NM_001955	Homo sapiens endothelin 1 (EDN1), mRNA. /PROD=end othelin 1 /FL=gb:NM_001955.1	EDN1	2.84	0.15	2.97	0.95	1.01	0.14	1.75	1.03
10											
	NM_003319	Homo sapiens titin (TTN), mRNA. /PROD=titin /FL=gb:NM_003319.1	TTN	1.28	0.19	0.62	0.86	-0.92	0.42	2.00	0.55
20											
	BE965029	Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126	MICAL2	0.60	0.21	1.95	0.64	0.21	0.19	0.83	0.78
30											
	AI452457	ESTs	C1orf168	-1.48	0.53	0.02	0.93	-1.87	0.07	1.05	0.94
	AI733465	collagen, type IX, alpha 2 /FL=gb:NM_001852.1	COL9A2	0.96	0.13	1.99	1.00	1.17	0.14	2.94	0.86
40											
	NM_006103	Homo sapiens epididymis-specific, whey-acidic protein type, four-disulfide core; putative ovarian carcinoma marker (HE4), mRNA. /PROD=epidi	WFDC2	4.02	0.11	5.11	1.05	3.39	0.04	6.19	1.10
45		dymis-specific,									
50											
55											
60											
65											

5		whey-acidic protein type,four- disulfide core; putative									
10		ovarian carcinoma marker /FL=gb:NM_									
15	NM_017540	00610 Homo sapiens hypothetical protein DKFZp586H 0623 (DKFZp586H 0623), mRNA. /PROD=hypo	GALNT10	1.46	0.18	2.68	0.78	0.97	0.23	3.47	0.82
20		thetical protein DKFZp586H 0623 /FL=gb:NM_									
25		017540.1 phosphoserine aminotransferase	SLC1A4	-0.65	0.09	0.38	0.80	-0.63	0.62	-0.72	0.09
30		ne aminotransferase									
35	W72527										
40	NM_003468	Homo sapiens frizzled (Drosophila) homolog 5 (FZD5), mRNA. /PROD=frizzled 5 /FL=gb:NM_	FZD5	1.35	0.26	3.43	1.21	1.45	0.10	4.43	1.16
45		003468.1 gb:U43318.1									
50		ESTs, Weakly similar to RTA RAT PROBABLE G PROTEIN-	MRGPRF	2.34	0.18	3.62	1.02	2.11	0.11	2.87	0.84
55	H15920										
60											
65											

5		COUPLED RECEPTOR RTA (R.norvegicus)									
10	U83508	Human angiopoietin- 1 mRNA, complete cds. /PROD=angi opietin-1 /FL=gb:NM_ 001146.1 gb:D13628.1 gb:U83508.1	ANGPT1	1.06	0.11	1.49	0.44	-0.32	0.27	0.32	0.79
15											
20	AF043179	Homo sapiens T cell receptor beta chain (TCRBV13S 1- TCRBJ2S1) mRNA, complete cds. /PROD=T cell receptor beta chain /FL=gb:AF04 3179.1	PRSS1	2.42	0.12	3.07	0.81	1.71	0.10	2.30	0.60
25											
30											
35											
40	AU157541	hypothetical protein FLJ22833 /FL=gb:NM_ 022837.1	-	1.39	0.08	2.12	0.42	0.55	0.18	1.41	0.77
45											
50	AF114264	Homo sapiens clone HH409 unknown mRNA. /PROD=unkn own	NEXN	1.37	0.21	2.86	0.51	1.72	0.16	1.96	0.76
55											
60	BE965029	Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126	MICAL2	1.58	0.19	2.58	0.51	1.32	0.13	1.40	0.74
65											

5	AB028976	Homo sapiens mRNA for KIAA1053 protein, partial cds.	SAMD4A	2.89	0.08	3.65	0.66	2.04	0.17	2.78	0.81
10		/PROD=KIAA1053 protein									
15	AI670862	ESTs, Weakly similar to A49134 Ig kappa chain V-I region (H.sapiens)	FOSL2	0.17	0.21	2.05	0.57	0.45	0.16	1.18	0.65
20											
25	L03203	Human peripheral myelin protein 22 (GAS3) mRNA, complete cds.	PMP22	0.37	0.24	1.95	0.84	0.31	0.26	2.77	0.91
30		/PROD=peripheral myelin protein 22									
35		/FL=gb:L03203.1									
40	AI571798	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA	0.89	0.06	-0.54	0.26	-3.00	0.89	-2.58	0.87
45											
50	X57348	Cluster Incl. X57348:H.sapiens mRNA (clone 9112) /cds=(165,911) /gb=X57348 /gi=23939 /ug=Hs.184510 /len=1407	-	2.94	0.04	4.07	0.41	2.70	0.08	3.69	0.41
55											
60	AF051851	Homo sapiens supervillin mRNA, complete	SVIL	2.03	0.18	2.28	0.62	1.13	0.20	1.71	0.69
65											

5	cds.										
	/PROD=supe										
	rvillin										
	/FL=gb:AF05										
	1851.1										
10	gb:Nm_0031										
	74.2										
	gb:AF05185										
	0.1										
	M95929	Human	-	0.07	0.43	1.27	0.58	-0.02	0.19	0.64	0.61
15	homeobox										
	protein										
	(PHOX1)										
	mRNA, 3										
	end.										
20	/PROD=hom										
	eobox										
	protein										
	BG251266	FOS-like	FOSL1	1.94	0.06	2.41	0.46	1.25	0.05	1.93	0.36
	antigen-1										
25	/FL=gb:Nm_										
	005438.1										
	AW298375	ESTs	-	-0.40	0.30	0.46	0.63	-0.09	0.20	-0.58	1.07
	NM_004362	Homo	CLGN	0.90	0.30	1.95	0.96	0.69	0.11	3.11	1.01
	sapiens										
30	calmegin										
	(CLGN),										
	mRNA.										
	/PROD=calm										
	egin										
35	/FL=gb:Nm_										
	004362.1										
	gb:D86322.1										
	AF001540	calcineurin-	-	0.10	0.15	2.84	0.70	0.42	0.44	1.64	0.39
	binding										
40	protein										
	calsarcin-1										
	NM_001191	Homo	BCL2L1	1.21	0.22	0.58	0.35	-1.89	0.35	-1.09	1.03
	sapiens										
	BCL2-like 1										
45	(BCL2L1),										
	mRNA.										
	/PROD=BCL										
	2-like 1										
	/FL=gb:Nm_										
50	001191.1										
	NM_003316	Homo	TTC3	3.90	0.15	5.15	0.98	3.68	0.12	6.19	0.97
	sapiens										
	tetra-tryptophan										
	protein										
55	tetra-tryptophan										
	protein										
	tetra-tryptophan										
	protein										
	tetra-tryptophan										
60	protein										
	tetra-tryptophan										
	protein										
	tetra-tryptophan										
	protein										
65	tetra-tryptophan										
	protein										
	tetra-tryptophan										
	protein										
	tetra-tryptophan										

5	ide repeat domain 3 (TTC3), mRNA. /PROD=tetra									
10	tricopeptide repeat domain 3 /FL=gb:D842									
15	95.1 gb:NM_0033									
	16.1									
	L16895 Human lysyl -	-0.66	0.24	0.53	0.14	-0.63	0.15	0.14	0.19	
20	oxidase (LOX) gene, exon 7									
	AI912976 ESTs RASGRF2	3.13	0.08	4.05	0.56	2.66	0.16	3.54	0.64	
25	NM_012242 Homo DKK1	0.47	0.29	0.73	0.04	0.49	0.51	1.09	0.23	
	sapiens dickkopf (Xenopus laevis)									
30	homolog 1 (DKK1), mRNA. /PROD=dick									
35	kopf (Xenopus laevis)									
40	homolog 1 /FL=gb:AF17									
	7394.1 gb:NM_0122									
45	42.1 gb:AF12756									
	3.1									
	AL096776 Human DNA -	1.94	0.07	3.41	0.16	2.40	0.07	3.40	0.14	
50	sequence from clone RP4-646B12									
	on									
55	chromosome 1q42.11- 42.3.									
	Contains an FTH1 (ferritin, heavy polypeptide									
60										
65										

5		1) (FTHL6)									
		pseudogene,									
		the gene for									
		a novel Ras									
		family									
10		protein,									
		ESTs, STSs,									
		GSSs and a									
15		putative CpG									
		island									
		/FL=gb:AF28									
		2258.1									
		gb:NM_0212									
20	BC005997	Homo	-	1.12	0.25	0.95	0.44	2.04	0.07	1.51	0.22
		sapiens,									
		clone									
		MGC:14801,									
25		mRNA,									
		complete									
		cds.									
		/PROD=Unk									
30		nown									
		(protein for									
		MGC:14801)									
		/FL=gb:BC00									
35	AF074979	5997.1									
		Homo	RGS20	-0.52	0.18	-0.04	0.38	-1.30	0.09	-0.34	0.13
		sapiens									
		regulator of									
40		G protein									
		signaling-Z									
		(RGSZ1)									
45		mRNA,									
		complete									
		cds.									
		/PROD=regu									
50		lator of G									
		protein									
		signaling									
		/FL=gb:AF06									
55		0877.2									
		gb:AF07497									
		9.1									
		gb:NM_0037									
60	BF060767	02.2									
		ESTs	ADAMTS5	-0.36	0.15	0.80	0.33	0.22	0.14	0.40	0.56
	AU151151	Homo	LEPR	1.72	0.18	2.38	0.80	1.85	0.10	1.71	0.69
		sapiens									
65		cDNA									

5		FLJ13536									
		fis, clone									
		PLACE1006									
		521									
	L27624	Homo sapiens	TFPI2	3.77	0.06	3.57	0.77	2.59	0.11	2.44	0.89
10		tissue factor									
		pathway									
		inhibitor-2									
15		mRNA,									
		complete									
		cds.									
		/PROD=tissu									
20		e factor									
		pathway									
		inhibitor-2									
		/FL=gb:D299									
25		92.1									
		gb:L27624.1									
		gb:NM_0065									
		28.1									
30		gb:BC00533									
		0.1									
	NM_003174	Homo sapiens	SVIL	3.15	0.09	3.68	0.44	2.91	0.01	3.27	0.46
35		supervillin									
		(SVIL),									
		transcript									
		variant 1,									
40		mRNA.									
		/PROD=supe									
		rvillin,									
		isoform 1									
45		/FL=gb:AF05									
		1851.1									
		gb:NM_0031									
		74.2									
50		gb:AF05185									
		0.1									
	AF052127	Homo sapiens	RELN	-3.13	1.04	-1.36	0.26	-0.88	0.17	-0.40	0.11
55		clone 23850									
		mRNA									
		sequence.									
	AL031290	Human DNA	-	0.38	0.06	1.39	0.46	0.40	0.05	0.95	0.44
60		sequence									
		from clone									
		774I24 on									
65		chromosome									

5	1q24.1-24.3									
	Contains									
	protein									
	similar to									
	pregnancy-									
	associated									
10	plasma									
	protein A									
	precursor									
15	neuronal									
	migration									
	protein									
	astrotactin,									
20	ESTs, STS									
	and GSS									
	AI129628 ESTs	SAMD3	-0.30	0.18	-0.01	0.25	0.72	0.06	0.17	0.21
	NM_016206 Homo	VGLL3	-0.39	0.36	0.05	1.03	-0.31	0.29	-1.05	1.01
25	sapiens									
	colon									
	carcinoma									
	related									
30	protein									
	(LOC51159),									
	mRNA.									
	/PROD=colo									
35	n carcinoma									
	related									
	protein									
	/FL=gb:NM_									
40	016206.1									
	gb:AF09950									
	5.1									
	BE348291 ESTs	-	1.62	0.06	-0.19	0.98	-3.65	0.10	-2.75	1.84
45	AW242720 Homo	LOC143381	-1.62	0.34	-1.20	0.94	-0.08	0.24	-0.08	0.77
	sapiens									
	cDNA									
	FLJ10561									
50	fis, clone									
	NT2RP2002									
	672									
	NM_001146 Homo	ANGPT1	1.86	0.06	2.09	0.81	1.10	0.16	0.87	1.05
55	sapiens									
	angiopoietin									
	1 (ANGPT1),									
	mRNA.									
60	/PROD=angi									
	opoietin 1									
	/FL=gb:NM_									
65	001146.1									

		gb:D13628.1									
		gb:U83508.1									
5	AU152579	Homo sapiens cDNA FLJ13034 fis, clone NT2RP3001232	PCSK5	2.41	0.14	2.47	0.86	2.04	0.15	1.11	1.20
10											
15	NM_006200	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (PCSK5), mRNA. /PROD=proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	PCSK5	3.01	0.21	2.88	0.92	2.28	0.11	1.52	1.25
20											
25											
30		/FL=gb:U56387.2 gb:NM_006200.1									
35	BF342661	KIAA0036 gene product	MAP2	-0.77	0.30	-0.19	0.44	0.12	0.17	-2.21	1.64
40	AF063824	Homo sapiens trp-related protein 4 truncated variant delta mRNA, complete cds. /PROD=trp-related protein 4 truncated variant delta	TRPC4	-3.03	0.39	0.05	0.49	1.28	0.17	0.21	0.92
45											
50											
55		/FL=gb:AF063824.1									
60	AA723810	cDNA for differentially expressed CO16 gene /FL=gb:BC00	LY6K	0.07	0.20	-0.13	1.23	0.15	0.14	-0.38	1.27
65											

		1291.1									
	N29877	interleukin -		1.94	0.13	0.51	0.48	0.78	0.64	-1.57	0.65
5	NM_007287	14 Homo sapiens membrane metallo- endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinas e, CALLA, CD10) (MME), transcript variant 1 bis, mRNA, /PROD=me mbrane metallo- endopeptidase /FL=gb:NM_007288.1 gb:NM_007287.1 gb:J03779.1	MME	2.59	0.03	1.81	0.40	1.89	0.21	2.14	0.30
10											
15											
20											
25											
30											
35											
40	AB050856	Homo sapiens beta3GalNAcT-1 mRNA for globoside synthase, complete cds, clone:type 2. /PROD=globoside synthase /FL=gb:AB050856.1	B3GALNT1	1.39	0.05	0.20	0.22	-0.13	0.21	-0.10	0.17
45											
50											
55	AI827455	Homo sapiens cDNA: FLJ21042 fis, clone CAE11204	BCL6B	0.65	0.31	0.62	0.21	1.07	0.24	0.90	0.29
60											
65	AF017987	Homo sapiens SFRP1	SFRP1	4.15	0.22	4.37	1.24	6.02	0.06	5.74	1.01

5	sapiens secreted apoptosis related protein 2 (SARP2)										
10	mRNA, complete cds. /PROD=secr eted										
15	apoptosis related protein 2 /FL=gb:AF05 6087.1										
20	gb:NM_0030 12.2 gb:AF01798 7.1										
25	gb:AF00190 0.1										
30	AL117451 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586E 2317 (from clone DKFZp586E 2317).	C1orf108	-0.73	0.20	0.68	0.24	1.06	0.05	0.82	0.21	
35											
40	AW268357 ESTs, Highly similar to AF155116.1 NY-REN-60 antigen (H.sapiens)	USP32	0.73	0.20	0.36	0.19	0.70	0.03	0.09	0.18	
45	BE465243 ESTs	ARFGEF1	0.50	0.23	0.16	0.32	1.03	0.08	0.47	0.06	
	AA993400 ESTs	ADAL	0.89	0.22	0.48	0.28	0.83	0.10	0.29	0.43	
	AI970898 Cluster Incl.	ACACB	0.69	0.15	0.51	0.53	1.46	0.11	-0.87	0.83	
50	AI970898:wr 21c03.x1 Homo sapiens cDNA, 3 end /clone=IMAG E-2488324 /clone_end=										
55											
60											
65											

		3									
		/gb=AI97089									
5		8									
		/gi=5767724									
		/ug=Hs.2348									
		98 /len=382									
10	BG026457	ESTs,	KIAA1909	0.60	0.07	0.23	0.59	0.98	0.03	-2.11	1.28
		Weakly									
		similar to									
15		ALU5_HUM									
		AN ALU									
		SUBFAMILY									
		SC									
20		SEQUENCE									
		CONTAMIN									
		ATION									
		WARNING									
25		ENTRY									
		(H.sapiens)									
	BC041933	Homo	UBE3C	0.83	0.23	0.11	0.51	0.55	0.05	0.41	0.92
		sapiens,									
30		clone									
		IMAGE:5300									
		703, mRNA.									
35	AI638611	KIAA1373	STAMBPL1	2.20	0.17	1.37	0.58	2.32	0.08	-0.39	1.24
		protein									
	AI341686	ESTs, Highly	MTRF1	1.36	0.14	0.45	0.48	1.43	0.09	-1.09	0.99
		similar to									
40		RF1M_HUM									
		AN									
		MITOCHON									
		DRIAL									
45		PEPTIDE									
		CHAIN									
		RELEASE									
		FACTOR 1									
50		PRECURSO									
		R									
		(H.sapiens)									
	NM_003182	Homo	TAC1	1.89	0.20	1.65	0.13	2.46	0.09	1.48	0.26
55		sapiens									
		tachykinin,									
		precursor 1									
		(substance									
60		K, substance									
		P, neurokinin									
		1, neurokinin									
65		2,									
		neuromedin									

5		L, neurokinin alpha, neuropeptide K,neuropepti de gamma) (TAC1), transcript variant beta, mRNA. /PROD=tach ykinin 2 precursor, isoform beta /FL=gb:U3									
10											
15											
20	M80634	Human	FGFR2	3.63	0.06	2.25	0.39	2.79	0.19	2.07	0.84
25		keratinocyte growth factor receptor mRNA, complete cds. /PROD=kera tinocyte growth factor receptor /FL=gb:M806 34.1 gb:NM_0229 69.1 gb:M97193.1									
30											
35											
40	AK021452	Homo	ZNF521	-0.20	0.16	-1.15	1.12	1.31	0.05	0.36	0.18
45		sapiens cDNA FLJ11390 fis, clone HEMBA1000 561, weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 91.									
50											
55	AA541622	ESTs	SYNPO2	-0.49	0.30	-0.90	0.06	0.35	0.09	-2.58	0.93
	N50714	ESTs	-	-1.13	0.13	-1.34	0.52	0.10	0.12	-0.21	0.28
60	NM_002674	Homo	PMCH	0.62	0.24	1.10	0.48	1.64	0.03	0.09	0.80
65		sapiens pro- melanin- concentratin g hormone									

5		(PMCH), mRNA. /PROD=pro- melanin- concentratin g hormone									
10		/FL=gb:NM_ 002674.1 gb:M57703.1									
15	BM666010	Homo sapiens cDNA FLJ23803 fis, clone HEP22811.	LOC200169	1.36	0.16	0.45	0.74	1.49	0.12	-1.65	1.41
20	AI343467	Homo sapiens cDNA FLJ11041 fis, clone PLACE1004 405	-	-0.44	0.08	-1.50	0.82	1.11	0.19	-0.64	0.20
25	AA046424	ESTs, Weakly similar to YZ28_HUMA N HYPOTHETI CAL PROTEIN ZAP128 (H.sapiens)	ACOT4	0.58	0.27	-0.94	0.66	-1.08	0.38	-1.09	0.25
30		olfactomedin related ER localized protein	OLFM1	4.27	0.11	3.02	0.76	4.53	0.07	2.17	0.96
35	R38389	ESTs	-	2.03	0.22	0.72	0.42	2.36	0.06	0.01	0.97
40	BF724270	Homo sapiens chromogranin B (secretogranin 1) (CHGB), mRNA. /PROD=chro mogranin B precursor /FL=gb:BC00 0375.1	CHGB	1.40	0.18	0.50	0.75	1.66	0.05	-0.74	1.03
45	NM_001819										
50											
55											
60											
65											

5	AK026387	gb:NM_001819.1									
		Homo sapiens	-	0.03	0.28	-0.05	0.52	1.23	0.26	0.52	0.67
10	BF062139	cDNA: FLJ22734									
		fis, clone HUV00109.									
15		polymerase (RNA) III (DNA directed) (32kD)									
		/FL=gb:NM_006467.1									
20		gb:U93868.1									
		BG540454	ESTs	SCGB3A2	4.64	0.02	2.91	0.84	4.13	0.07	1.72
25	AI659533	ArgAbl- SORBS2									
		interacting protein									
30	AA531287	ArgBP2									
		ESTs	-	2.94	0.27	1.32	0.72	2.57	0.04	0.22	0.90
35	NM_013243	Homo sapiens									
		secretogranin III (SCG3), mRNA.									
40		/PROD=secretogranin III									
		/FL=gb:AF078851.1									
45	AI307586	gb:NM_013243.1									
		Homo sapiens	C10orf95	0.34	0.22	-1.15	0.24	-0.49	0.16	-3.61	0.99
50		mRNA; cDNA									
		DKFZp566H0124 (from clone									
55		DKFZp566H0124)									
		BC032004	Homo sapiens,	GRIA3	-0.02	0.23	-0.15	0.33	0.47	0.04	0.17
60		Similar to glutamate receptor,									
		ionotropic, AMPA 3,									
65											

5	AW205739	clone IMAGE:4753 474, mRNA.	TYW3	0.47	0.01	0.81	1.35	3.72	0.18	2.46	1.15
		ESTs,									
		Weakly similar to									
10		ORF YGL050w (S.cerevisiae)	SYT14	-0.01	0.17	-0.84	0.51	0.00	0.18	-3.88	1.64
		Homo sapiens hypothetical protein FLJ34198 (FLJ34198), mRNA, /FL=gb:NM_ 153262.1									
25	AA156873	albumin	PELO	0.77	0.12	-0.23	0.93	0.65	0.14	-2.33	1.01
	BC012375	Homo	ARSG	-0.46	0.48	-0.78	0.42	0.57	0.22	-0.41	0.55
30		sapiens, Similar to KIAA1001 protein, clone MGC:8996 IMAGE:3882 163, mRNA, complete cds. /PROD=Simil ar to KIAA1001 protein /FL=gb:AB02 3218.1 gb:NM_0149 60.1 gb:BC01237 5.1									
45											
50											
55	AA843242	ESTs	BNC2	2.12	0.37	1.03	0.47	2.89	0.06	0.43	0.80
	BF792954	ESTs	HDLBP	-1.53	1.04	-2.75	0.91	0.30	0.16	-0.72	0.26
60	AA780067	heparan sulfate (glucosamin e) 3-O- sulfotransfer ase 3B1	HS3ST3B1	0.41	0.19	0.30	0.61	2.61	0.18	0.78	0.60
65											

	AA909330	ESTs	RP1-32F7.2	0.98	0.17	-1.67	0.51	0.79	0.02	-0.38	0.12
5	AF141339	Homo sapiens	ZNF521	-0.41	0.12	-0.97	0.93	1.67	0.11	-0.31	0.80
10		LYST-interacting protein LIP3 mRNA, partial cds.									
15		/PROD=LYS T-interacting protein LIP3									
20	BF435123	bromodomai n and PHD finger containing, 3	-	2.28	0.17	1.31	0.51	2.70	0.12	1.30	1.00
25	AK056212	Homo sapiens cDNA FLJ31650 fis, clone NT2RI20040 79.	-	1.03	0.14	0.14	0.27	1.10	0.07	-1.41	0.51
30	NM_001446	Homo sapiens fatty acid binding protein 7, brain (FABP7), mRNA.	FABP7	2.07	0.15	0.74	0.29	2.20	0.04	1.08	0.16
35		/PROD=fatty acid binding protein 7, brain									
40		/FL=gb:U81235.1 gb:D88648.1 gb:U51338.1 gb:NM_001446.1 gb:D50373.1									
45											
50											
55	AW051591	ESTs, Moderately similar to unnamed protein product (H.sapiens)	RNF175	1.41	0.32	0.22	0.10	2.60	0.06	0.96	0.20
60											
65	BC041970	Homo sapiens,	C9orf122	0.74	0.03	-0.35	0.49	0.76	0.06	-2.31	1.25

5		clone IMAGE:5302 687, mRNA.									
	BC013077	Homo sapiens, clone IMAGE:3459 334, mRNA.	-	2.51	0.11	0.80	1.15	2.85	0.06	0.08	0.89
10											
	AW572379	ESTs	-	1.80	0.03	0.60	0.84	1.45	0.07	1.88	0.53
15	BE644917	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	XIST	-3.88	1.26	-0.54	1.28	1.94	0.13	-0.20	1.94
20											
	NM_171999	Homo sapiens sal- like 3 (Drosophila) (SALL3), mRNA. /PROD=sal- like 3 /FL=gb:NM_ 171999.1	SALL3	2.97	0.18	2.04	0.71	3.79	0.08	1.02	0.74
25											
30											
	AI654224	ESTs	-	0.46	0.36	0.14	0.44	1.03	0.07	-0.81	0.85
35	AA167449	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	XIST	-3.08	0.10	-0.47	2.59	4.59	0.07	2.80	1.86
40											
	BF977837	KIAA0527 protein	SUSD5	1.64	0.02	0.50	0.68	1.96	0.16	-1.52	1.66
45	BC029425	Homo sapiens, Similar to KIAA1275 protein, clone IMAGE:4616 553, mRNA.	FILIP1	-0.83	0.45	-0.03	0.62	0.76	0.20	-0.29	0.44
50											
	AI978754	ESTs	-	2.76	0.14	1.54	0.57	3.57	0.06	2.31	0.69
55	AA628440	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	XIST	0.18	0.13	1.42	1.52	4.80	0.02	3.01	1.50
60											
	L36861	L36861 /FEATURE= expanded_c	-	2.75	0.17	2.01	0.82	3.63	0.09	3.00	0.97
65											

		ds									
		/DEFINITIO									
5		N=HUMGCA									
		PB Homo									
		sapiens									
10		guanylate									
		cyclase									
		activating									
		protein									
15		(GCAP)									
		gene exons									
		1-4,									
		complete cds									
20	AW023227	ESTs	MKX	-0.91	0.60	-1.31	0.06	0.27	0.13	-2.90	0.52
	NM_021614	Homo	KCNN2	3.45	0.13	2.52	0.83	4.40	0.14	1.54	0.80
		sapiens									
		potassium									
25		intermediate									
		small									
		conductance									
30		calcium-									
		activated									
		channel,									
		subfamily N,									
35		member 2									
		(KCNN2),									
		mRNA.									
		/PROD=pota									
40		ssium									
		intermediate									
		small									
		conductance									
45		calcium-									
		activated									
		channel,									
		subfamily N,									
50		member 2									
		/FL=gb:NM_									
		021614.1									
		gb:AF23961									
55		3.1									
	NM_000956	Homo	PTGER2	-0.71	0.71	-0.73	0.57	0.63	0.33	-2.38	0.61
		sapiens									
60		prostaglandi									
		n E receptor									
		2 (subtype									
		EP2), 53kD									
65		(PTGER2),									
		mRNA.									

5	/PROD=pros										
	taglandin E										
	receptor 2										
	(subtype										
10	EP2), 53kD										
	/FL=gb:U194										
	87.1										
	gb:Nm_0009										
15	56.1										
	NM_013381	Homo	TRHDE	1.96	0.16	0.25	0.36	1.81	0.03	0.82	0.23
	sapiens										
	thyrotropin-										
20	releasing										
	hormone										
	degrading										
	ectoenzyme										
25	(TRHDE),										
	mRNA.										
	/PROD=thyr										
	otropin-										
30	releasing										
	hormone										
	degradingect										
	oenzyme										
35	/FL=gb:AF12										
	6372.1										
	gb:Nm_0133										
	81.1										
40	NM_016354	Homo	SLCO4A1	2.18	0.06	1.01	0.37	2.35	0.05	-0.91	1.23
	sapiens										
	solute carrier										
	family 21										
45	(organic										
	anion										
	transporter),										
	member 12										
50	(SLC21A12),										
	mRNA.										
	/PROD=orga										
	nic anion										
55	transporter										
	OATP-E										
	/FL=gb:AB03										
	1051.1										
60	gb:Nm_0163										
	54.1										
	gb:AF20507										
	2.1										
65	gb:AF18781										

5	BC028359	7.1 Homo sapiens, clone IMAGE:4828 836, mRNA.	ZNF141	-1.05	0.39	-0.59	0.65	1.25	0.17	-1.48	0.72
	AI193252	ESTs, Weakly similar to AF133270.1	LRRN6A	4.38	0.11	2.47	0.43	4.23	0.11	1.90	0.37
10		SLIT2 (H.sapiens)									
15	H09780	Human (clone CTG- A4) mRNA sequence	-	2.04	0.19	0.56	0.07	2.50	0.11	0.12	0.40
20											
25	BC040605	Homo sapiens, clone IMAGE:5271 039, mRNA.	-	2.64	0.16	1.61	1.08	3.59	0.09	0.45	1.14
30	AW057589	ESTs	-	-0.96	0.26	-2.77	0.81	0.25	0.24	-1.21	0.35
35	M31213	Human papillary thyroid carcinoma- encoded protein mRNA, complete cds. /FL=gb:M312 13.1	RET	0.42	0.10	-1.86	0.83	1.77	0.12	-0.64	0.15
40											
45	Z92546	Human DNA sequence from clone CTA-65A6 on chromosome 22q11-12 Contains the 3 part of the gene for the ortholog of rat CAIN (KIAA0330), the gene for a novel Sushi	-	0.58	0.13	-1.16	0.54	1.07	0.12	-1.27	0.14
50											
55											
60											
65											

		domain (SCR repeat) containing protein similar to Mucins, ESTs, an STS, GSSs and two...									
5											
10											
	AA974416	protein	PPP2R2B	4.02	0.16	3.52	0.23	5.22	0.07	3.12	0.15
15		phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform									
20											
25	AW138143	ESTs	SORBS2	3.44	0.16	2.89	0.88	4.47	0.10	1.88	1.15
	NM_014862	Homo sapiens KIAA0307 gene product (KIAA0307), mRNA. /PROD=KIA A0307 gene product /FL=gb:AB00 2305.1 gb:NM_0148 62.1	ARNT2	1.29	0.08	-0.68	0.97	2.00	0.08	0.02	0.24
30											
35											
40											
	AI765540	ESTs	-	1.28	0.22	0.07	0.39	1.50	0.07	-0.11	0.26
45	NM_018013	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10159 (FLJ10159), mRNA. /PROD=hypo thetical protein FLJ10159 /FL=gb:NM_ 018013.1	FLJ10159	1.30	0.21	0.38	0.39	2.89	0.02	0.62	0.21
50											
55											
60											
	BF382322	ESTs, Weakly similar to unnamed	-	-0.40	0.09	-2.09	0.67	-0.12	0.08	-1.73	0.50
65											

5	AV699347	protein product (H.sapiens) nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	XIST	-1.37	0.38	0.45	1.69	4.28	0.02	2.25	1.53
10	BC011549	Homo sapiens, clone MGC:19945 IMAGE:4554 461, mRNA, complete cds. /PROD=Unk nown (protein for MGC:19945) /FL=gb:BC01 1549.1	ATP5S	0.69	0.19	0.96	0.68	2.57	0.29	-0.02	0.52
15											
20											
25											
30	NM_001889	Homo sapiens crystallin, zeta (quinone reductase) (CRYZ), mRNA. /PROD=cryst allin, zeta (quinone reductase) /FL=gb:NM_ 001889.1 gb:L13278.1 gb:S58039.1	CRYZ	-1.68	0.26	0.23	1.38	3.75	0.07	1.78	1.11
35											
40											
45											
50	BC002665	Homo sapiens, proteolipid protein (Pelizaeus- Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicate d), clone	PLP1	4.57	0.15	2.95	0.64	4.70	0.06	2.32	0.52
55											
60											
65											

5	MGC:3940, mRNA, complete cds.										
10	/PROD=prot eolipid protein (Pelizaeus- Merzbacherd isease, spastic paraplegia 2, uncomplicate d)										
20	/FL=gb:BC00 2665.1										
25	NM_001243 Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 (TNFRSF8), mRNA.	TNFRSF8	3.75	0.03	1.45	0.35	3.24	0.11	0.89	0.46	
30	/PROD=CD3 0 antigen (Ki-1 antigen)										
35	/FL=gb:NM_ 001243.1 gb:D86042.1 gb:M83554.1										
45	NM_001195 Homo sapiens beaded filament structural protein 1, filensin (BFSP1), mRNA.	BFSP1	0.57	0.33	-1.65	1.30	0.60	0.14	-0.86	0.73	
50	/PROD=filen sin										
55	/FL=gb:AF03 9655.1 gb:NM_0011 95.2										
60											
65											

		gb:Y16717.2									
5	NM_024582	Homo sapiens hypothetical protein FLJ23056 (FLJ23056), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ23056 /FL=gb:NM_024582.1	FAT4	2.16	0.27	-0.49	0.30	1.54	0.28	-1.35	1.01
10											
15											
20	NM_000767	Homo sapiens cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible), polypeptide 6 (CYP2B6), mRNA. /PROD=cytochrome P450, subfamily IIB(phenobarbital-inducible), polypeptide 6 /FL=gb:NM_000767.2 gb:AF18227.1 gb:M29874.1	CYP2B6	2.60	0.18	0.87	0.96	1.47	0.12	-0.69	1.03
25											
30											
35											
40											
45											
50	AW665509	ESTs	MGC42174	-0.10	0.33	-0.87	0.72	1.20	0.08	-2.60	1.40
	NM_001104	Homo sapiens actinin, alpha 3 (ACTN3), mRNA. /PROD=skeletal muscle specific actinin, alpha 3	ACTN3	2.12	0.13	1.64	0.28	3.35	0.03	1.67	0.36
55											
60											
65											

/FL=gb:M864											
07.1											
5	gb:NM_001104.1										
	NM_021069	Homo sapiens	SORBS2	-0.49	0.43	0.30	1.36	2.03	0.07	-1.13	1.15
10	ArgAbl-interacting protein ArgBP2 (ARGBP2), transcript variant 2, mRNA.										
15	/PROD=ArgAbl-interacting protein 2, isoform 2										
20	/FL=gb:AB018320.1										
25	gb:NM_021069.1										
30	T65020	ESTs	-	0.51	0.16	-0.84	0.26	1.10	0.15	-1.50	0.38
35	NM_152647	Homo sapiens	GALK2	0.08	0.56	-1.42	0.52	0.03	0.17	-2.34	0.91
40	hypothetical protein FLJ32800 (FLJ32800), mRNA.										
45	/FL=gb:NM_152647.1										
	BC036917	Homo sapiens, clone	C6orf141	-0.82	0.30	-1.18	0.40	0.88	0.11	-2.18	0.62
50	MGC:46457 IMAGE:5201433, mRNA, complete cds.										
55	/PROD=Unknown (protein for MGC:46457)										
60	/FL=gb:BC036917.1										
65	AI969112	Homo sapiens,	PHIP	-1.07	0.13	-2.88	0.91	-0.37	0.02	-2.23	0.33

		clone									
		IMAGE:5260									
5		603, mRNA,									
		partial cds									
	AW449813	KIAA0918	SLITRK5	0.32	0.26	-1.89	0.50	0.46	0.10	-0.57	0.13
		protein									
10	AW044658	ESTs	-	0.16	0.16	-1.47	0.25	0.90	0.14	-0.89	0.16
	AI694300	ESTs	-	-0.52	0.02	-1.34	0.52	0.27	0.08	-1.00	0.08
	NM_017631	Homo	FLJ20035	1.35	0.13	0.05	0.19	1.51	0.17	0.32	0.15
		sapiens									
15		hypothetical									
		protein									
		FLJ20035									
20		(FLJ20035),									
		mRNA.									
		/PROD=hypo									
		thetical									
25		protein									
		FLJ20035									
		/FL=gb:NM_									
		017631.1									
30	AF298547	Homo	NALP2	1.54	0.08	1.22	1.61	5.04	0.05	3.23	1.36
		sapiens									
		nucleotide-									
		binding site									
35		protein 1									
		mRNA,									
		complete									
40		cds.									
		/PROD=nudl									
		eotide-									
		binding site									
45		protein 1									
		/FL=gb:AF29									
		8547.1									
	NM_030631	Homo	SLC25A21	1.96	0.25	0.33	0.81	2.47	0.11	-0.28	0.63
50		sapiens									
		oxodicarboxy									
		late carrier									
		(ODC1),									
55		mRNA.									
		/PROD=oxod									
		icarboxylate									
		carrier									
60		/FL=gb:NM_									
		030631.1									
	BF196255	ESTs	-	2.94	0.05	1.18	0.43	3.15	0.08	0.54	0.57
65	NM_003247	Homo	THBS2	2.62	0.20	1.04	0.28	2.70	0.04	0.27	0.45
		sapiens									

5		thrombospon din 2 (THBS2), mRNA. /PROD=thro mbospondin 2									
10		/FL=gb:NM_ 003247.1 gb:L12350.1									
15	NM_001446	Homo sapiens fatty acid binding protein 7, brain (FABP7), mRNA. /PROD=fatty acid binding protein 7, brain /FL=gb:U812 35.1 gb:D88648.1 gb:U51338.1 gb:NM_0014 46.1 gb:D50373.1	FABP7	0.95	0.09	-0.75	0.37	0.20	0.22	-1.73	0.99
20											
25											
30											
35											
40	AW004016	ESTs	ST6GAL2	1.57	0.14	0.89	0.32	3.30	0.07	1.48	0.43
	AW072790	contactin 1	CNTN1	0.50	0.20	0.18	0.98	1.84	0.10	1.01	1.39
	AL512686	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp76111 77 (from clone DKFZp76111 77).	GNAO1	2.16	0.50	-0.28	1.03	1.67	0.18	-1.12	0.37
45											
50											
55	AI638063	ESTs	CBX5	0.49	0.16	-0.34	0.34	0.98	0.11	-2.71	1.22
	AU157049	Homo sapiens cDNA FLJ14284 fis, clone PLACE1005 898	LOC153346	2.24	0.20	0.34	0.47	2.24	0.09	-0.44	0.96
60											
65	NM_002738	Homo sapiens	PRKCB1	0.99	0.28	-0.15	0.45	1.42	0.08	-1.02	1.04

5		protein kinase C, beta 1 (PRKCB1), mRNA. /PROD=prot									
10		ein kinase C, beta 1 /FL=gb:NM_ 002738.1									
15	AI185136	ESTs	DYDC2	0.12	0.31	-0.80	0.08	0.72	0.08	-0.60	0.09
	AI928037	ESTs	RPIB9	-0.55	0.55	-2.71	0.74	0.49	0.12	-0.89	0.27
	NM_016179	Homo	TRPC4	-1.51	0.85	-1.87	1.42	1.71	0.11	-0.13	1.23
20		sapiens transient receptor potential channel 4 (TRPC4), mRNA. /PROD=tran									
25		sient receptor potential 4 /FL=gb:NM_ 016179.1 gb:AF17540 6.1									
30											
35											
40	AW138143	ESTs	SORBS2	3.29	0.13	2.35	1.05	4.28	0.10	1.32	1.07
	NM_001876	Homo	CPT1A	1.63	0.18	-0.15	0.21	1.32	0.07	-0.20	0.33
45		sapiens carnitine palmitoyltran sferase I, liver (CPT1A), nuclear gene encoding mitochondria I protein, mRNA. /PROD=liver									
50		carnitine palmitoyltran sferase I /FL=gb:L392 11.1 gb:NM_0018 76.1									
55											
60											
65											

	AA903862	ESTs	C20orf54	1.61	0.15	-1.17	0.30	0.68	0.21	-1.49	0.23
5	AI670947	phosphatidyl- inositol-4- phosphate 5- kinase, type I, beta	-	3.91	0.05	0.55	1.54	3.33	0.10	1.17	0.68
10	AV648405	polymerase (RNA) III (DNA directed) (32kD)	-	-0.01	0.11	0.23	0.52	1.73	0.14	-1.23	1.15
15	BF435123	bromodomain and PHD finger containing, 3	-	1.80	0.13	-1.35	1.01	1.14	0.03	0.37	0.24
20	NM_016582	Homo sapiens peptide transporter 3 (LOC51296), mRNA. /PROD=peptide transporter 3 /FL=gb:NM_ 016582.1 gb:AB02059 8.1	SLC15A3	1.77	0.16	-0.88	1.35	1.30	0.23	-2.04	1.23
25											
30											
35											
40	AI830490	glycerol kinase	GK	0.61	0.01	-0.65	0.79	1.25	0.20	-0.38	0.33
	AW134979	HSPC156 protein	STXBP6	2.28	0.03	0.55	0.28	2.05	0.03	0.30	0.44
45	AI354636	ESTs	-	2.81	0.11	0.68	1.17	3.02	0.20	0.19	0.76
	BE672659	ESTs	-	0.20	0.64	-0.43	0.61	1.98	0.12	-0.69	0.45
50	AF284095	Homo sapiens alpha-2A adrenergic receptor mRNA, complete cds. /PROD=alpha- 2A adrenergic receptor /FL=gb:AF28 4095.1 gb:NM_0006	ADRA2A	0.63	0.21	-0.74	0.98	1.85	0.03	0.55	0.31
55											
60											
65											

5	NM_021136	81.1 Homo sapiens reticulon 1 (RTN1), mRNA.	RTN1	-0.30	0.03	-1.39	0.35	0.80	0.07	-1.23	0.39
		/PROD=reticulon 1									
		/FL=gb:L10333.1									
10		33.1 gb:L10334.1 gb:NM_021136.1									
15											
20	NM_014729	Homo sapiens KIAA0808 gene product (KIAA0808), mRNA.	TOX	0.34	0.03	-0.46	0.12	0.90	0.18	-1.86	0.40
25		/PROD=KIAA0808 gene product									
30		/FL=gb:AB018351.1									
35	BE674118	ESTs	-	0.78	0.07	-1.32	0.73	0.28	0.19	-0.96	0.74
40	BC026969	Homo sapiens, clone IMAGE:5116073, mRNA, partial cds.	WDR67	2.95	0.11	0.75	0.92	3.08	0.08	0.45	0.61
45	AF131783	Homo sapiens clone 25181 mRNA sequence.									
50											
55	U11058	Homo sapiens large conductance calcium- and voltage- dependent potassium channel alpha subunit	KCNMA1	1.56	0.09	-0.16	1.08	2.29	0.18	-0.79	0.86
60											
65											

5		(MaxiK)									
		mRNA,									
		complete									
		ods.									
		/PROD=larg									
10		e									
		conductance									
		calcium- and									
		voltage-									
15		dependentpo									
		lassium									
		channel									
		alpha									
20		subunit									
		/FL=gb:U237									
		67.1									
		gb:NM_0022									
25		47.1									
		gb:AF02599									
		9									
30	BF510715	fibroblast	-	2.67	0.27	0.84	0.17	3.29	0.01	0.64	0.51
		growth factor									
		4 (heparin									
		secretory									
35		transforming									
		protein 1,									
		Kaposi									
		sarcoma									
40		oncogene)									
		/FL=gb:M174									
		46.1									
		gb:NM_0020									
45	BE897866	ESTs	ACADSB	1.41	0.23	0.08	0.34	3.10	0.10	-0.27	0.88
	AI735586	ESTs	LOC152573	0.60	0.13	0.00	1.14	2.84	0.07	1.12	1.30
	AL573058	complement	C1R	0.92	0.14	-1.67	0.38	0.73	0.02	-0.96	0.77
50		component									
		1, r									
		subcompone									
		nt									
55	AF429305	Homo	RMST	-0.48	0.03	-2.49	0.51	-0.25	0.20	-1.89	0.27
		sapiens									
		C23up									
		NCRMS									
60		mRNA,									
		partial									
		sequence;									
		alternatively									
65		spliced.									

	BF195118	ESTs, Weakly similar to ALU7_HUM AN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMIN ATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	ATP5J	0.09	0.13	-0.92	0.42	1.57	0.16	-0.53	0.08
5											
10											
15											
20	NM_005460	Homo sapiens synuclein, alpha interacting protein (synphilin) (SNCAIP), mRNA. /PROD=synu clein alpha interacting protein /FL=gb:AF07 6929.1 gb:NM_0054 60.1	SNCAIP	1.76	0.16	-0.84	0.52	1.61	0.19	-0.92	0.88
25											
30											
35											
40											
45	NM_024893	Homo sapiens hypothetical protein FLJ14220 (FLJ14220), mRNA. /PROD=hypo thetical protein FLJ14220 /FL=gb:NM_ 024893.1	C20orf39	1.16	0.29	-0.56	0.42	2.36	0.15	-0.06	0.17
50											
55											
60	NM_022034	Homo sapiens estrogen regulated gene 1 (ERG-1),	CUZD1	1.31	0.08	0.80	0.28	2.78	0.07	0.24	0.58
65											

5		mRNA, /PROD=estr ogen regulated gene 1 /FL=gb:AF30									
10		5835.1 gb:NM_0220 34.1									
15	NM_014788	Homo sapiens KIAA0129 gene product (KIAA0129), mRNA, /PROD=KIA A0129 gene product /FL=gb:D509 19.1 gb:NM_0147 88.1	TRIM14	3.12	0.09	1.22	0.59	3.54	0.08	1.02	0.45
20											
25											
30	AV646597	ESTs, Weakly similar to ALU7_HUM AN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMIN ATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	XIST	-0.77	0.18	0.06	1.55	3.78	0.25	2.28	0.98
35											
40											
45											
50	BF062629	DKFZP586E 1621 protein	TMEM158	4.00	0.19	2.41	0.27	4.87	0.00	1.93	0.19
55	AW440492	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 2 (+) polypeptide /FL=gb:NM_ 000702.1	ATP1A2	1.33	0.07	-2.12	1.07	1.27	0.06	-0.53	0.11
60	AF283777	Homo sapiens clone TCBAP0702 mRNA	CD72	-0.08	0.45	-1.88	1.19	0.41	0.24	-1.42	1.13
65											

		sequence.									
5	NM_005375	Homo sapiens v-myb avian myeloblastos is viral oncogene homolog (MYB), mRNA.	MYB	2.11	0.17	-0.52	0.18	2.24	0.03	0.10	0.08
10		/PROD=v-myb avian myeloblastos is viral oncogeneho molog									
15		/FL=gb:NM_005375.1									
20		gb:AF104863.1									
25		gb:M15024.1									
30	NM_017671	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20116 (FLJ20116), mRNA.	C20orf42	3.19	0.12	0.97	0.70	3.26	0.07	0.16	0.94
35		/PROD=hypo thetical protein FLJ20116									
40		/FL=gb:NM_017671.1									
45	BG283790	ESTs	MATR3	2.27	0.11	0.95	0.57	3.53	0.04	0.89	0.51
50	NM_000702	Homo sapiens ATPase, Na+K+ transporting, alpha 2 (+) polypeptide (ATP1A2), mRNA.	ATP1A2	2.12	0.17	0.76	0.38	2.93	0.16	0.51	0.12
55		/PROD=ATP ase, Na+K+ transporting, alpha 2 (+)polypeptid									
60											

		e									
		/FL=gb:NM_									
		000702.1									
5	NM_025135	Homo sapiens	FHOD3	1.02	0.18	0.80	0.40	2.34	0.10	-0.77	0.72
		hypothetical									
10		protein									
		FLJ22297									
		(KIAA1695),									
		mRNA.									
15		/PROD=hypo									
		thetical									
		protein									
		KIAA1695									
20		/FL=gb:NM_									
		025135.1									
	NM_012281	Homo sapiens	KCND2	1.67	0.30	0.05	0.15	2.70	0.09	-0.26	0.38
25		potassium									
		voltage-									
		gated									
		channel,									
30		Shal-related									
		subfamily,									
		member 2									
35		(KCND2),									
		mRNA.									
		/PROD=pota									
		ssium									
40		voltage-									
		gated									
		channel,									
		Shal-									
45		relatedsubfa									
		mily,									
		member 2									
50		/FL=gb:NM_									
		012281.1									
		gb:AB02896									
		7.1									
55		gb:AF12110									
		4.1									
	BF449063	collagen,	COL14A1	1.61	0.15	0.30	0.38	2.68	0.17	-0.33	0.68
		type XIV,									
		alpha 1									
60		(undulin)									
	AA280904	ESTs	C9orf39	0.23	0.21	-1.58	1.26	1.13	0.14	-0.78	0.42
	NM_022467	Homo sapiens N-	CHST8	2.11	0.20	-0.51	0.30	2.17	0.10	0.48	0.02
65											

5		acetylgalacto samine-4-O- sulfotransfer ase (GALNAC-4- ST1),									
10		mRNA. /PROD=N- acetylgalacto samine-4-O- sulfotransfer ase /FL=gb:NM_ 022467.1 gb:AF30061 2.1									
20	BE468066	ESTs	RMST	3.26	0.09	1.49	0.10	3.80	0.09	1.63	0.08
25	AL120674	ESTs	-	1.00	0.11	-1.35	1.73	1.55	0.15	-2.20	0.86
	NM_133329	Homo	KCNG3	2.18	0.27	0.74	0.29	3.67	0.01	0.26	0.28
30		sapiens potassium voltage- gated channel, subfamily G, member 3 (KCNG3), transcript variant 1, mRNA. /PROD=pota ssium voltage- gated channel, subfamily G,member 3 isoform 1 /FL=gb:AF45 4548.1 gb:AF34898 2.1 gb:AB07060 4.1 gb:NM_1333 29.4									
40											
45											
50											
55											
60											
	AI742043	ESTs	-	0.94	0.34	-0.76	0.37	1.77	0.10	-1.45	0.52
65	NM_005103	Homo	FEZ1	2.80	0.11	2.08	0.25	4.98	0.06	2.20	0.26
		sapiens									

5		fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) (FEZ1),									
10		transcript variant 1, mRNA. /PROD=zygi									
15		n 1, isoform 1 /FL=gb:U600									
20		60.1 gb:U69139.1 gb:NM_0051									
25	NM_000277	Homo sapiens phenylalanin e hydroxylase (PAH), mRNA. /PROD=phe	PAH	0.65	0.11	-1.08	0.08	1.46	0.18	-0.42	0.12
30		nylalanine hydroxylase /FL=gb:U498									
35		97.1 gb:NM_0002									
40		77.1									
45	BF698797	ESTs	-	0.93	0.10	-0.74	0.11	2.07	0.10	-0.40	0.44
50	BF437747	ESTs, Weakly similar to ALU7_HUM AN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMIN ATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	C20orf118	4.26	0.07	1.99	0.45	4.57	0.09	1.75	0.39
55											
60	NM_003020	Homo sapiens secretory granule,	SCG5	4.03	0.14	2.53	0.32	5.01	0.12	3.11	0.24
65											

5		neuroendocri ne protein 1 (7B2 protein) (SGNE1), mRNA.									
10		/PROD=secr etory granule, neuroendocri ne protein 1 (7B2protein) /FL=gb:BC00 5349.1									
20		gb:NM_0030 20.1									
	NM_002800	Homo	PSMB9	1.38	0.10	0.27	0.34	2.05	0.07	-1.43	1.14
25		sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunction al protease 2) (PSMB9), mRNA.									
30		/PROD=prot easome (prosome, macropain) subunit, betatype, 9 (large multifunction al protease 2) /FL=gb:U010 25.1									
40		gb:NM_0028 00.1									
50	BE972639	ESTs	LOC646326	0.00	0.15	-2.71	0.55	0.33	0.22	-2.24	0.61
55	BC044830	Homo	C10orf96	1.38	0.12	-0.32	0.82	2.28	0.06	-1.39	0.90
60		sapiens, Similar to RIKEN cDNA 1700011F14 gene, clone MGC:35062									
65											

5		IMAGE:5166									
		167, mRNA,									
		complete									
		cds.									
		/PROD=Simil									
10		ar to RIKEN									
		cDNA									
		1700011F14									
		gene									
15		/FL=gb:BC04									
		4830.1									
	AI961231	KIAA0808	TOX	3.28	0.13	1.23	0.06	4.00	0.01	1.13	0.37
		gene product									
20		/FL=gb:AB01									
		8351.1									
		gb:NM_0147									
		29.1									
25	U17496	Human	PSMB8	3.43	0.21	0.46	1.17	3.30	0.06	0.09	0.64
		proteasome									
		subunit									
30		LMP7 (allele									
		LMP7B)									
		mRNA,									
		complete									
		cds.									
35		/PROD=prot									
		easeome									
		subunit									
		LMP7									
40		/FL=gb:U174									
		97.1									
		gb:U17496.1									
	N23651	ESTs	SDK2	-1.16	0.31	-2.65	0.42	1.27	0.09	-2.07	0.75
45	NM_007015	Homo	LECT1	4.83	0.12	2.27	0.84	5.36	0.09	1.83	0.69
		sapiens									
		chondromod									
		ulin I									
50		precursor									
		(CHM-I),									
		mRNA.									
55		/PROD=chon									
		dromodulin I									
		precursor									
		/FL=gb:NM_									
60		007015.1									
		gb:AB00600									
		0.1									
	NM_015474	Homo	SAMHD1	2.63	0.17	0.57	0.33	2.89	0.09	0.29	0.22
65		sapiens									

5		DKFZP564A										
		032 protein										
		(DKFZP564										
		A032),										
		mRNA.										
10		/PROD=DKF										
		ZP564A032										
		protein										
		/FL=gb:AF22										
15		8421.1										
		gb:AL05026										
		7.1										
		gb:AB01384										
20		7.1										
		gb:Nm_0154										
		74.1										
25	AF147427	Homo sapiens full length insert cDNA clone YP80A10.	SAMHD1	1.33	0.03	-0.99	0.88	1.35	0.08	-2.30	0.97	
30	NM_004688	Homo sapiens N-myc (and STAT) interactor (NMI), mRNA.	NMI	3.54	0.04	0.96	0.07	3.80	0.07	1.13	0.34	
35		/PROD=N-myc and STAT interactor										
40		/FL=gb:BC00										
45		1268.1										
		gb:Nm_0046										
		88.1										
50	AB040812	gb:U32849.1	Homo sapiens mRNA for protein kinase PAK5, complete cds.	PAK7	-1.37	0.60	-3.89	1.62	-0.49	0.07	-4.18	0.12
55		/PROD=protein kinase PAK5										
60		/FL=gb:AB04										
65												

		0812.1									
5	AI985987	ESTs, Moderately similar to ALU1_HUMAN AN ALU SUBFAMILY J SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	SCNN1G	-0.28	0.31	-0.99	0.35	0.12	0.19	-2.70	0.59
10											
15											
20	NM_001877	Homo sapiens complement component (3dEpstein Barr virus) receptor 2 (CR2), mRNA. /PROD=complement component (3dEpstein Barr virus)receptor 2 /FL=gb:NM_001877.1 gb:M26004.1	CR2	1.50	0.13	-0.43	1.05	2.35	0.14	-1.44	1.51
25											
30											
35											
40											
45	NM_001351	Homo sapiens deleted in azoospermia-like (DAZL), mRNA. /PROD=deleted in azoospermia-like /FL=gb:U66726.2 gb:NM_001351.1 gb:U65918.1 gb:U66078.1	DAZL	1.69	0.24	-0.81	0.76	1.93	0.12	-0.73	0.06
50											
55											
60											
65											

	NM_022168	Homo sapiens melanoma differentiation n associated protein-5 (MDA5), mRNA. /PROD=melanoma differentiation n associated protein-5 /FL=gb:AY017378.1 gb:NM_022168.1 gb:AF095844.1	IFIH1	-2.03	1.08	-2.76	0.83	-0.10	0.15	-2.15	0.40
5											
10											
15											
20											
25											
30	AF052108	Homo sapiens clone 23687 mRNA sequence.	LOC157627	1.49	0.33	0.22	1.02	2.26	0.40	-1.33	1.19
35	AI056877	Human DNA sequence from clone RP4-530H15 on chromosome 20. Contains the 3' end of the PTPN1 gene for protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (EC 3.1.3.48), the gene for a novel protein similar to placental protein DIFF40, an RPL36 (60S Ribos	LOC200230	0.11	0.30	-2.37	0.94	1.15	0.18	-1.35	0.75
40											
45											
50											
55											
60											
65											

5	NM_002522	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA.	NPTX1	2.35	0.25	-0.48	0.19	2.17	0.09	-1.19	0.83
10		/PROD=neuronal pentraxin I precursor									
15		/FL=gb:NM_002522.1									
		gb:U61849.1									
20	N21096	ESTs	STXBP6	2.42	0.16	0.99	0.08	3.69	0.09	1.14	0.04
	AI693516	ESTs	COL14A1	0.39	0.23	-1.63	0.96	0.96	0.17	-1.81	0.67
25	NM_018043	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10261 (FLJ10261), mRNA.	TMEM16A	-0.90	0.37	-1.93	0.70	0.25	0.43	-3.93	0.49
30		/PROD=hypothetical protein FLJ10261									
35		/FL=gb:NM_018043.1									
40	AF110400	Homo sapiens fibroblast growth factor 19 (FGF19) mRNA, complete cds.	FGF19	2.12	0.14	-0.08	0.34	2.18	0.04	-0.91	0.18
45		/PROD=fibroblast growth factor 19									
50		/FL=gb:AF110400.1									
55		gb:NM_005117.1									
		gb:AB018122.1									
60	AK098525	Homo sapiens cDNA FLJ25659	HHIP	1.76	0.14	-0.57	0.63	3.32	0.06	-0.11	0.15
65											

5		fis, clone TST00427, highly similar to Mus musculus hedgehog- interacting protein (Hip) mRNA.									
10	AV715309	ESTs, Weakly similar to ALU7_HUM AN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMIN ATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	C20orf118	4.28	0.13	1.89	0.39	4.76	0.10	1.48	0.42
15											
20											
25											
30	U96136	Homo sapiens delta-catenin mRNA, complete cds. /PROD=delta -catenin /FL=gb:NM_001332.1 gb:U72665.1 gb:AB013805.1 gb:U96136.1 gb:AF035302.1	CTNND2	0.78	0.11	-1.33	0.87	1.18	0.12	-1.17	0.67
35											
40											
45											
50	NM_002590	Homo sapiens protocadherin 8 (PCDH8), mRNA. /PROD=protocadherin 8 /FL=gb:NM_002590.2 gb:AF06157	PCDH8	-0.80	0.34	-0.83	0.82	2.18	0.02	0.12	0.33
55											
60											

5	AF107846	3.2 Homo sapiens neuroendocrine-specific Golgi protein p55 (XLa1phas) gene, exon XL2 and complete cds	-	0.44	0.20	-0.25	0.12	2.12	0.14	-2.56	0.81
10	BG169832	adenylate kinase 5 /FL=gb:NM_012093.1 gb:AF062595.1	AK5	0.62	0.36	-2.79	0.50	1.03	0.36	-1.94	0.32
15	BE968806	ESTs, Weakly similar to ALU4_HUMAN AN ALU SUBFAMILY SB2 SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	ATP5S	-1.15	0.14	-3.03	0.71	-0.34	0.15	-4.73	0.74
20	BU729850	hypothetical protein LOC153469	JAKMIP2	2.30	0.07	0.43	1.78	3.86	0.04	-1.56	1.92
25	AL832535	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547J1816 (from clone DKFZp547J1816).	LOC157627	2.25	0.18	-0.04	1.00	3.14	0.25	-1.50	1.19
30	NM_000439	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (PCSK1),	PCSK1	-0.63	0.18	-2.68	0.53	0.69	0.30	-3.19	1.03
35											
40											
45											
50											
55											
60											
65											

		mRNA.									
		/PROD=prop									
5		rotein									
		convertase									
		subtilisinexi									
		n type 1									
10		/FL=gb:NM_									
		000439.2									
		gb:M90753.1									
	M34455	Human	INDO	4.39	0.23	1.58	0.09	5.44	0.08	1.69	0.13
15		interferon-									
		gamma-									
		inducible									
		indoleamine									
20		2,3-									
		dioxygenase									
		(IDO)									
25		mRNA,									
		complete									
		cds.									
		/FL=gb:NM_									
30		002164.1									
		gb:M34455.1									
	AB014737	Homo	SMOC2	1.25	0.12	-2.04	0.48	1.94	0.06	-2.27	1.12
		sapiens									
35		mRNA for									
		SMAP-2b,									
		complete									
		cds.									
40		/PROD=SMA									
		P-2b									
		/FL=gb:AB01									
		4737.1									
45	BM682352	Homo	HCN1	-0.41	0.14	-4.38	1.19	0.35	0.31	-3.88	0.32
		sapiens									
		cDNA									
		FLJ37204									
50		fis, clone									
		BRALZ2006									
		976.									

TABLA V: EXPRESIÓN RELATIVA DE MARCADORES ENDODÉRMICOS DEFINITIVOS PARA LAS CONDICIONES MARCADAS EN EJEMPLO 10. TODOS LOS VALORES FUERAN NORMALIZADOS PARA EL GRUPO 1 (CONTROL)

	Sox17	CXCR4	Goosecoid	HNF-3B	SOX-2	Oct-4
Grupo 1 – control	1	1	1	1	1	1
Grupo 2	45	19.5	2.8	0.64	0.91	1.1
Grupo 3	45	30	2.9	0.74	0.70	0.76
Grupo 4	8	14	2.7	1.11	0.18	0.36
Grupo 5	23	16	3.1	1.76	0.16	0.41
Grupo 6	41	5.8	3.0	1.87	0.61	0.57
Grupo 7	25	19.5	2.7	0.62	0.34	0.48
Grupo 8	6	15.9	2.9	2.0	0.13	0.43
Grupo 9	1	1.4	0.9	0.89	1.2	0.85
Grupo 10	22	1.5	1.4	1.20	1.36	0.68
Grupo 11	54	23	2.5	0.71	0.66	0.65
Grupo 12	68	0.7	0.9	1.51	0.02	0.30
Grupo 13	13.9	12.7	3.0	2.1	0.11	0.30
Grupo 14	52.6	20.6	2.9	0.82	0.69	0.70
Grupo 15	68	27.7	2.9	0.68	0.68	0.85
Grupo 16	13.9	21	2.4	0.79	0.46	0.72
Grupo 17	52	14.9	3.5	2.12	0.22	0.44

TABLA VI: VALORES MÉDIOS NORMALIZADOS DE INTENSIDAD (EN FOMATO LOG) DE GENES PARA CÉLULAS MADRES EMBRIONÁRIAS H9 DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE ENDODÉRMICAS DEFINITIVAS CULTIVADAS EN MADRIGEL™ O MEFS +/- WNT-3A.

Título de Gen	Tratamiento DE en serum + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
ESTs	-4.82708	2.63968	-4.26995	8.62E-05
microfibrillar-associated protein 4	0.063791	5.16358	-0.60091	3.48E-03
Homo sapiens, alpha-1 (VI) collagen	-3.66187	2.36459	-2.26934	1.45E-04
ESTs	-3.43712	2.14508	-2.6475	0.00E+00
Homo sapiens cystatin SN (CST1), mRNA. /PROD=cystatin SN /FL=gb:J03870.1 gb:NM_001898.1	0.072931	7.53908	4.63955	4.46E-03
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 /FL=gb:U81800.1 gb:NM_004207.1	-0.066405	5.23572	0.279005	4.27E-04
Homo sapiens fibroblast growth factor 17 (FGF17), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 17 /FL=gb:NM_003867.1 gb:AB009249.1	-0.894644	5.75417	2.4872	4.93E-03
Human linkprotein mRNA, complete cds. /PROD=link protein /FL=gb:NM_001884.1 gb:U43328.1	-1.93991	3.31348	-1.26346	1.14E-02
Homo sapiens solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (SLC16A3), mRNA. /PROD=solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 /FL=gb:U81800.1 gb:NM_004207.1	0.710321	6.12971	1.72403	0.00E+00
Homo sapiens apolipoprotein A-I (APOA1), mRNA. /PROD=apolipoprotein A-I precursor /FL=gb:M27875.1 gb:M11791.1 gb:NM_000039.1 gb:BC005380.1	-1.47073	5.37558	2.46891	5.07E-03

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens cytidine deaminase (CDA), mRNA. /PROD=cytidine deaminase /FL=gb:L27943.1 gb:NM_001785.1	-3.89129	2.05822	-1.67035	2.23E-03
15	ESTs, Moderately similar to JE0284 Mm-1 cell derived transplantability-associated protein 1b (H.sapiens) ESTs	-2.37712	5.75671	4.22227	2.56E-02
	glycophorin B (includes Ss blood group)	-0.04716	5.28231	0.966974	0.00E+00
	Homo sapiens homeobox protein goosecoid mRNA, complete cds. /PROD=homeobox protein goosecoid /FL=gb:AY177407.1 gb:NM_173849.1	-2.85201	3.32812	-0.12969	1.45E-04
20	MCP-1=monocyte chemotactic protein (human, aortic endothelial cells, mRNA, 661 nt). /PROD=MCP-1	-4.42042	3.55326	1.89424	2.50E-02
25	Homo sapiens Mix-like homeobox protein 1 (MILD1) mRNA, complete cds. /PROD=Mix-like homeobox protein 1 /FL=gb:AF211891.1	-2.27571	5.13499	2.95543	2.92E-02
	ESTs	-1.54648	4.47601	0.921971	2.01E-02
30	Homo sapiens lumican (LUM), mRNA. /PROD=lumican /FL=gb:NM_002345.1 gb:U18728.1 gb:U21128.1	-4.93603	2.17917	-0.23735	1.12E-04
	Homo sapiens HNF-3beta mRNA for hepatocyte nuclear factor-3 beta, complete cds. /PROD=hepatocyte nuclear factor-3 beta /FL=gb:AB028021.1 gb:NM_021784.1	-4.05726	3.21064	0.948822	3.39E-02
35	Homo sapiens reserved (KCNK12), mRNA. /PROD=tandem pore domain potassium channel THIK-2 /FL=gb:NM_022055.1 gb:AF287302.1	-2.71785	4.68666	2.82506	3.71E-02
40	Homo sapiens atrophin-1 interacting protein 1; activin receptor interacting protein 1 (KIAA0705), mRNA. /PROD=atrophin-1 interacting protein 1; activinreceptor interacting protein 1 /FL=gb:NM_012301.1 gb:AF038563.1	-0.468745	6.28184	3.77969	1.97E-02
45	ESTs	-4.30828	1.80825	-1.32021	9.63E-03
	Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD) (GAD1), transcript variant GAD25, mRNA. /PROD=glutamate decarboxylase 1, isoform GAD25/FL=gb:NM_013445.1 gb:AF178853.1 gb:BC002815.1	-2.33636	2.25176	-2.32124	5.26E-04
50	Homo sapiens cardiac ventricular troponin C mRNA, complete cds. /PROD=cardiac ventricular troponin C /FL=gb:NM_003280.1 gb:AF020769.1	-2.424	2.31908	-1.87965	4.07E-04
55	ESTs	-0.549728	4.89072	1.4377	2.99E-03
	Homo sapiens fibroblast growth factor 8 (androgen- induced) (FGF8), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 8 (androgen-induced) /FL=gb:U36223.1 gb:U46212.1 gb:NM_006119.1	-2.89554	3.42817	0.926036	2.62E-02
60	ESTs	-4.32791	2.19561	0.015827	5.91 E-03
65		-3.09818	1.66254	-2.20564	8.62E-05

(continua)

5	Título de Gen	(continua)			P-Valor Benjamini y Hochberg
		Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	
10	Homo sapiens haptoglobin-related protein (HPR), mRNA. /PROD=haptoglobin-related protein /FL=gb:NM_020995.1	-2.6068	2.38009	-1.19632	6.95E-03
	collagen, type VI, alpha 1	-1.418	3.85952	0.604245	1.21E-02
15	Human (clone 8B1) Br-cadherin mRNA, complete cds. /PROD=Br-cadherin /FL=gb:L34057.1 gb:L33477.1 gb:NM_004061.1	-2.17941	2.59894	-1.02624	1.24E-02
	ESTs	-1.40092	2.57297	-1.82509	1.45E-04
20	Homo sapiens cystatin SA (CST2), mRNA. /PROD=cystatin SA /FL=gb:NM_001322.1	-0.102178	5.21645	2.1671	2.40E-02
	Human mRNA for apolipoprotein AI (apo AI)=. /PROD=preproapolipoprotein AI	0.215086	5.51109	2.49684	9.57E-03
25	Homo sapiens MLL septin-like fusion (MSF), mRNA. /PROD=MLL septin-like fusion /FL=gb:AF123052.1 gb:NM_006640.1	-3.29221	1.70902	-1.49951	2.25E-03
	Homo sapiens cystatin S (CST4), mRNA. /PROD=cystatin S /FL=gb:NM_001899.1	0.92448	6.48842	3.87036	7.20E-03
30	Homo sapiens phorbolin-like protein MDS019 (MDS019), mRNA. /PROD=phorbolin-like protein MDS019 /FL=gb:AF182420.1 gb:NM_021822.1	-1.11883	4.73391	2.40782	7.86E-03
35	Homo sapiens apolipoprotein A-II (APOA2), mRNA. /PROD=apolipoprotein A-II precursor /FL=gb:M29882.1 gb:NM_001643.1 gb:BC005282.1	-1.03333	5.80468	4.46856	3.23E-02
	ESTs	-1.55475	3.48278	0.420447	2.50E-02
40	Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD) (GAD1), transcript variant GAD67, mRNA. /PROD=glutamate decarboxylase 1, isoform GAD67 /FL=gb:NM_000817.1 gb:M81883.1 gb:L16888.1	-3.86752	1.56384	-1.08675	2.52E-02
	ESTs	-0.731491	5.43249	3.52168	1.60E-02
	ESTs	-2.03591	3.38924	0.760984	2.34E-03
45	Homo sapiens retinoid X receptor, gamma (RXRG), mRNA. /PROD=retinoid X receptor, gamma /FL=gb:NM_006917.1 gb:U38480.1	-2.37496	2.62934	-0.32035	8.83E-04
	ESTs	-0.648552	4.30576	1.43266	2.19E-03
50	Homo sapiens cDNA FLJ11550 fis, clone HEMBA1002970	-1.22228	5.37746	4.21644	1.68E-02
	ESTs	-1.782	3.50391	1.0501	1.85E-02
55	Homo sapiens haptoglobin (HP), mRNA. /PROD=haptoglobin /FL=gb:K00422.1 gb:L29394.1 gb:NM_005143.1	-1.10114	3.5449	0.477027	8.13E-03
	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10970 (FLJ10970), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ10970 /FL=gb:NM_018286.1	-0.431989	5.14497	3.02045	2.62E-02
60	Homo sapiens beta-site APP cleaving enzyme (BACE) mRNA, complete cds. /PROD=beta-site APP cleaving enzyme /FL=gb:AF200343.1 gb:AF204943.1	-2.0354	3.70648	1.75385	8.00E-03
65	gb:AF190725.1 gb:AF201468.1 gb:NM_012104.1				

(continua)

5	Título de Gen	Tratamiento		Tratamiento		Tratamiento		P-Valor Benjamini y Hochberg
		DE	en serum bajo + AA en MATRIGEL	DE	en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	DE	en serum bajo + AA en MEFS	
10	Homo sapiens hypothetical protein FLJ22252 similar to SRY-box containing gene 17 (FLJ22252), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ22252 similar to SRY-box containing gene 17 /FL=gb:NM_022454.1	1.36784		6.82571		4.5979		2.10E-02
15	Cluster Incl. AB028021:Homo sapiens HNF-3beta mRNA for hepatocyte nuclear factor-3 beta, complete cds /cds=(196,1569) /gb=AB028021 /gi=4958949 /ug=Hs.155651 /len=1944	-1.5339		5.12418		4.11704		4.47E-02
20	Homo sapiens gastrin-releasing peptide (GRP), mRNA. /PROD=gastrin-releasing peptide /FL=gb:NM_002091.1 gb:K02054.1 gb:BC004488.1	-2.74071		2.70077		0.509757		2.49E-04
25	Homo sapiens sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A (SEMA5A), mRNA. /PROD=sema domain, seven thrombospondin repeats (type1 and type 1-like), transmem	-1.53335		3.78503		1.48732		4.71E-02
30	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586J0624 (from clone DKFZp586J0624); complete cds. /PROD=hypothetical protein /FL=gb:AF215636.1 gb:NM_014585.1 gb:AF231121.1 gb:AF226614.1 gb:AL136944.1	-0.835182		5.22406		3.69882		2.08E-02
35	Human mRNA for alpha-1 type II collagen.	-2.8736		2.155		-0.38021		5.70E-03
	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	-1.54385		1.7147		-2.58241		1.71E-02
	neuropilin 1 /FL=gb:AF016050.1 gb:NM_003873.1 gb:AF018956.1	-1.62253		1.95432		-1.9667		8.83E-04
40	Human DNA sequence from clone RP1-181C24 on chromosome 6p11.1-12.2. Contains the 3 end of the BMP5 gene for bone morphogenetic protein 5, ESTs, STSs and GSSs /FL=gb:M60314.1 gb:NM_021073.1	-3.72313		1.68755		-0.37308		1.38E-03
45	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS, 80K-L) /FL=gb:M68956.1 gb:D10522.1 gb:NM_002356.4	-0.71724		3.51728		0.335725		4.29E-03
	hypothetical protein FLJ23403 /FL=gb:NM_022068.1	-1.45618		1.81423		-2.31327		1.20E-02
50	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	-4.26574		1.7879		0.445241		3.25E-02
	Homo sapiens cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homologue of L1) (CHL1), mRNA. /PROD=cell adhesion molecule with homology to L1CAM(close homologue of L1)/FL=gb:AF002246.1 gb:NM_006614.1	-0.541188		2.1751		-2.5002		1.16E-03
55	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) /FL=gb:U41078.1 gb:NM_004995.2	-2.05734		2.36236		-0.5185		1.66E-02
60	Homo sapiens glycophorin B (includes Ss blood group) (GYPB), mRNA. /PROD=glycophorin B precursor /FL=gb:J02982.1 gb:NM_002100.2	-0.947308		3.26089		0.180293		4.83E-04
65	WAS protein family, member 2 /FL=gb:NM_006990.1 gb:AB026542.1	-2.18746		1.99129		-1.05968		4.00E-03

(continua)					
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens frizzled-related protein (FRZB), mRNA. /PROD=frizzled-related protein /FL=gb:U24163.1 gb:U68057.1 gb:NM_001463.1 gb:U91903.1	0.56502	5.7261	3.67629	1.75E-02
15	Homo sapiens glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD) (GAD1), transcript variant GAD25, mRNA. /PROD=glutamate decarboxylase 1, isoform GAD25/FL=gb:NM_013445.1 gb:AF178853.1 gb:BC002815.1	-1.68495	2.27067	-0.96944	8.02E-03
20	ESTs	0.812766	5.93144	3.91314	4.15E-02
	Homo sapiens clone 23736 mRNA sequence	-0.047182	5.79006	4.50744	1.74E-02
	Homo sapiens glycophorin E (GYPE), mRNA. /PROD=glycophorin E /FL=gb:NM_002102.1 gb:M29610.1	-2.01601	1.79002	-1.50134	1.97E-02
25	ESTs	1.06767	5.63319	3.12487	2.00E-02
	ESTs	-1.41162	2.5396	-0.57029	1.29E-02
	Human Fritz mRNA, complete cds. /PROD=Fritz /FL=gb:U24163.1 gb:U68057.1 gb:NM_001463.1 gb:U91903.1	0.436589	5.69814	3.91514	1.99E-02
30	Homo sapiens, clone MGC:4655, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:4655) /FL=gb:BC004908.1	2.3772	5.9184	2.47596	1.20E-02
35	KIAA0878 protein /FL=gb:NM_014899.1 gb:AB020685.1	1.1189	6.41747	4.78882	2.01E-02
40	Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E (SEMA3E), mRNA. /PROD=sema domain, immunoglobulin domain (Ig), shortbasic domain, secreted, (semaphorin) 3E /FL=gb:NM_012431.1 gb:AB002329.1	-0.785987	3.69668	1.27624	2.10E-02
45	ESTs	1.48084	6.59709	4.81395	1.36E-02
	noggin /FL=gb:NM_005450.1	-1.63627	3.28161	1.32958	2.53E-02
	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11316 (FLJ11316), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ11316 /FL=gb:NM_018388.1	-0.904749	3.35854	0.755319	1.12E-04
50	Homo sapiens angiopoietin 2 (ANGPT2), mRNA. /PROD=angiopoietin 2 /FL=gb:AB009865.1 gb:AF004327.1 gb:NM_001147.1	-2.93044	2.23779	0.59685	3.43E-02
55	Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP14), mRNA. /PROD=matrix metalloproteinase 14 preproprotein /FL=gb:U41078.1	-0.723489	2.97262	-0.09689	5.44E-03
60	gb:NM_004995.2 G protein-coupled receptor collagen, type IX, alpha 2 /FL=gb:NM_001852.1	1.50709	6.65228	5.05327	2.00E-02
	ESTs	1.27026	5.4659	2.93507	3.19E-03
	KIAA1462 protein	0.521638	3.93176	0.620223	0.00E+00
65		-3.84563	1.65452	0.437064	3.27E-02

(continua)

5	Título de Gen	Tratamiento		Tratamiento		Tratamiento		P-Valor Benjamini y Hochberg
		DE + AA MATRIGEL	en serum bajo + AA en MATRIGEL	DE + AA MATRIGEL	en serum bajo + Wnt-3 ^a en MATRIGEL	DE + AA MEFS	en serum bajo + AA en	
10	Homo sapiens cartilage linking protein 1 (CRTL1), mRNA. /PROD=cartilage linking protein 1 /FL=gb:NM_001884.1 gb:U43328.1	-1.31515		2.27271		-0.80521		2.22E-02
15	Homo sapiens solute carrier family 21 (prostaglandin transporter), member 2 (SLC21A2), mRNA. /PROD=solute carrier family 21 (prostaglandin transporter), member 2 /FL=gb:U70867.1 gb:NM_005630.1	0.711428		4.89808		2.43304		6.84E-03
20	ESTs	0.307173		4.78515		2.65653		1.72E-02
25	6-phosphofructo-2-kinasefructose-2,6-biphosphatase 4	-0.242865		3.97929		1.59985		5.28E-03
30	Homo sapiens dual specificity phosphatase 4 (DUSP4), mRNA. /PROD=dual specificity phosphatase 4 /FL=gb:NM_001394.2 gb:BC002671.1 gb:U48807.1 gb:U21108.1	0.953857		5.82811		4.12159		4.00E-03
35	ESTs, Weakly similar to T00331 hypothetical protein KIAA0555 (H.sapiens)	-1.57372		2.70797		0.443622		6.74E-03
40	ESTs	-3.57414		3.15167		3.37198		8.82E-03
45	ESTs, Highly similar to IHH_HUMAN INDIAN HEDGEHOG PROTEIN PRECURSOR (H.sapiens)	-0.653989		3.22059		0.590533		5.18E-03
50	ESTs, Weakly similar to FCE2 MOUSE LOW AFFINITY IMMUNOGLOBULIN EPSILON FC RECEPTOR (M.musculus)	0.494192		5.22522		3.48031		1.97E-02
55	homeo box HB9/FL=gb:NM_005515.1	-1.65563		3.2238		1.63092		5.58E-03
60	Homo sapiens arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1) (ARSE), mRNA. /PROD=arylsulfatase E precursor /FL=gb:X83573.1 gb:NM_000047.1	0.283004		4.95903		3.18424		9.22E-03
65	ESTs	-0.05909		3.0455		-0.29817		1.47E-02
70	Homo sapiens hypothetical protein FLJ23403 (FLJ23403), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ23403 /FL=gb:NM_022068.1	-1.48452		1.97473		-1.00431		5.72E-03
75	ESTs	-0.182403		3.01548		-0.18954		3.72E-03
80	hypothetical protein FLJ23091	0.323388		5.25192		3.77987		3.57E-02
85	Human dipeptidyl peptidase IV (CD26) mRNA, complete cds. /PROD=dipeptidyl peptidase IV /FL=gb:M74777.1	-3.61145		0.760585		-1.25595		3.07E-02
90	hypothetical protein FLJ21032	0.355672		4.67756		2.61753		4.59E-02
95	Homo sapiens Kell blood group (KEL), mRNA. /PROD=Kell blood group antigen /FL=gb:BC003135.1 gb:NM_000420.1	-2.20519		1.89439		-0.38393		1.91E-02
100	splicing factor, arginineserine-rich 5	0.7481		5.68934		4.27169		2.97E-03
105	Human prostatic secretory protein 57 mRNA, complete cds. /PROD=PSP57 /FL=gb:U22178.1	-3.01313		1.46338		-0.40767		1.97E-02
110	Homo sapiens KIAA0878 protein (KIAA0878), mRNA. /PROD=KIAA0878 protein /FL=gb:NM_014899.1 gb:AB020685.1	2.0265		7.00937		5.65368		2.85E-02

(continua)

5	Título de Gen	Tratamiento			P-Valor Benjamini y Hochberg
		DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	DE en serum bajo + AA en MEFS	
10	Homo sapiens cryptic mRNA, complete cds. /PROD=cryptic /FL=gb:AF312769.1	0.104874	2.87319	-0.67353	1.61E-03
	Homo sapiens cDNA FLJ13221 fis, clone NT2RP4002075	0.355743	3.98782	1.30963	1.38E-03
	phorbolin-like protein MDS019	-1.11756	2.83853	0.503523	1.59E-02
15	Homo sapiens mRNA for KIAA1409 protein, partial cds. /PROD=KIAA1409 protein	0.368334	2.8009	-1.03191	1.78E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434D0818 (from clone DKFZp434D0818)	-2.63427	1.64513	-0.3056	2.52E-02
20	ESTs	0.35393	5.14775	3.74875	3.16E-02
	Homo sapiens TBX3-iso protein (TBX3-iso), mRNA. /PROD=TBX3-iso protein /FL=gb:NM_016569.1 gb:AF216750.1	-2.34566	2.45238	1.07038	1.31E-02
25	Homo sapiens chromosome 19, cosmid R31181	-0.258871	3.0636	0.223926	1.58E-03
	Homo sapiens mRNA for GATA-6, complete cds. /PROD=GATA-6 /FL=gb:U66075.1 gb:NM_005257.1 gb:D87811.1	2.21862	6.8609	5.34263	4.29E-02
30	Homo sapiens ankyrin-like with transmembrane domains 1 (ANKTM1), mRNA	-1.10879	3.93484	2.81939	1.29E-02
	G protein-coupled receptor 49	0.265509	4.46257	2.50537	2.19E-02
35	Homo sapiens growth differentiation factor 3 (GDF3), mRNA. /PROD=growth differentiation factor 3 precursor /FL=gb:NM_020634.1 gb:AF263538.1	1.67253	5.34944	2.87486	8.62E-05
	Human (clone HSY3RR) neuropeptide Y receptor (NPYR) mRNA, complete cds. /PROD=neuropeptide Y receptor /FL=gb:L06797.1 gb:NM_003467.1 gb:AF025375.1 gb:AF147204.1 gb:M99293.1 gb:L01639.1	1.77461	6.70301	5.47995	3.00E-02
40					
45	Homo sapiens type VI collagen alpha2 chain precursor (COL6A2) mRNA, complete cds, alternatively spliced. /PROD=type VI collagen alpha 2 chain precursor /FL=gb:AY029208.1	1.7011	5.33126	2.84458	5.91 E-03
	ESTs	-0.349726	3.29119	0.824929	4.11E-03
50	ESTs	-0.903317	1.89777	-1.36429	6.84E-03
	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10718 (FLJ10718), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ10718 /FL=gb:NM_018192.1	2.60483	7.10633	5.55242	1.41E-02
55	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 6 (ARHGAP6), transcript variant 2, mRNA. /PROD=Rho GTPase activating protein 6 isoform 2 /FL=gb:AF022212.2 gb:NM_001174.2	-1.10389	1.83053	-1.28521	1.28E-02
60	stanniocalcin 1 /FL=gb:U25997.1 gb:NM_003155.1 gb:U46768.1	2.41135	7.29563	6.14284	2.51 E-02
	Human glycophorin HeP2 mRNA, partial cds. /PROD=glycophorin HeP2	-0.843493	2.71108	0.233547	2.98E-04

65

(continua)

5	Título de Gen	(continua)			P-Valor Benjamini y Hochberg
		Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	
10	Homo sapiens cDNA FLJ12993 fis, clone NT2RP3000197	0.147259	4.12241	2.06949	6.84E-03
15	Homo sapiens presenilin stabilization factor b (PSF) mRNA, complete cds; alternatively spliced. /PROD=presenilin stabilization factor b /FL=gb:AY113699.1	-0.86173	2.85614	0.56745	6.09E-03
20	Homo sapiens glycophorin Erik STA (GP-Erik) gene complete cds. /PROD=glycophorin Erik (STA) /FL=gb:U00178.1	-1.19362	2.17108	-0.45439	1.45E-04
25	bromodomain and PHD finger containing, 3	-2.8472	1.75573	0.369397	8.62E-05
	ESTs	0.784344	4.74104	2.71543	7.55E-03
	ESTs	-1.26251	3.4693	2.27614	3.80E-03
	ESTs	-1.71713	1.23763	-1.71122	2.99E-02
30	Homo sapiens microsomal glutathione S-transferase 2 (MGST2), mRNA. /PROD=microsomal glutathione S-transferase 2 /FL=gb:NM_002413.1 gb:U77604.1	2.06233	6.81536	5.6918	3.79E-02
35	Homo sapiens eomesodermin (Xenopus laevis) homolog (EOMES), mRNA. /PROD=eomesodermin (Xenopus laevis) homolog /FL=gb:AB031038.1 gb:NM_005442.1	2.65926	6.71627	4.89839	2.76E-02
	Homo sapiens mRNA for MSX-2, complete cds. /PROD=MSX-2 /FL=gb:D89377.1	0.407211	4.11145	1.94529	1.35E-02
40	Homo sapiens apolipoprotein A-II (APOA2), mRNA. /PROD=apolipoprotein A-II precursor /FL=gb:M29882.1 gb:NM_001643.1 gb:BC005282.1	-1.10237	5.10066	4.75899	1.34E-02
45	Homo sapiens adenylate cyclase 8 (brain) (ADCY8), mRNA. /PROD=adenylate cyclase 8 /FL=gb:NM_001115.1	-1.3408	1.12773	-2.26149	1.07E-02
	Homo sapiens glucose-6-phosphate transporter (G6PT) gene, G6PT-Dt allele, complete cds	-0.193516	3.03064	0.407738	1.38E-03
50	Homo sapiens glutathione S-transferase A2 (GSTA2), mRNA. /PROD=glutathione S-transferase A2 /FL=gb:BC002895.1 gb:M25627.1 gb:M16594.1 gb:M14777.1 gb:M15872.1 gb:M21758.1 gb:NM_000846.1	-3.10645	1.11704	-0.4221	5.37E-04
55	Homo sapiens sodium dependent phosphate transporter isoform NaPi-IIb mRNA, complete cds. /PROD=sodium dependent phosphate transporter isoform NaPi-IIb /FL=gb:AF111856.1 gb:NM_006424.1 gb:AF146796.1	-0.397133	2.78341	0.231961	1.11E-02
60	ESTs	2.77413	7.19192	5.906	3.17E-02
	Homo sapiens partial LHX9 gene for LIM-homeobox 9, 3'UTR.	-2.2486	1.64952	-0.13424	7.89E-03
65	Homo sapiens LYST-interacting protein LIP3 mRNA, partial cds. /PROD=LYST-interacting protein LIP3 putative 47 kDa protein	-0.682149	2.34271	-0.31253	9.87E-03
		-0.123937	3.2914	1.05247	3.72E-03

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens protein S (alpha) (PROS1), mRNA. /PROD=protein S (alpha)/FL=gb:M15036.1 gb:NM_000313.1	0.577604	4.00035	1.7883	7.89E-03
	ESTs	-1.63711	0.915477	-2.15328	1.83E-02
15	protocadherin 10	1.76718	5.1503	2.98569	2.52E-02
	KIAA1511 protein	0.620278	3.86886	1.57543	1.86E-03
	Homo sapiens cDNA FLJ13221 fis, clone NT2RP4002075	0.282785	3.44178	1.08178	1.31E-03
20	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4, soluble-form splice variant (FGFR4) mRNA, complete cds. /PROD=fibroblast growth factor receptor 4,soluble-form splice variant /FL=gb:NM_022963.1 gb:AF202063.1	-1.72385	2.26674	0.747239	6.86E-03
25	X75208 /FEATURE=cds /DEFINITION=HSPTKR H.sapiens HEK2 mRNA for protein tyrosine kinase receptor	-1.36729	2.60456	1.08204	1.58E-02
	Homo sapiens chemokine receptor	2.30557	6.72969	5.66933	3.31E-02
30	CXCR4 mRNA, complete cds. /PROD=chemokine receptor CXCR4 /FL=gb:AF348491.1				
	KIAA1415 protein	0.185854	3.70346	1.74255	7.78E-04
	ESTs	-0.048335	3.11786	0.836448	1.29E-02
35	Homo sapiens stanniocalcin 1 (STC1), mRNA. /PROD=stanniocalcin 1 /FL=gb:U25997.1 gb:NM_003155.1 gb:U46768.1	2.39435	6.55737	5.28007	2.19E-02
	Homo sapiens high mobility group protein-R mRNA, complete cds. /PROD=high mobility group protein-R /FL=gb:AF176039.1	1.04695	3.2786	0.095286	2.11E-02
40	ESTs, Moderately similar to ALU4_HUMAN ALU SUBFAMILY SB2 SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	-1.10358	1.66331	-0.98371	3.37E-02
45	Homo sapiens arrestin, beta 1 (ARRB1), transcript variant 1, mRNA. /PROD=arrestin beta 1, isoform A /FL=gb:BC003636.1 gb:AF084040.1 gb:NM_004041.2	-0.158844	2.41791	-0.40915	1.12E-02
50	ESTs	-1.34399	1.80279	-0.44529	1.60E-03
	Human mRNA for pro-alpha 1 (II) collagen 3end C- term. triple helical and C-terminal non-helical domain. /PROD=pro-alpha 1 (II) collagen (313 AA; AA 975-271c) /FL=gb:NM_001844.2	0.85982	4.1935	2.15657	1.09E-02
55	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp564B052 (DKFZp564B052), mRNA. /PROD=hypothetical protein DKFZp564B052 /FL=gb:NM_030820.1	1.47773	4.42479	2.00326	1.16E-03
	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	-0.695228	2.99328	1.31679	1.17E-03
60	Homo sapiens fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) (FEZ1), transcript variant 1, mRNA. /PROD=zygin 1, isoform 1 /FL=gb:U60060.1 gb:U69139.1	1.86433	4.71354	2.20315	8.62E-05
65					

(continua)

Título de Gen		Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	gb:NM_005103.2 Homo sapiens matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted) (MMP15), mRNA. /PROD=matrix metalloproteinase 15 preproprotein /FL=gb:D86331.1 gb:NM_002428.1	-0.298504	3.44582	1.8336	4.80E-03
15	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan) /FL=gb:M85289.1 gb:NM_005529.2 Homo sapiens dickkopf (Xenopus laevis) homolog 1 (DKK1), mRNA. /PROD=dickkopf (Xenopus laevis) homolog 1/FL=gb:AF177394.1 gb:NM_012242.1 gb:AF127563.1	-2.53327	0.924726	-0.97212	4.31E-02
20	ESTs	0.981469	3.70716	1.09014	1.76E-03
25	ESTs	-0.801487	3.37342	2.21393	1.22E-02
	ESTs	-2.57626	1.40231	0.050493	6.60E-03
	ESTs	0.499579	4.10541	2.39934	4.29E-03
30	Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA. /PROD=bone morphogenetic protein 2 precursor /FL=gb:NM_001200.1	2.04506	6.19114	5.02927	4.98E-02
	Human extracellular matrix protein 1 (ECM1) mRNA, complete cds. /PROD=extracellular matrix protein 1 /FL=gb:NM_004425.2 gb:U65932.1 gb:U68186.1	0.634778	3.65829	1.37564	6.11E-04
	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (NROB1). mRNA. /PROD=adrenal hypoplasia protein /FL=gb:NM_000475.2	-1.92783	2.32456	1.27907	2.99E-02
35	Homo sapiens cDNA: FLJ23067 fis, clone LNG04993.	-2.25626	1.95987	0.882498	6.62E-03
40	Homo sapiens ADP-ribosylation factor 4-like (ARF4L), mRNA. /PROD=ADP-ribosylation factor 4-like /FL=gb:U25771.1 gb:L38490.1 gb:NM_001661.1 gb:BC000043.1	1.63466	5.70351	4.48037	1.90E-02
	Homo sapiens HT016 mRNA, complete cds. /PROD=HT016 /FL=gb:AF225426.1	0.218762	3.97514	2.45222	3.37E-02
	Homo sapiens, tropomodulin, clone MGC:3643, mRNA, complete cds. /PROD=tropomodulin /FL=gb:NM_003275.1 gb:M77016.1 gb:BC002660.1	0.348796	3.54199	1.46427	1.29E-03
50	Homo sapiens hypothetical protein FLJ22471 (FLJ22471), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ22471 /FL=gb:NM_025140.1	0.903825	4.65366	3.1349	2.48E-02
	ESTs	-0.120583	2.94229	0.738304	7.20E-03
	ESTs, Moderately similar to JC4969 pig-c protein (H.sapiens)	-2.39713	0.906454	-1.04495	1.69E-02
55	Homo sapiens LIM homeobox protein 1 (LHX1), mRNA. /PROD=LIM homeobox protein 1 /FL=gb:NM_005568.1 gb:U14755.1	-0.77166	2.27746	0.085559	4.26E-02
60	Homo sapiens, hypothetical protein MGC2865, clone MGC:20246 IMAGE:4635389, mRNA, complete cds. /FL=gb:BC016043.1	-2.43105	0.646883	-1.50617	8.27E-03
	ESTs	-2.01523	2.16773	1.12403	1.99E-02
65					

(continua)

Título de Gen		Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (OGDH), mRNA. /PROD=oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) /FL=gb:D10523.1 gb:BC004964.1 gb:NM_002541.1	-0.032595	2.3997	-0.38533	1.45E-02
15	ESTs, Weakly similar to T32252 hypothetical protein T15B7.2 - Caenorhabditis elegans (C.elegans)	2.20966	5.35974	3.33255	1.12E-04
	Homo sapiens, cleft lip and palate associated transmembrane protein 1, clone MGC:10593, mRNA, complete cds. /PROD=cleft lip and palate associated transmembraneprotein 1 /FL=gb:BC004865.1	1.31578	3.52357	0.556735	2.92E-03
20	Homo sapiens clone TUA8 Cri-du-chat region mRNA	0.09218	3.37126	1.49746	6.46E-03
	Homo sapiens transcriptional activator of the c-fos promoter (CROC4), mRNA. /PROD=transcriptional activator of the c-fos promoter/FL=gb:NM_006365.1 gb:U49857.1	0.666391	4.50481	3.22532	5.80E-03
25	Homo sapiens hypothetical protein FLJ21195 similar to protein related to DAC and cerberus (FLJ21195), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ21195 similar to proteinrelated to DAC and cerberus /FL=gb:NM_022469.1	-1.38519	2.23626	0.763963	7.36E-03
30	ras homolog gene family, member B /FL=gb:AF498971.1 gb:NM_004040.1	-0.123101	2.52093	0.071885	1.86E-02
35	cartilage linking protein 1	0.879449	3.47789	0.987243	1.03E-03
	Homo sapiens BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNIP3) mRNA, complete cds. /PROD=BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3/FL=gb:AF002697.1 gb:NM_004052.2 gb:U15174.1	3.30506	6.91803	5.44746	1.79E-03
40	Homo sapiens polycythemia rubra vera 1; cell surface receptor (PRV1), mRNA. /PROD=polycythemia rubra vera 1; cell surfacereceptor /FL=gb:NM_020406.1 gb:AF146747.1	-1.19629	2.40987	0.93741	9.40E-03
45	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11560 (FLJ11560), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ11560 /FL=gb:NM_025182.1	-0.044112	3.42017	1.80688	3.77E-03
50	plexin A2	0.930527	4.36203	2.74167	1.52E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547H236 (from clone DKFZp547H236). /PROD=hypothetical protein	1.37193	4.24502	2.08129	5.37E-04
55	Homo sapiens cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) (CST3), mRNA. /PROD=cystatin C (amyloid angiopathy and cerebralhemorrhage) /FL=gb:NM_000099.1	2.08601	5.30525	3.51965	2.20E-03
60	ESTs, Moderately similar to NFY-C (H.sapiens)	-0.749407	2.00148	-0.24268	2.34E-03
	ESTs	2.54243	5.75201	3.97307	2.60E-02
	Homo sapiens sialyltransferase (STHM), mRNA. /PROD=sialyltransferase /FL=gb:U14550.1 gb:NM_006456.1	-0.68709	2.89586	1.50348	3.70E-02
65					

		(continua)				
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg	
5						
10	Homo sapiens SG2NA beta isoform mRNA, partial cds. /PROD=SG2NA beta isoform	-1.15566	1.13989	-1.53439	1.55E-02	
	Homo sapiens hypothetical protein FLJ12838 (FLJ12838), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ12838 /FL=gb:NM_024641.1	1.49091	4.80138	3.15205	2.63E-02	
15	Homo sapiens solute carrier (SLC25A18) mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product. /PROD=solute carrier /FL=gb:AY008285.1	0.403706	2.12385	-1.10043	1.78E-02	
20	KIAA0346 protein	-1.34736	2.49605	1.41497	3.90E-03	
	Human clone 23826 mRNA sequence	1.80782	4.07112	1.44315	2.28E-04	
	Homo sapiens receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2), mRNA. /PROD=receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 /FL=gb:M97639.1	1.53333	4.73839	3.05612	1.63E-02	
25	gb:NM_004560.1					
	Homo sapiens MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor) (MAZ), mRNA. /PROD=MYC-associated zinc finger protein(purine-binding transcription factor) /FL=gb:D85131.1	-0.055569	2.67075	0.511292	2.63E-02	
30	gb:NM_002383.1					
	Homo sapiens cDNA FLJ30081 fis, clone BGGI12000693, weakly similar to POLYHOMEOTIC-PROXIMAL CHROMATIN PROTEIN.	0.677905	3.33728	1.12499	1.12E-04	
35	Homo sapiens elongation of very long chain fatty acids (FEN1Elo2, SUR4Elo3, yeast)-like 2 (ELOVL2), mRNA.	0.099979	3.23372	1.50802	2.59E-03	
40	/PROD=elongation of very long chain fatty acids(FEN1Elo2, SUR4Elo3, yeast)-like 2 /FL=gb:NM_017770.1					
	Homo sapiens thyrotropin-releasing hormone (TRH), mRNA. /PROD=thyrotropin-releasing hormone	-1.65672	1.46994	-0.25839	3.02E-02	
45	/FL=gb:NM_007117.1					
	ESTs, Weakly similar to A46302 PTB-associated splicing factor, long form (H.sapiens)	0.894051	4.21835	2.69535	1.57E-02	
50	Human MLC1emb gene for embryonic myosin alkaline light chain, promoter and exon 1	1.3489	5.11354	4.03961	1.61E-02	
	Homo sapiens microseminoprotein, beta- (MSMB), mRNA. /PROD=microseminoprotein, beta-/FL=gb:NM_002443.1	-2.37904	1.3101	0.169915	2.46E-02	
55	Homo sapiens cDNA FLJ11390 fis, clone HEMBA1000561, weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 91.	-1.12944	2.02889	0.364373	0.00E+00	
60	ESTs, Weakly similar to ALU8_HUMAN ALU SUBFAMILY SX SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	2.76608	6.07949	4.57766	1.93E-02	
	Homo sapiens cDNA FLJ13810 fis, clone THYRO1000279	-2.92389	0.51764	-0.85322	8.08E-03	
65						

(continua)

5	Título de Gen	Tratamiento		Tratamiento		Tratamiento		P-Valor Benjamini Hochberg	y
		DE	en	DE	en	DE	en		
		+ AA	bajo	+ AA	+Wnt- 3 ^a en	+ AA	bajo		
		MATRIGEL		MATRIGEL		MEFS			
10	Homo sapiens, aminolevulinate, delta-, dehydratase, clone MGC:5057, mRNA, complete cds. /PROD=aminolevulinate, delta-, dehydratase /FL=gb:BC000977.1 gb:M13928.1 gb:NM_000031.1	1.3099		4.44525		2.76918		7.69E-03	
15	Homo sapiens kidney-specific membrane protein NX-17 mRNA, complete cds. /PROD=kidney-specific membrane protein NX-17 /FL=gb:AF229179.1	1.91929		5.08917		3.44968		6.91 E-03	
20	Homo sapiens alpha 2,8-sialyltransferase mRNA, complete cds. /PROD=alpha 2,8-sialyltransferase /FL=gb:L43494.1 gb:D26360.1 gb:L32867.1 gb:NM_003034.1	-1.10548		2.36359		1.05469		4.63E-03	
	tyrosine 3-monooxygenase tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	2.98486		6.17918		4.60758		8.01E-03	
25	Homo sapiens cardiac ankyrin repeat protein (CARP), mRNA. /PROD=cardiac ankyrin repeat protein /FL=gb:NM_014391.1	-0.002291		3.35645		1.98688		3.44E-02	
30	Homo sapiens porcupine (MG61), mRNA. /PROD=porcupine /FL=gb:AF317059.1 gb:AF317058.1 gb:NM_022825.1	1.51754		4.96311		3.68103		9.86E-03	
	collagen, type V, alpha 1 /FL=gb:D90279.1 gb:NM_000093.1 gb:M76729.1	1.5875		3.98844		1.66569		1.17E-03	
35	Homo sapiens forkhead box F2 (FOXF2), mRNA. /PROD=forkhead box F2 /FL=gb:U13220.1 gb:NM_001452.1	-1.54469		1.02305		-1.11517		6.95E-03	
40	PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2)	-1.92021		3.74378		2.77277		2.10E-02	
	Homo sapiens PRO1957 mRNA, complete cds. /PROD=PRO1957 /FL=gb:AF116676.1	1.68941		5.30311		4.22705		1.43E-02	
45	Homo sapiens hypothetical protein FLJ23514 (FLJ23514), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ23514 /FL=gb:NM_021827.1	0.564613		5.98527		5.24692		2.85E-02	
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586G2120 (from clone DKFZp586G2120); complete cds. /PROD=hypothetical protein /FL=gb:AL136924.1	-1.80897		1.69722		0.523009		2.47E-02	
50	Cluster Incl. L37033:Human FK-506 binding protein homologue (FKBP38) mRNA, complete cds /cds=(140,1207) /gb=L37033 /gi=965469 /ug=Hs. 173464 /len=1613	0.615619		3.478		1.66132		1.54E-02	
	ESTs	-0.004009		3.63657		2.61352		4.29E-02	
55	Homo sapiens apolipoprotein C-I (APOC1), mRNA. /PROD=apolipoprotein C-I precursor /FL=gb:NM_001645.2	3.24954		6.71073		5.50997		2.16E-02	
	ESTs	1.38635		4.93112		3.83641		1.39E-02	
60	Homo sapiens cDNA FLJ34035 fis, clone FCBBF2004788.	-3.58002		-0.48718		-2.00751		1.46E-02	
	Homo sapiens, clone IMAGE:3509274, mRNA, partial cds	0.493686		2.94923		0.794513		1.82E-02	

65

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini Hochberg y
5					
10	Homo sapiens putative sterol reductase SR-1 (TM7SF2) mRNA, complete cds. /PROD=putative sterol reductase SR-1 /FL=gb:AF096304.1	1.66857	4.3767	2.47833	5.37E-04
15	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha /FL=gb:NM_020529.1 gb:BC002601.1 gb:BC004983.1 gb:M69043.1	2.91463	6.48938	5.47812	1.97E-02
20	hypothetical protein FLJ12666 Homo sapiens ectodermal dysplasia 1, anhidrotic (ED1), mRNA. /PROD=ectodermal dysplasia 1, anhidrotic /FL=gb:AF060999.1 gb:NM_001399.1 gb:AF040628.1 gb:AF061189.1	0.215767 0.796627	3.10249 4.22895	1.40459 3.07833	1.91E-02 1.01 E-02
25	glycoprotein M6A /FL=gb:D49958.1 ESTs	0.274378 1.04714	3.59045 3.87608	2.3278 2.12752	2.64E-02 3.75E-02
30	ESTs ESTs, Weakly similar to KIAA1330 protein (H.sapiens) putative 47 kDa protein	-1.48489 -0.925232 0.156484	1.371 2.41149 2.78771	-0.35043 1.18187 0.861726	1.88E-03 2.65E-03 2.60E-02
35	Homo sapiens hypothetical protein FLJ32835 (FLJ32835), mRNA. /FL=gb:NM_152506.1 Homo sapiens GS1999full mRNA, complete cds. /FL=gb:AB048286.1	-0.595622 0.137029	4.84785 2.75189	3.94683 0.849942	3.34E-02 0.00E+00
40	Homo sapiens hexabrachion (tenascin C, cytactin) (HXB), mRNA. /PROD=hexabrachion (tenascin C, cytactin) /FL=gb:M55618.1 gb:NM_002160.1 +Homo sapiens Pig10 (PIG10) mRNA, complete cds. /PROD=Pig10 /FL=gb:AF059611.1 gb:AF010314.1 gb:NM_003633.1 gb:BC000418.1 gb:AF005381.1	3.96862 0.129454	5.66572 2.86013	2.85391 1.09765	1.39E-02 1.16E-03
45	Homo sapiens annexin A6 (ANXA6), transcript variant 1, mRNA. /PROD=annexin VI isoform 1 /FL=gb:D00510.1 gb:J03578.1 gb:NM_001155.2 Homo sapiens c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (MERTK), mRNA. /PROD=c-mer proto-oncogene tyrosine kinase /FL=gb:NM_006343.1 gb:U08023.1	3.89026 1.78994 0.434199	6.43752 4.92901 5.04863	4.49981 3.61665 5.2167	8.81 E-04 1.84E-02 2.46E-02
50	Homo sapiens caspase-like apoptosis regulatory protein 2 (clarp) mRNA, alternatively spliced, complete cds. /PROD=caspase-like apoptosis regulatory protein 2 /FL=gb:AF005775.1	0.434199	5.04863	5.2167	2.46E-02
55	Human embryonic myosin alkali light chain (MLC1) mRNA, complete cds. /FL=gb:M36172.1 gb:M24121.1 gb:NM_002476.1	1.94171	5.24959	4.11475	2.11E-02
60	Homo sapiens phosphatidylinositol-4-phosphate 5- kinase, type I, beta (PIP5K1B), mRNA. /PROD=phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta /FL=gb:NM_003558.1	1.34876	4.12788	2.46657	3.66E-03
65	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434E082 (from clone DKFZp434E082)	1.36443	4.34866	2.94283	2.92E-03

(continua)					
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types), includes DXS142, DXS164, DXS206, DXS230, DXS239, DXS268, DXS269, DXS270, DXS272 (DMD), transcript variant Dp427p2, mRNA.	1.40427	4.41881	3.04441	1.83E-02
15	/PROD=dystrophin Dp427p2 isoform /FL=gb:NM_004010.1 Homo sapiens, clone MGC:14801, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:14801) /FL=gb:BC005997.1	2.03928	3.96694	1.51059	5.65E-04
20	Homo sapiens hypothetical protein BC017868 (LOC159091), mRNA. /FL=gb:BC017868.1 gb:NM_138819.1	-0.290244	2.2418	0.40157	6.04E-03
25	ESTs, Highly similar to AF229172 1 class III myosin (H.sapiens) Homo sapiens solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 5 (SLC9A5), mRNA. /PROD=solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 5 /FL=gb:AF111173.1 gb:NM_004594.1	-0.475471	1.94826	0.002417	5.28E-03
30	Homo sapiens F37Esophageal cancer-related gene-coding leucine-zipper motif (FEZ1), mRNA. /PROD=F37Esophageal cancer-related gene-coding leucine-zipper motif /FL=gb:AF123659.1 gb:NM_021020.1	-0.128814	3.17069	2.10422	1.54E-02
35	Homo sapiens deiodinase, iodothyronine, type III (DIO3), mRNA. /PROD=thyroxine deiodinase type III /FL=gb:NM_001362.1 gb:S79854.1	-0.136937	5.08366	4.22897	1.41E-02
40	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6), mRNA. /PROD=insulin-like growth factor binding protein 6 /FL=gb:BC005007.1 gb:M62402.1 gb:BC003507.1 gb:NM_002178.1	2.6126	5.13945	3.30402	9.72E-04
45	Homo sapiens U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (65kD) (U2AF65), mRNA. /PROD=U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (65kD) /FL=gb:NM_007279.1	-0.821533	1.81533	0.096512	4.72E-02
50	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp434F0318 (DKFZP434F0318), mRNA. /PROD=hypothetical protein DKFZp434F0318 /FL=gb:NM_030817.1	-1.11464	1.81375	0.394686	9.09E-03
55	Homo sapiens BACE mRNA for beta-site APP cleaving enzyme 1-476, complete cds. /PROD=beta-site APP cleaving enzyme 1-476 /FL=gb:AB050436.1	0.48553	3.13284	1.44588	4.99E-04
60	ESTs, Weakly similar to ALUC_HUMAN !!!! ALU CLASS C WARNING ENTRY !!! (H.sapiens) Homo sapiens mRNA for KIAA0876 protein, partial cds. /PROD=KIAA0876 protein	1.07951	4.06134	2.7193	2.11 E-02
65		-0.432037	1.97736	0.073246	3.37E-02

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens mRNA for protein-tyrosine kinase, complete cds. /PROD=protein-tyrosine kinase /FL=gb:U05682.1 gb:D17517.1 gb:D50479.1 KIAA0418 gene product	0.160986	2.75713	1.04172	2.11E-02
15	Homo sapiens phosphofructokinase, liver (PFKL), mRNA. /PROD=phosphofructokinase, liver /FL=gb:NM_002626.1 gb:BC004920.1 gb:X15573.1	-0.677643	1.83134	0.034385	1.45E-04
	Homo sapiens enolase 2, (gamma, neuronal) (ENO2), mRNA. /PROD=enolase 2, (gamma, neuronal) /FL=gb:NM_001975.1 gb:BC002745.1 gb:M22349.1	2.039	4.51747	2.70388	1.28E-03
20	Homo sapiens AD036 mRNA, complete cds. /PROD=AD036 /FL=gb:AF260333.1	2.60624	5.37458	3.92621	3.17E-03
	ESTs	-0.503334	2.65787	1.60278	3.61 E-02
25	Homo sapiens keratin 19 (KRT19), mRNA. /PROD=keratin 19 /FL=gb:NM_002276.1 gb:BC002539.1	-2.07933	1.00157	-0.1307	2.39E-02
	pleiomorphic adenoma gene-like 1 /FL=gb:U72621.3	3.80582	6.96535	5.91937	2.11E-02
30	Homo sapiens, Similar to lipase protein, clone MGC:2843, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to lipase protein /FL=gb:NM_020676.1 gb:BC001698.1	-0.646793	1.88692	0.221481	4.21E-03
35	Cluster Incl. AB002344:Human mRNA for KIAA0346 gene, partial cds /cds=(0,4852) /gb=AB002344 /gi=2280479 /ug=Hs.103915 /len=6121	-1.16073	1.9994	0.961706	1.89E-02
40	Cluster Incl. N80935:zb07g06.s1 Homo sapiens cDNA, 3 end /clone=IMAGE-301402/clone_end=3 /gb=N80935 /gi=1243636 /ug=Hs.22483 /len=527	2.15679	4.91332	3.47797	7.39E-03
	tryptase, alpha	2.12419	4.48236	2.66555	1.50E-02
	ESTs, Weakly similar to Z132_HUMAN ZINC FINGER PROTEIN 13 (H.sapiens)	2.99108	5.46095	3.76442	1.31E-03
45	Homo sapiens core histone macroH2A2.2 (MACROH2A2), mRNA. /PROD=core histone macroH2A2.2 /FL=gb:AF151534.1 gb:NM_018649.1	1.04865	3.65906	2.12166	2.43E-02
	ESTs	1.67293	4.73906	3.66212	3.62E-02
50	Human rho GDI mRNA, complete cds. /PROD=human rho GDI /FL=gb:M97579.1 gb:D13989.1	-0.146413	2.69334	1.39451	1.02E-02
	gb:NM_004309.1	0.019358	1.75075	-0.65155	1.85E-02
	heat shock 90kD protein 1, alpha	1.69225	4.20576	2.60887	2.10E-02
55	Homo sapiens BTB (POZ) domain containing 2 (BTBD2), mRNA. /PROD=BTB (POZ) domain containing 2 /FL=gb:NM_017797.1	1.10085	3.7628	2.32464	1.85E-02
60	Homo sapiens mandaselin long form mRNA, complete cds. /PROD=mandaselin long form /FL=gb:AY048775.1	-0.148053	2.58361	1.2296	1.57E-02
	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	-0.837261	1.90254	0.560225	8.83E-04

65

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E), mRNA. /PROD=lymphocyte antigen 6 complex, locus E /FL=gb:U42376.1	0.866364	4.91832	4.92642	2.78E-02
	gb:NM_002346.1 gb:U56145.1 ESTs	-1.24632	1.09042	-0.61316	4.05E-02
15	Homo sapiens, clone IMAGE:4047715, mRNA.	-2.50816	1.81	1.52693	2.63E-02
	Cluster Incl. AB002344:Human mRNA for KIAA0346 gene, partial cds /cds=(0,4852) /gb=AB002344 /gi=2280479 /ug=Hs.103915 /len=6121	1.89578	4.61333	3.31717	1.12E-02
20	Homo sapiens singed (Drosophila)-like (sea urchin fascin homolog like) (SNL), mRNA. /PROD=singed (Drosophila)-like (sea urchin fascin homolog like) /FL=gb:BC000521.1 gb:NM_003088.1 gb:U03057.1 gb:U09873.1	4.23317	6.74774	5.25403	5.12E-03
25	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586L0120 (from clone DKFZp586L0120).	-2.72593	1.58998	1.27994	4.54E-02
	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10), mRNA. /PROD=mitogen-activated protein kinase 10 /FL=gb:U07620.1 gb:U34819.1 gb:U34820.1 gb:NM_002753.1	0.647994	3.46459	2.28644	6.65E-03
30	Homo sapiens transmembranetyrosine kinase mRNA, complete cds. /PROD=tyrosine kinase /FL=gb:L08961.1	-0.006089	2.96035	1.93237	7.69E-03
35	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp762H185 (from clone DKFZp762H185)	2.83663	5.30784	3.79206	6.22E-03
	tyrosine 3-monooxygenase tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	3.48271	6.19368	4.92556	2.11E-02
40	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434K0621 (from clone DKFZp434K0621); partial cds	0.581419	3.38088	2.21428	3.89E-02
	ESTs, Weakly similar to ALUF_HUMAN !!!! ALU CLASS F WARNING ENTRY !!! (H.sapiens)	-1.03247	1.75349	0.587598	2.11E-02
45	tudor repeat associator with PCTAIRE 2	2.15771	4.69127	3.27451	2.63E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564K1672 (from clone DKFZp564K1672); partial cds. /PROD=hypothetical protein	4.49405	7.38448	6.33474	1.39E-02
50	ESTs	-0.184212	2.15367	0.554696	1.15E-02
	Homo sapiens bHLH factor Hes4 (LOC57801), mRNA. /PROD=bHLH factor Hes4 /FL=gb:NM_021170.1 gb:AB048791.1	0.47816	3.40725	2.40001	3.16E-02
55	Homo sapiens guanylate cyclase activator 1B (retina) (GUCA1B), mRNA. /PROD=guanylate cyclase activator 1 B (retina) /FL=gb:M95174.1 gb:NM_002098.1 gb:M97496.1	-0.714216	1.95339	0.684983	3.38E-03
	KIAA0918 protein	-1.39708	0.961939	-0.57499	1.40E-02
60	Homo sapiens mRNA for KIAA1161 protein, partial cds. /PROD=KIAA1161 protein	0.781796	3.32846	1.98143	6.60E-03

65

(continua)

5	Título de Gen	Tratamiento		Tratamiento		Tratamiento		P-Valor Benjamini Hochberg	y
		DE	en	DE	en	DE	en		
		serum	bajo	serum	bajo	serum	bajo		
		+ AA	en	+ AA	+Wnt-	+ AA	en		
		MATRIGEL		3ª	en	MEFS			
				MATRIGEL					
10	Homo sapiens, Similar to B9 protein, clone MGC:11339, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to B9 protein /FL=gb:BC002944.1	1.43881		3.80457		2.29205		8.62E-05	
	hypothetical protein FLJ 12666	2.34087		5.11201		4.02837		1.97E-02	
15	Homo sapiens FLICE-like inhibitory protein short form mRNA, complete cds. /PROD=FLICE-like inhibitory protein short form /FL=gb:U97075.1	0.135783		4.45631		4.92758		1.96E-02	
20	Homo sapiens olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 (OR52A1), mRNA. /PROD=olfactory receptor, family 52, subfamily A, member 1 /FL=gb:NM_012375.1	-0.309574		2.08723		0.636487		4.36E-03	
25	Human DNA sequence from clone RP4-781 L3 on chromosome 1p34.3-36.11 Contains a pseudogene similar to IFITM3 (interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)), STSs and GSSs	2.82768		5.54517		4.43909		2.04E-03	
	Homo sapiens KIAA0127 gene product (KIAA0127), mRNA. /PROD=KIAA0127 gene product /FL=gb:D50917.1 gb:NM_014755.1	2.05236		4.43794		3.00216		3.12E-02	
30	Homo sapiens clone HB-2 mRNA sequence	-0.503949		2.27896		1.25171		3.01E-02	
	hypothetical protein FLJ23091	-0.76092		3.70916		3.04154		2.45E-02	
	ESTs	-0.403665		2.01868		0.643615		5.11E-04	
35	ESTs	2.14401		4.70353		3.47114		3.15E-03	
	Homo sapiens regulator of G protein signalling 5 (RGS5) mRNA, complete cds. /PROD=regulator of G protein signalling 5 /FL=gb:AF493929.1	3.0091		5.37511		3.95132		1.29E-03	
40	endothelin receptor type A /FL=gb:NM_001957.1 gb:L06622.1	-1.83423		2.54948		1.95432		1.51E-02	
	H.sapiens skeletal embryonic myosin light chain 1 (MLC1) mRNA. /PROD=myosin light chain 1	0.690058		3.3896		2.36018		3.27E-02	
45	Homo sapiens Kruppel-like factor 8 (KLF8), mRNA. /PROD=Kruppel-like factor 8 /FL=gb:U28282.1 gb:NM_007250.1	0.326119		2.825		1.63929		3.92E-02	
	hypothetical protein DKFZp434F2322	0.070576		2.58185		1.42121		5.81E-03	
50	Homo sapiens transcription factor 2, hepatic; LF-B3; variant hepatic nuclear factor (TCF2), transcript variant a, mRNA. /PROD=transcription factor 2, isoform a /FL=gb:NM_000458.1	-1.12537		3.45355		2.54347		1.15E-02	
	H2A histone family, member X	1.37085		2.48515		-0.04057		1.34E-02	
55	Homo sapiens H1 histone family, member X (H1FX), mRNA. /PROD=H1 histone family, member X /FL=gb:D64142.1 gb:BC000426.1 gb:NM_006026.1	3.21701		5.68105		4.50969		4.29E-03	
	ESTs, Weakly similar to KIAA1399 protein (H.sapiens)	-0.831241		2.82364		2.79997		4.18E-02	
60	Homo sapiens PNAS-145 mRNA, complete cds. /PROD=PNAS-145 /FL=gb:U03105.1 gb:NM_006813.1 gb:AF279899.1	2.84962		5.38084		4.2868		8.61E-03	

65

(continua)

Título de Gen		Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin) (EPB49), mRNA. /PROD=erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin) /FL=gb:NM_001978.1 gb:U28389.1	-0.306603	2.11391	0.923806	4.81E-03
15	ESTs	0.783545	3.23146	2.07738	2.13E-02
	ESTs	1.17515	3.61815	2.46265	1.56E-03
	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	2.09472	5.82355	5.68859	3.63E-02
20	Novel human mRNA from chromosome 22. /PROD=hypothetical protein	-0.533665	3.44679	3.05803	3.99E-02
	Homo sapiens partial mRNA for putative nuclear factor. /PROD=putative nuclear factor /FL=gb:NM_017688.1	1.55224	3.89366	2.67866	1.53E-03
25	Homo sapiens BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNIP3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA. /PROD=BCL2adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 /FL=gb:AF002697.1 gb:NM_004052.2 gb:U15174.1	4.51142	6.99506	5.92755	2.25E-03
30	Homo sapiens bone morphogenetic protein 5 (BMP5), mRNA. /PROD=bone morphogenetic protein 5 /FL=gb:M60314.1 gb:NM_021073.1	-0.6099	1.76351	0.614791	6.46E-03
35	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (NR0B1), mRNA. /PROD=adrenal hypoplasia protein /FL=gb:NM_000475.2	-0.213822	4.14059	3.29782	3.42E-02
40	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434P228 (from clone DKFZp434P228)	1.76846	4.196	3.11284	1.23E-02
	Homo sapiens pilin-like transcription factor (PILB), mRNA. /PROD=pilin-like transcription factor /FL=gb:AF122004.1 gb:NM_012228.1	3.14467	5.51066	4.38212	3.80E-03
45	Homo sapiens complement component 5 (C5), mRNA. /PROD=complement component 5 /FL=gb:M57729.1 gb:NM_001735.1	-1.89639	1.65637	1.59643	1.74E-02
50	Homo sapiens adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit (AP3B2), mRNA. /PROD=adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit /FL=gb:AF022152.1 gb:NM_004644.1 gb:U37673.1	-0.208283	2.17404	1.07398	1.39E-02
55	Homo sapiens dynein, axonemal, light polypeptide 4 (DNAL4), mRNA. /PROD=dynein, axonemal, light polypeptide 4 /FL=gb:BC002968.1 gb:NM_005740.1	0.458271	2.88755	1.8494	3.66E-03
	Homo sapiens, Similar to RIKEN cDNA C330013D18 gene, clone MGC:11226, mRNA, complete cds	0.087468	2.45867	1.42701	3.35E-03
60	Homo sapiens cDNA: FLJ22731 fis, clone HSI15841. ESTs	-2.30948	1.62817	2.24143	4.15E-02
		0.532996	4.6172	3.79228	2.76E-02
	Homo sapiens CXCR4 gene encoding receptor CXCR4	3.11086	7.24917	6.36084	3.13E-02
65	stanniocalcin 1	2.48686	6.20245	5.70081	4.94E-02

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	KIAA0761 protein ESTs Homo sapiens cDNA FLJ36116 fis, clone TESTI2022338.	-2.09591 -1.16374 3.02587	1.57935 2.24964 6.7146	1.05907 2.52108 6.15456	1.86E-02 3.83E-02 3.88E-02
15	Homo sapiens, clone MGC:24252 IMAGE:3932604, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:24252) /FL=gb:BC014364.1 Homo sapiens cDNA FLJ13392 fis, clone PLACE1001280	-1.53346 -1.90184	2.53854 1.76129	1.59251 1.16856	3.91 E-03 1.47E-02
20	Homo sapiens hypothetical protein FLJ12538 similar to ras-related protein RAB17 (FLJ12538), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ12538 similar toras- related protein RAB17 /FL=gb:AL136645.1	1.70617	5.11419	4.73391	2.71E-02
25	gb:NM_022449.1 Human DNA sequence from clone RP11-446H13 on chromosome 10. Contains the 3 end of the gene for a novel protein similar to KIAA1059 (ortholog of mouse VPS10 domain receptor protein SORCS), an RPL23A (60S ribosomal protein 23A) pseudogene, ESTs, STS an	-0.889422	2.90076	2.11955	3.52E-02
30	Homo sapiens calmegin (CLGN), mRNA. /PROD=calmegin /FL=gb:NM_004362.1	-0.104278	2.97817	3.11092	1.89E-02
35	gb:D86322.1 Homo sapiens testican 3 (HSAJ1454), mRNA. /PROD=testican 3 /FL=gb:NM_016950.1	-2.81226	0.7939	1.55068	3.99E-02
40	gb:BC000460.1 gb:BC003017.1 Homo sapiens gelsolin (amyloidosis, Finnish type) (GSN), mRNA. /PROD=gelsolin (amyloidosis, Finnish type) /FL=gb:NM_000177.1	1.6198	4.54047	4.45008	1.07E-02
45	Homo sapiens endothelin receptor type A (EDNRA), mRNA. /PROD=endothelin receptor type A /FL=gb:NM_001957.1 gb:L06622.1 Homo sapiens cDNA: FLJ22808 fis, clone KIAA2925.	0.763007 -0.367449	4.05983 2.7584	3.55203 2.41394	3.99E-02 4.31E-02
50	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10312 (FLJ10312), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ10312 /FL=gb:NM_030672.1 Homo sapiens lipase mRNA, complete cds. /PROD=lipase /FL=gb:AF225418.1	1.59498 -2.2131	4.6335 1.0208	4.89157 0.55849	4.85E-02 3.57E-02
55	Homo sapiens clone FLC1492 PRO3121 mRNA, complete cds. /PROD=PRO3121 /FL=gb:AF130082.1 protease, serine, 4 (trypsin 4, brain) Homo sapiens ret finger protein-like 2 (RFPL2), mRNA. /PROD=ret finger protein-like 2 /FL=gb:NM_006605.1	-0.300037 -0.345569 -2.15511	-0.46894 2.86256 1.1797	-3.39203 3.35886 0.503917	1.80E-02 4.65E-02 1.94E-02
60	Homo sapiens beta3GalNAcT-1 mRNA for globoside synthase, complete cds, clone type 2. /PROD=globoside	-2.73257	0.21269	-0.0984	2.48E-02
65					

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini Hochberg y
5					
10	synthase /FL=gb:AB050856.1 Homo sapiens hypothetical protein FLJ11155 (FLJ11155), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ11155 /FL=gb:NM_018342.1	-3.34565	-0.42738	-0.71255	3.07E-02
15	Homo sapiens, dual specificity phosphatase 4, clone MGC:3713, mRNA, complete cds. /PROD=dual specificity phosphatase 4 /FL=gb:NM_001394.2 gb:BC002671.1 gb:U48807.1 gb:U21108.1	2.11487	5.16681	5.60057	3.11E-02
20	Homo sapiens MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 6 (MADH6), mRNA. /PROD=MAD (mothers against decapentaplegic,Drosophila) homolog 6 /FL=gb:U59914.1 gb:NM_005585.1	0.917516	4.29847	3.5309	2.44E-02
25	secreted frizzled-related protein 1 /FL=gb:AF056087.1 gb:NM_003012.2 gb:AF017987.1 gb:AF001900.1	1.64933	4.41286	4.21799	4.12E-02
30	Homo sapiens secreted apoptosis related protein 2 (SARP2) mRNA, complete cds. /PROD=secreted apoptosis related protein 2 /FL=gb:AF056087.1 gb:NM_003012.2 gb:AF017987.1 gb:AF001900.1	3.18446	5.9316	5.74251	3.31E-02
35	KIAA0882 protein Homo sapiens nudix (nucleoside diphosphate linked moietyX)-type motif 4 (NUDT4), mRNA. /PROD=nudix (nucleoside diphosphate linked moietyX)-type motif 4 /FL=gb:NM_019094.1 gb:AF191653.1 gb:AF191649.1 gb:AF191650.1	2.05587 3.91519	4.63577 6.54632	4.67451 6.42767	4.89E-02 4.63E-02
40	Homo sapiens cDNA FLJ31061 fis, clone HSYRA2000927.	-1.30452	2.06218	1.20749	1.72E-02
45	Homo sapiens diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase type 2 beta (NUDT4) mRNA, complete cds. /PROD=diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase type 2 beta /FL=gb:NM_019094.1 gb:AF191653.1 gb:AF191649.1 gb:AF191650.1	2.62612	5.53515	5.12935	3.96E-02
50	Homo sapiens titin (TTN), mRNA. /PROD=titin /FL=gb:NM_003319.1	-0.466154	2.46856	2.00309	4.18E-03
55	carboxypeptidase E /FL=gb:NM_001873.1 ESTs	2.72316 -1.80443	5.80072 0.692933	5.15668 0.613229	2.99E-02 1.46E-03
60	Homo sapiens hypothetical protein FLJ39502 (FLJ39502), mRNA. /FL=gb:NM_173648.1	-1.60435	1.6149	2.4204	2.10E-02
65	Homo sapiens renal tumor antigen (RAGE), mRNA. /PROD=renal tumor antigen /FL=gb:NM_014226.1 gb:AB022694.1	-0.305406	2.4556	2.09136	3.30E-02
	T-box 3 (ulnar mammary syndrome)	-1.70952	1.31576	0.679584	1.29E-02

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAP3K8), mRNA. /PROD=mitogen-activated protein kinase kinase kinase8 /FL=gb:NM_005204.1 gb:D14497.1	-1.14241	1.82177	1.23928	2.48E-02
15	Homo sapiens enoyl-Coenzyme A, hydratase3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase (EHHADH), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA. /PROD=enoyl-Coenzyme A, hydratase3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase /FL=gb:NM_001966.1 gb:L07077.1	0.226733	3.18231	2.59938	6.22E-03
20	ESTs	1.65525	3.9984	3.98375	1.97E-02
	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), mRNA. /PROD=secreted frizzled-related protein 1 /FL=gb:AF056087.1 gb:NM_003012.2 gb:AF017987.1 gb:AF001900.1	3.91678	7.18429	6.24313	2.35E-02
25	ESTs	2.28659	5.21675	4.59884	3.11E-02
	Homo sapiens selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1), mRNA. /PROD=selenoprotein P precursor /FL=gb:NM_005410.1	2.73332	5.13625	5.04138	1.75E-02
30	hypothetical protein FLJ 12838 /FL=gb:NM_024641.1	2.21522	5.4785	4.50835	4.55E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761M1216 (from clone DKFZp761M1216)	-2.59761	0.092924	-0.31569	4.19E-02
35	Homo sapiens KPL1 (KPL1) mRNA, complete cds. /PROD=KPL1 /FL=gb:AF081583.1 gb:U89715.1 gb:NM_021200.1	-0.08886	2.51294	2.15967	1.97E-02
40	Homo sapiens, synovial sarcoma, X breakpoint 1, clone MGC:5162, mRNA, complete cds. /PROD=synovial sarcoma, X breakpoint 1 /FL=gb:BC001003.2 gb:NM_005635.1	-1.57209	1.39869	2.12662	6.84E-03
45	Homo sapiens, Similar to testican 3, clone MGC:8506, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to testican 3 /FL=gb:NM_016950.1 gb:BC000460.1 gb:BC003017.1	-2.778	0.563149	1.66935	1.87E-02
	ESTs	0.502949	3.0682	2.72874	2.02E-02
50	Homo sapiens cDNA FLJ32963 fis, clone TESTI2008405.	1.49644	3.87336	3.68478	6.89E-03
	triadin /FL=gb:U18985.1 gb:NM_006073.1	-1.61408	0.713083	0.566175	1.87E-02
	Homo sapiens adlcan mRNA, complete cds. /PROD=adlcan /FL=gb:AF245505.1	0.872786	3.20404	3.02406	4.21 E-02
55	Human midkine mRNA, complete cds. /PROD=midkine /FL=gb:NM_002391.1 gb:M69148.1	3.55275	5.93819	5.68363	1.89E-02
60	Homo sapiens, synovial sarcoma, X breakpoint 4, clone MGC:12411, mRNA, complete cds. /PROD=synovial sarcoma, X breakpoint 4 /FL=gb:BC005325.1	-0.806785	1.90972	2.5215	4.17E-02
	ESTs	-3.61193	-0.9408	-1.53439	2.43E-03
65	ESTs	-0.619714	1.93617	1.44843	4.14E-02

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3ª en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	ESTs	0.446983	3.14315	2.48676	1.98E-02
	Homo sapiens flavin containing monooxygenase 5 (FMO5), mRNA. /PROD=flavin containing monooxygenase 5 /FL=gb:L37080.1 gb:NM_001461.1	-0.476203	1.99948	1.55491	3.73E-02
15	Homo sapiens aminopeptidase A mRNA, complete cds. /PROD=aminopeptidase A /FL=gb:L12468.1 gb:NM_001977.1 gb:L14721.1	-0.758987	2.07596	1.20831	3.00E-02
20	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp761H1710 (DKFZP761H1710), mRNA. /PROD=hypothetical protein DKFZp761H1710 /FL=gb:NM_031297.1	-0.713164	2.03145	1.24823	2.17E-03
	ESTs	-1.94194	0.608912	0.013238	1.72E-02
25	Homo sapiens sialyltransferase 8 (alpha-2, 8-polysialyltransferase) D (SIAT8D), mRNA. /PROD=sialyltransferase 8 (alpha-2,8-polysialyltransferase) D /FL=gb:NM_005668.1 gb:L41680.1	-1.07243	1.83889	0.855205	2.16E-02
30	Homo sapiens, clone IMAGE:5194204, mRNA. hypothetical protein MGC4342 /FL=gb:NM_024329.1 gb:BC003033.1	-2.13256 -0.403018	0.383746 2.01722	1.02639 1.41263	4.55E-02 1.97E-02
35	Homo sapiens PHD finger protein 1 (PHF1), transcript variant 2, mRNA. /PROD=PHD finger protein 1, isoform b /FL=gb:NM_024165.1 gb:AF052205.1	0.620171	2.95191	2.42296	2.32E-02
	actinin, alpha 4	0.436893	3.11051	2.23625	5.44E-03
40	Homo sapiens PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1), mRNA. /PROD=PCTAIRE protein kinase 1 /FL=gb:NM_006201.1	2.38171	4.87071	4.16957	2.90E-03
	Human DNA sequence from clone RP11-165F24 on chromosome 9. Contains the 3 end of the gene for a novel protein (similar to Drosophila CG6630 and CG11376, KIAA1058, rat	0.167347	2.56439	1.93736	3.93E-02
45	TRG), an RPL12 (60S ribosomal protein L12) pseudogene, ESTs, STSs, GSSs and a C...				
50	insulin-like growth factor binding protein 3 /FL=gb:NM_000598.1	0.921068	3.60279	2.67905	4.80E-02
	Homo sapiens, clone IMAGE:3840937, mRNA, partial cds. /PROD=Unknown (protein for IMAGE:3840937)	3.59778	6.12936	6.92649	8.62E-05
55	Homo sapiens phosphoglucomutase 1 (PGM1), mRNA. /PROD=phosphoglucomutase 1 /FL=gb:NM_002633.1 gb:BC001756.1 gb:M83088.1	4.74364	7.09524	6.43056	2.21E-02
	apolipoprotein C-I	2.77701	5.23054	4.44049	3.39E-02
60	Homo sapiens insulin induced gene 1 (INSIG1), mRNA. /PROD=insulin induced gene 1 /FL=gb:NM_005542.1	2.11462	4.44128	3.77765	3.21E-02
65	Human a6(IV) collagen (COL4A6) mRNA, complete cds. /PROD=A type IV collagen /FL=gb:U04845.1	0.798849	3.23623	2.41372	1.38E-03

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini Hochberg y
5					
10	Homo sapiens mRNA for alpha 1,6- fucosyltransferase, complete cds. /PROD=alpha 1,6- fucosyltransferase /FL=gb:AB049740.2	1.31479	3.6699	2.90742	3.48E-02
	ESTs, Moderately similar to Six5 (M.musculus)	0.434259	2.81512	1.9556	1.23E-02
15	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 /FL=gb:NM_006931.1 gb:M20681.1	5.23156	7.63734	6.74444	1.99E-02
	Human acid sphingomyelinase (ASM) mRNA, complete cds. /PROD=acid sphingomyelinase /FL=gb:NM_000543.1 gb:M59916.1	1.03965	3.45689	2.52125	2.62E-02
20	ESTs, Weakly similar to unnamed protein product (H.sapiens)	3.0131	5.41021	4.46614	4.79E-03
	Homo sapiens cDNA FLJ33178 fis, clone ADRGL2002753.	0.137476	-1.9718	-4.73502	2.23E-03
25	Homo sapiens, parathyroid hormone-like hormone, clone MGC:14611, mRNA, complete cds. /PROD=parathyroid hormone-like hormone /FL=gb:BC005961.1	2.46289	-0.34647	-1.96791	3.05E-02
30	Homo sapiens colon carcinoma related protein (LOC51159), mRNA. /PROD=colon carcinoma related protein /FL=gb:NM_016206.1 gb:AF099505.1	2.50614	-0.01889	-1.04926	2.52E-02
	KIAA0036 gene product	3.05174	-0.66523	-2.2068	2.62E-02
35	Homo sapiens cDNA FLJ13536 fis, clone PLACE1006521	4.27968	1.86625	1.70965	1.11E-02
	Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126	3.68063	1.24806	1.39728	1.42E-02
40	Homo sapiens UDP-N-acetylglucosamine:a-1,3-D- mannoside beta-1,4-N- acetylglucosaminyltransferase IV-homolog (HGNT- IV-H), mRNA. /PROD=UDP-N-acetylglucosamine:a- 1,3-D-mannosidebeta-1,4-N- acetylglucosaminyltransferase IV-homolog /FL=gb:AB024729.1 gb:NM_0	2.71164	0.270906	0.433883	1.98E-02
45	tissue factor pathway inhibitor 2 /FL=gb:D29992.1 gb:L27624.1 gb:NM_006528.1 gb:BC005330.1	4.19529	1.63281	1.58393	7.53E-03
	ESTs	2.8924	0.521234	0.762594	2.82E-02
	putative gene product	-0.518738	-0.66615	1.82038	4.91 E-02
50	Homo sapiens mRNA for KIAA1758 protein, partial cds. /PROD=KIAA1758 protein	2.42082	-0.03923	0.213473	1.25E-02
	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) /FL=gb:L25124.1 gb:D28472.1 gb:NM_000958.1 gb:L28175.1	2.58497	0.196846	0.527172	1.42E-02
55	Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126	2.85068	0.473875	0.830447	1.97E-02
	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O- sulfotransferase 2 (HS3ST2), mRNA. /PROD=heparan sulfate D-glucosaminyl3-O- sulfotransferase 2 /FL=gb:AF105375.1 gb:AF105374.1 gb:NM_006043.1	3.18462	0.571052	0.709206	4.54E-02
60					
65					

		(continua)			
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens schwannomin interacting protein 1 (SCHIP-1), mRNA. /PROD=schwannomin interacting protein 1 /FL=gb:AF145713.1 gb:NM_014575.1	5.5957	3.21054	3.57915	2.11E-02
	Human lysyl oxidase (LOX) gene, exon 7	2.11886	-0.24936	0.138069	2.55E-03
15	Human nephropontin mRNA, complete cds. /PROD=nephropontin /FL=gb:M83248.1	7.82555	5.27856	5.06542	4.61E-02
	Human mRNA for KIAA0386 gene, complete cds. /FL=gb:AB002384.1	3.9213	1.56305	1.13663	1.93E-02
	ESTs	3.22146	0.851355	0.404487	3.41 E-03
20	Human glioma pathogenesis-related protein (GliPR) mRNA, complete cds. /PROD=glioma pathogenesis-related protein /FL=gb:NM_006851.1 gb:U16307.1	3.20187	0.502872	0.348681	1.34E-02
	ESTs	2.96697	0.440894	0.773495	1.97E-02
25	Homo sapiens cDNA FLJ13384 fis, clone PLACE1001062, highly similar to Homo sapiens mRNA for lysine-ketoglutarate reductasesaccharopine dehydrogenase.	5.9221	3.48419	3.9531	3.38E-02
30	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp76111912 (from clone DKFZp76111912)	6.06894	3.31919	3.4798	4.97E-02
	ESTs	4.12419	1.53997	1.88239	5.68E-03
	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA. /PROD=fibroblast growth factor 2 (basic) /FL=gb:NM_002006.1 gb:M27968.1	5.49297	2.64534	2.76054	4.71E-02
35	ribosomal protein L34 pseudogene 1	3.45116	2.78236	5.10812	2.42E-02
	HIV-1 rev binding protein 2	4.4245	1.47599	1.52824	2.10E-02
40	H.sapiens FGF gene, exon 3 /FL=gb:NM_000800.1 gb:M13361.1	2.04849	-0.34703	-0.95745	3.33E-02
	ESTs	2.03304	-0.9164	-0.83676	4.19E-02
	ESTs	2.87393	0.428858	1.02011	9.72E-04
45	Homo sapiens clone 23700 mRNA sequence	4.60148	1.64243	1.72052	4.74E-02
	ESTs, Highly similar to S21424 nestin (H.sapiens)	3.08579	0.725853	1.40345	1.99E-02
	Homo sapiens actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACTG2), mRNA. /PROD=actin, gamma 2 propeptide /FL=gb:NM_001615.2	7.17155	4.15208	4.18551	4.72E-02
50	hypothetical protein FLJ22833	2.80785	0.480636	1.25154	2.43E-02
	Homo sapiens LIM homeobox protein 6 (LHX6), mRNA. /PROD=LIM homeobox protein 6 /FL=gb:AB031041.1 gb:NM_014368.1 gb:AL136570.1	2.52571	-0.06036	0.459727	4.37E-02
55	Homo sapiens, clone IMAGE:5271039, mRNA.	3.05576	0.189935	0.452681	4.05E-02
	Homo sapiens cAMP response element-binding protein CRE-BPa (H_GS165L15.1), mRNA. /PROD=cAMP response element-binding protein CRE-BPa /FL=gb:NM_004904.1 gb:L05911.1	2.90971	0.487264	1.21334	4.24E-02
60	G protein-coupled receptor 1 /FL=gb:NM_005279.1	1.15804	-1.24345	-0.49352	2.28E-03
65					

(continua)					
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1 (NETO1), transcript variant 3, mRNA. /PROD=neuropilin-and tolloid-like protein 1 isoform 3precursor /FL=gb:AF448838.1 gb:NM_138966.2	3.25525	0.20233	0.301354	2.83E-02
15	Homo sapiens mRNA for KIAA0559 protein, partial cds. /PROD=KIAA0559 protein	2.37088	-0.29358	0.199028	2.81 E-02
	Human 65-kilodalton phosphoprotein (p65) mRNA, complete cds. /PROD=phosphoprotein p65 /FL=gb:M22300.1 gb:NM_002298.2 gb:J02923.1	3.25522	0.620942	1.15317	2.88E-02
20	Human DNA sequence from clone RP11-31K16 on chromosome 9. Contains a snoRNA binding domain pseudogene, the ELAVL2 gene for	4.77522	2.18971	2.77459	4.04E-02
25	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2, ESTs, STSs, GSSs and a CpG island				
	hypothetical protein FLJ11006	1.75389	-0.66646	0.100591	7.78E-04
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566A1046 (from clone DKFZp566A1046)	3.97344	1.32598	1.8683	3.19E-02
30	ESTs	4.13356	1.60769	2.27415	1.85E-02
	H.sapiens gene from PAC 106H8.	3.05906	-0.08711	-0.13845	4.34E-02
	Human T-cell receptor rearranged beta-chain V-region (V-D-J) mRNA, complete cds. /FL=gb:M15564.1	3.43862	0.94127	1.64514	5.31E-03
35	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1.76352	0.908832	3.26124	2.19E-02
	Homo sapiens mRNA for KIAA1597 protein, partial cds. /PROD=KIAA1597 protein	6.20675	3.06104	3.12403	1.78E-02
40	HIV-1 rev binding protein 2	3.54001	0.617783	0.325316	3.52E-02
	Homo sapiens nidogen 2 (NID2), mRNA. /PROD=nidogen 2 /FL=gb:NM_007361.1 gb:D86425.1	3.39549	0.915898	1.65422	4.70E-03
45	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566A1046 (from clone DKFZp566A1046)	3.49826	0.859233	1.46022	3.01E-02
	Homo sapiens muscleblind (Drosophila)-like (MBNL), mRNA. /PROD=muscleblind (Drosophila)-like /FL=gb:NM_021038.1 gb:AB007888.1	3.53962	0.508166	0.298438	3.90E-02
50	hypothetical protein FLJ20163	5.26708	2.17148	2.01643	3.33E-02
	KIAA0455 gene product	3.25374	0.057742	-0.01612	2.66E-02
	hypothetical protein FLJ22833 /FL=gb:NM_022837.1	2.93229	0.533105	1.40606	3.19E-02
	ESTs	2.19313	-0.32822	0.427128	1.87E-02
55	Homo sapiens NADPH oxidase 4 (NOX4), mRNA. /PROD=NADPH oxidase 4 /FL=gb:AF261943.1 gb:NM_016931.1 gb:AF254621.1 gb:AB041035.1	5.57794	2.61602	2.28462	4.04E-02
	ESTs	3.3266	0.840887	1.69605	0.00E+00
60	ESTs	1.99635	-0.56359	0.236236	1.39E-02

65

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3ª en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens serumglucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA. /PROD=serumglucocorticoid regulated kinase /FL=gb:BC001263.1 gb:NM_005627.1 gb:AF153609.1	4.81433	2.46478	3.47797	2.02E-02
15	A kinase (PRKA) anchor protein 2 ESTs	6.03149 3.8522	3.65135 1.17894	4.63469 0.483367	1.17E-02 3.08E-02
20	Homo sapiens similar to rat tricarboxylate carrier-like protein (BA108L7.2), mRNA. /PROD=similar to rat tricarboxylate carrier-likeprotein /FL=gb:NM_030971.1	1.74077	-1.45032	-1.24979	5.69E-04
25	Homo sapiens, lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3), clone MGC:2058, mRNA, complete cds. /PROD=lectin, galactoside-binding, soluble, 3(galectin 3) IFL=gb:NM_002306.1 gb:M35368.1 gb:BC001120.1 gb:M36682.1 gb:M57710.1 gb:AB006780.1	4.53668	1.85893	2.59596	3.84E-03
30	ESTs	1.06738	-1.51321	-0.67814	7.68E-03
35	Homo sapiens heptacellular carcinoma novel gene-3 protein (LOC51339), mRNA. /PROD=heptacellular carcinoma novel gene-3 protein /FL=gb:NM_016651.2 gb:AF251079.2	5.55437	3.02649	3.91576	2.22E-02
40	Homo sapiens, Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1, clone MGC:4078, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 /FL=gb:NM_015927.1 gb:BC001830.1 gb:AF116343.1	4.82642	2.07249	2.74019	1.03E-02
45	ESTs, Highly similar to FXD3_HUMAN FORKHEAD BOX PROTEIN D3 (H.sapiens)	3.81523	1.18624	1.98102	4.17E-02
50	ESTs	4.52094	1.70664	2.3196	2.78E-02
55	Homo sapiens potassium intermediatesmall conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2 (KCNN2), mRNA. /PROD=potassium intermediatesmall conductancecalcium-activated channel, subfamily N, member 2 /FL=gb:NM_021614.1 gb:AF239613.1	3.68048	0.897369	1.5433	1.32E-02
60	Homo sapiens transporter similar to yeast MRS2 (MRS2L), mRNA. /PROD=transporter similar to yeast MRS2 /FL=gb:AF288288.1 gb:NM_020662.1	5.68324	3.35483	4.46553	3.00E-03
65	Homo sapiens a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2) (ADAMTS5), mRNA. /PROD=a disintegrin and metalloprotease withthrombospondin motifs-5 preproprotein /FL=gb:NM_007038.1 gb:AF14209	4.54713	2.07152	1.10726	5.91 E-03
	HIV-1 rev binding protein 2	3.85003	0.823769	0.407316	3.76E-02

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Human, parathyroid-like protein (associated with humoral hypercalcemia of malignancy) mRNA, complete cds. /FL=gb:J03580.1	1.73564	-1.5631	-1.41799	4.04E-02
	ESTs	5.27633	2.76577	3.71542	1.39E-02
	ESTs	1.7022	-1.29085	-0.81236	1.72E-02
15	pyruvate dehydrogenase phosphatase /FL=gb:NM_018444.1 gb:AF155661.1	6.62966	4.26189	5.37384	1.04E-03
	ESTs	3.90566	1.11378	1.80307	1.57E-02
20	Homo sapiens DRM (DRM) mRNA, complete cds. /PROD=DRM /FL=gb:NM_013372.1 gb:AF110137.2 gb:AF045800.1 gb:AF154054.1	6.16645	3.12369	3.57831	1.59E-02
	Homo sapiens cDNA: FLJ22769 fis, clone KAlA1316	2.36483	-0.5543	0.025213	1.45E-04
	ESTs	4.31647	1.44801	2.11226	2.19E-02
25	ESTs	1.24891	-1.42983	-0.57145	1.29E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586N012 (from clone DKFZp586N012)	2.85031	0.231102	1.16439	1.08E-02
30	jagged 1 (Alagille syndrome)	2.54951	0.151382	1.31733	4.46E-03
	ESTs, Weakly similar to I38588 reverse transcriptase homolog (H.sapiens)	1.16209	-1.26828	-0.1187	3.40E-02
	KIAA1339 protein	4.41803	2.09451	3.35786	3.90E-02
35	ESTs	3.83407	0.892884	1.56759	8.98E-03
	DKFZP434D156 protein	4.42983	2.05154	3.28988	1.60E-02
	Homo sapiens mRNA expressed only in placental villi, clone SMAP41.	3.84408	0.705031	1.20856	2.25E-02
40	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	2.7724	0.235409	1.34452	1.96E-02
	KIAA0164 gene product /FL=gb:NM_014739.1 gb:D79986.1	4.99867	2.5327	3.72535	2.85E-02
45	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761 M0111 (from clone DKFZp761M0111)	5.14752	2.61217	3.76652	3.78E-02
	Homo sapiens NPD009 mRNA, complete cds. /PROD=NPD009 /FL=gb:NM_020686.1	2.15383	-0.27664	0.990295	2.09E-03
50	gb:AF237813.1				
	muscleblind (Drosophila)-like /FL=gb:NM_021038.1 gb:AB007888.1	3.23823	0.467215	1.39628	7.60E-03
	ESTs	4.49318	1.35004	1.91395	3.79E-02
55	muscleblind (Drosophila)-like /FL=gb:NM_021038.1 gb:AB007888.1	1.84877	-0.57315	0.732468	8.06E-03
	ESTs	6.068	3.42334	4.51189	1.89E-02
	ESTs, Weakly similar to unnamed protein product (H.sapiens)	3.24528	0.740266	1.98306	3.89E-04
60	Human complement cytolysis inhibitor (CLI) mRNA, complete cds. /FL=gb:J02908.1 gb:NM_001831.1 gb:M64722.1 gb:M25915.1	6.50766	4.03647	5.33533	1.77E-02
65	ESTs	5.36759	2.42249	3.24765	3.23E-03

(continua)					
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini Hochberg y
5					
10	ESTs	0.957239	-1.43055	-0.04796	5.55E-04
	transporter similar to yeast MRS2	3.77395	1.18311	2.36844	1.83E-02
	Homo sapiens, Similar to regulator for ribosome resistance homolog (S. cerevisiae), clone MGC:2755, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to regulator for ribosome	5.09957	2.72179	4.14116	2.72E-02
15	resistance homolog (S. cerevisiae) /FL=gb:BC001811.1				
20	SWISNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 /FL=gb:NM_003070.1 gb:D26155.1	2.54229	-0.29226	0.695255	1.89E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586L2424 (from clone DKFZp586L2424)	3.34446	0.795373	2.07147	1.03E-02
25	ESTs	4.63117	2.08252	3.36946	2.25E-03
	Homo sapiens bicarbonate transporter-related protein BTR1 mRNA, complete cds. /PROD=bicarbonate transporter-related protein BTR1 /FL=gb:AF336127.1	3.17407	0.745852	2.17046	1.71E-03
30	ESTs	1.08377	-1.27197	0.228305	4.76E-02
	ESTs	2.94657	0.127188	1.20032	1.43E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434B2016 (from clone DKFZp434B2016).	2.47798	-0.26439	0.894731	4.51E-03
35	ESTs	2.39983	-1.04089	-0.57976	3.37E-02
	Homo sapiens synaptotagmin interacting protein STIP1 mRNA, partial cds. /PROD=synaptotagmin interacting protein STIP1	2.11009	-0.57109	0.653181	1.78E-02
40	Homo sapiens connexin 26 (GJB2) mRNA, complete cds. /PROD=connexin 26 /FL=gb:NM_004004.1 gb:M86849.2	2.86049	-0.57377	-0.09328	4.27E-04
	Homo sapiens brain-derived neurotrophic factor (BDNF), mRNA. /PROD=brain-derived neurotrophic factor /FL=gb:NM_001709.1	1.71599	-0.79412	0.616733	3.09E-02
45	ESTs, Weakly similar to unknown (H.sapiens)	2.33677	-0.04066	1.5217	1.87E-03
	ESTs	2.57265	0.177794	1.74876	2.74E-04
	ESTs	2.6809	0.209095	1.70624	1.21E-02
50	Homo sapiens DKC1 gene, exons 1 to 11	4.18307	1.70283	3.20863	2.00E-02
	Homo sapiens T cell receptor beta chain (TCRBV13S1-TCRBJ2S1) mRNA, complete cds. /PROD=T cell receptor beta chain	4.45228	1.38318	2.30031	3.27E-03
55	/FL=gb:AF043179.1				
	Homo sapiens PRO0066 mRNA, complete cds. /PROD=PRO0066 /FL=gb:AF113007.1	0.466715	-1.87679	-0.22665	4.25E-03
	axonal transport of synaptic vesicles	5.20385	2.74124	4.27648	3.33E-03
60	Homo sapiens, Similar to cyclin M2, clone MGC:12933 IMAGE:4308662, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to cyclin M2 /FL=gb:BC021222.1	0.139313	-2.31405	-0.76333	1.46E-02
	Homo sapiens clone CDABP0095 mRNA sequence	3.87201	2.7936	5.73958	9.63E-03
65					

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	H.sapiens mRNA for ribosomal protein L18a homologue. /PROD=ribosomal protein L18a homologue	2.00401	0.354674	2.73013	4.70E-04
15	ESTs, Weakly similar to ALU7_HUMAN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	3.43639	0.843826	2.28468	3.37E-02
20	Homo sapiens, clone IMAGE:5242616, mRNA. Homo sapiens C1orf24 mRNA, complete cds. /PROD=C1orf24/FL=gb:AF288391.1 gb:AB050477.1 gb:NM_022083.1	-0.525567 5.17968	-2.07832 2.58724	0.406964 4.04213	2.23E-02 1.98E-04
25	Homo sapiens clone IMAGE:451939, mRNA sequence Homo sapiens cDNA FLJ14942 fis, clone PLACE1011185, highly similar to INSERTION ELEMENT IS1 PROTEIN INSB.	5.15776 0.682724	2.22786 -2.08716	3.40438 -0.74074	2.60E-02 1.45E-02
30	hypothetical protein FLJ20425 /FL=gb:NM_017816.1 gb:AL136750.1 Homo sapiens matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA. /PROD=matrix metalloproteinase 10 preproprotein /FL=gb:BC002591.1 gb:NM_002425.1	4.23689 2.28308	1.90847 -0.65903	3.69988 0.521586	1.15E-02 8.87E-03
35	ESTs Homo sapiens prominin (mouse)-like 1 (PROML1), mRNA. /PROD=prominin (mouse)-like 1 /FL=gb:NM_006017.1 gb:AF027208.1	3.67167 5.46002	2.20619 2.79737	4.86553 4.29571	3.16E-03 1.38E-03
40	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434M2415 (from clone DKFZp434M2415). Homo sapiens hypothetical protein FLJ20701 (FLJ20701), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ20701 /FL=gb:NM_017933.1	2.40278 2.1471	-0.68409 0.312211	0.399469 2.65409	1.48E-02 2.28E-04
45	Homo sapiens cDNA FLJ35259 fis, clone PROST2004251. Homo sapiens hypothetical protein FLJ39553 (FLJ39553), mRNA. /FL=gb:NM_173549.1	6.79033 4.0369	3.86627 1.34318	5.12737 2.84336	1.23E-03 7.69E-03
50	Human microfibril-associated glycoprotein-2 MAGP-2 mRNA, complete cds. /PROD=microfibril-associated glycoprotein-2 MAGP-2 /FL=gb:NM_003480.1 gb:U37283.1	3.89326	0.527618	1.35764	1.81E-03
55	Homo sapiens proprotein convertase subtilisinkexin type 5 (PCSK5), mRNA. /PROD=proprotein convertase subtilisinkexin type 5 /FL=gb:U56387.2 gb:NM_006200.1	3.76897	0.368734	1.17396	1.38E-02
60	Cluster Incl. A1735391:at10e09.x1 Homo sapiens cDNA, 3 end /clone=IMAGE-2354728 /clone_end=3 /gb=A1735391 /gi=5056915 /ug=Hs.20137 /len=567 ESTs	2.59941 2.30031	0.203564 -1.01596	2.03637 -0.08964	1.12E-04 1.46E-02
65	Kruppel-like factor 4 (gut)	3.50041	1.09954	2.95915	1.22E-02

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens full length insert cDNA YI25A03 ESTs	-1.40946 0.806666	-3.04877 -2.01081	-0.39378 -0.53076	3.32E-02 1.91E-02
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G02121 (from clone DKFZp761G02121); partial cds	3.1892	0.012768	1.13562	1.35E-03
15	Homo sapiens TMEFF2 mRNA, complete cds. /FL=gb:AB017269.1 gb:NM_016192.2 gb:AF179274.2 gb:AF242222.1	2.28638	-0.89508	0.225546	1.21E-03
	Homo sapiens, clone MGC:3328, mRNA, complete cds. /PROD=Unknown (protein for MGC:3328)	3.54625	0.772486	2.30168	4.16E-02
20	/FL=gb:BC001745.1 gb:NM_014392.1 ESTs	2.18149	-0.58303	0.984522	2.68E-02
	synaptojanin 2	4.166	1.83143	3.84199	0.00E+00
	KIAA0367 protein	1.5999	-1.50555	-0.26286	1.58E-02
25	ESTs, Moderately similar to ALU8_HUMAN ALU SUBFAMILY SX SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	0.868185	-1.46804	0.573078	1.69E-02
	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	1.60872	-1.12544	0.518361	2.11E-02
30	Human complement cytolysis inhibitor (CLI) mRNA, complete cds. /FL=gb:J02908.1 gb:NM_001831.1 gb:M64722.1 gb:M25915.1	6.61592	3.91665	5.596	1.66E-02
	forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	5.04975	2.59802	4.53545	1.60E-03
35	/FL=gb:NM_002015.2 gb:AF032885.1 gb:U02310.1 Homo sapiens cDNA: FLJ22727 fis, clone HSI15054	4.88391	2.09093	3.68875	1.91E-02
	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	3.27371	0.243335	1.61199	2.74E-04
	/FL=gb:D31784.1 gb:NM_004932.1				
40	ESTs	3.97749	0.786845	1.99803	1.73E-02
	endonuclease G-like 1 /FL=gb:AB020523.1 gb:NM_005107.1	1.11519	-2.09018	-0.88324	1.69E-02
	Homo sapiens cDNA FLJ13034 fis, clone NT2RP3001232	4.59641	0.64328	1.1121	1.66E-02
45	Human DNA sequence from clone RP4-61404 on chromosome 20q11.1-12 Contains the 3 part of the MMP24 (matrix metalloproteinase 24 (membrane- inserted)) gene, the	2.91607	0.209555	1.92644	1.93E-02
50	ITGB4BP (integrin beta 4 binding protein) gene, the 3 end of a novel gene, the 3 end o...				
	Homo sapiens, collapsin response mediator protein- 5; CRMP3-associated molecule, clone MGC:11247, mRNA, complete cds. /PROD=collapsin response mediator protein-5;CRMP3-associated molecule /FL=gb:BC002874.1	0.672753	-1.75265 0	0.250803	8.65E-03
55	ESTs, Moderately similar to ALU7_HUMAN ALU SUBFAMILY SQ SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	2.91576	0.289656	2.10334	2.57E-03
60	ESTs, Moderately similar to CA1C RAT COLLAGEN ALPHA 1(XII) CHAIN (R.norvegicus)	6.2681	1.94518	1.82747	4.12E-02
65					

(continua)

5	Título de Gen	Tratamiento		Tratamiento		Tratamiento		P-Valor Benjamini y Hochberg
		DE	en	DE	en	DE	en	
		+ AA	bajo	+ AA	+Wnt- 3 ^a en	+ AA	bajo	
		MATRIGEL		MATRIGEL		MEFS		
10	Homo sapiens alpha-aminoadipate semialdehyde synthase mRNA, complete cds. /PROD=alpha-aminoadipate semialdehyde synthase /FL=gb:AF229180.1	5.2604		2.72549		4.6685		4.33E-03
15	Homo sapiens Wnt inhibitory factor-1 (WIF-1), mRNA. /PROD=Wnt inhibitory factor-1 /FL=gb:AF122922.1 gb:NM_007191.1	1.03265		-1.51207 0		0.433159		8.62E-05
	ribosomal protein S11	4.95358		2.25158		4.04683		2.98E-04
20	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), mRNA. /PROD=tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 /FL=gb:NM_007115.1	2.42729		-0.73843		0.613222		1.93E-02
	Homo sapiens hairyenhancer-of-split related with YRPW motif 2 (HEY2), mRNA. /PROD=hairyenhancer-of-split related with YRPW motif2 /FL=gb:NM_012259.1 gb:AF311884.1 gb:AB044755.1 gb:AF232238.1 gb:AF237949.1 gb:AF173901.1	2.3848		-0.44154		1.27956		3.16E-03
30	Homo sapiens semenogelin I (SEMG1), mRNA. /PROD=semenogelin I /FL=gb:J04440.1 gb:NM_003007.1	0.585816		-2.46893		-0.95223		3.05E-02
	Homo sapiens, Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney), clone MGC:1470, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetalkidney) /FL=gb:BC000019.1	2.38648		-0.02212		2.14359		2.59E-03
35	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434H0350 (from clone DKFZp434H0350); partial cds. /PROD=hypothetical protein	2.16899		-0.56794		1.27546		3.16E-03
40	Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 14 (GRB14), mRNA. /PROD=growth factor receptor-bound protein 14 /FL=gb:L76687.1 gb:NM_004490.1	4.2346		1.17569		2.73613		4.80E-03
45	Homo sapiens, Similar to TAF5-like RNA polymerase II, p300CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa, clone MGC:46101 IMAGE:5551246, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to TAF5-like RNA polymerase II, p300CBP-associated factor (PCAF)-associat	2.10954		-0.1313		2.24853		8.24E-04
50	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761J1324 (from clone DKFZp761J1324)	1.42404		-1.99222		-0.77126		3.21E-02
55	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 antizyme inhibitor	2.82535		0.288493		2.38889		0.00E+00
		3.65887		0.37346		1.74912		1.86E-02
	Homo sapiens GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha) (GRO1), mRNA. /PROD=GRO1 oncogene (melanoma growth stimulatingactivity, alpha) /FL=gb:NM_001511.1	2.51473		0.107263		2.38874		7.16E-04
60	Homo sapiens proprotein convertase subtilisinkexin type 5 (PCSK5), mRNA.	4.90999		0.871309		1.52441		1.71E-02

65

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	/PROD=proprotein convertase subtilisinkexin type 5 /FL=gb:U56387.2 gb:NM_006200.1 ESTs	0.254736	-1.96122	0.51777	4.00E-02
	G-protein gamma-12 subunit /FL=gb:NM_018841.1 gb:AF119663.1	3.93653	1.06178	2.88889	5.11E-04
15	platelet-derived growth factor alpha polypeptide clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	3.50343	0.651246	2.50207	3.99E-03
		2.88196	-0.42677	0.9712	8.48E-03
20	ESTs	2.82081	-1.69816	-1.89985	4.10E-02
	Homo sapiens insulinoma-associated 1 (INSM1), mRNA. /PROD=insulinoma-associated 1 /FL=gb:NM_002196.1 gb:M93119.1	2.94347	0.120494	2.02248	1.43E-03
25	LBP protein 32 /FL=gb:NM_014552.1 gb:AF198489.1 ESTs, Highly similar to T42654 hypothetical protein DKFZp434G1115.1 (H.sapiens)	2.68546	-0.16678	1.70626	1.87E-03
		2.84504	0.515703	2.95379	7.92E-04
	Homo sapiens Friend leukemia virus integration 1 (FLI1), mRNA. /PROD=Friend leukemia virus integration 1 /FL=gb:BC001670.1 gb:NM_002017.2 gb:M98833.3	1.7744	-2.28064	-1.56765	3.14E-02
30	ESTs	0.846429	-2.42046	-0.91891	1.57E-02
35	Homo sapiens oxidative 3 alpha hydroxysteroid dehydrogenase; retinol dehydrogenase; 3- hydroxysteroid epimerase (RODH), mRNA. /PROD=oxidative 3 alpha hydroxysteroid dehydrogenase;retinol dehydrogenase; 3- hydroxysteroid epimerase /FL=gb:AF016509.1 gb:A	1.30153	-1.64227	0.196394	3.20E-03
40	minor histocompatibility antigen HA-1 UDP-glucose pyrophosphorylase 2	1.89498	-0.37136	2.15157	4.61E-02
		4.26327	0.968939	2.4776	6.20E-03
	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 2, 24kD (RGS2), mRNA. /PROD=regulator of G-protein signalling 2, 24kD /FL=gb:L13463.1 gb:NM_002923.1	5.42952	3.05504	5.49711	1.21E-03
45	ESTs	4.49987	1.01623	2.35659	1.86E-03
50	ESTs	0.623422	-1.94907	0.317138	8.95E-04
	ESTs	0.326084	-1.69499	1.13586	1.10E-02
	ESTs	3.82952	0.673296	2.37112	3.92E-02
	Homo sapiens cDNA FLJ10160 fis, clone HEMBA1003545, highly similar to INSULIN GENE ENHANCER PROTEIN ISL-2.	2.80876	-0.24405	1.56853	1.39E-02
55	thyroid hormone receptor-associated protein, 150kDa subunit /FL=gb:NM_005119.1 gb:AF117756.1 ESTs	4.66717	2.01883	4.2391	4.63E-03
60	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667D095 (from clone DKFZp667D095)	2.4548	-0.3811	1.65212	4.08E-03
		3.13835	0.605922	2.95511	1.53E-03
65					

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3ª en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens synaptotagmin 2 mRNA, complete cds. /PROD=synaptotagmin 2 /FL=gb:AF318616.1	2.94452	0.23595	2.4148	3.63E-04
15	Homo sapiens procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE), mRNA. /PROD=procollagen C-endopeptidase enhancer /FL=gb:BC000574.1 gb:NM_002593.2 gb:AB008549.1 gb:L33799.1	3.37999	0.343624	2.21149	1.46E-02
	ESTs	3.24495	0.925809	3.52818	1.70E-04
	Homo sapiens mRNA for KIAA0930 protein, partial cds. /PROD=KIAA0930 protein	3.65772	0.911608	3.09513	8.62E-05
20	Homo sapiens forkhead transcription factor FOXL2 (BPES), mRNA. /PROD=forkhead transcription factor FOXL2 /FL=gb:AF301906.1 gb:NM_023067.1	1.51993	-2.14186	-0.86243	3.75E-02
	ESTs	1.9867	-1.5948	-0.2171	2.81 E-03
25	ESTs, Highly similar to AF174600 1 F-box protein Fbx20 (H.sapiens)	3.06175	0.202953	2.35691	2.45E-02
	Homo sapiens ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) (ANK3), transcript variant 2, mRNA. /PROD=ankyrin 3, isoform 2 /FL=gb:NM_001149.1 gb:U43965.1	3.11644	0.101116	2.09865	2.90E-03
30	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (TNFRSF6), mRNA. /PROD=apoptosis (APO-1) antigen 1 /FL=gb:NM_000043.1 gb:M67454.1	2.39086	-1.04254	0.558779	1.62E-02
35	Homo sapiens thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme (TRHDE), mRNA. /PROD=thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme /FL=gb:AF126372.1 gb:NM_013381.1	1.30849	-1.50688	0.822517	4.91 E-02
40	ESTs	4.65711	0.915563	2.32327	6.29E-03
	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564N1116 (from clone DKFZp564N1116)	2.36072	-2.02594	-1.25286	1.50E-02
45	Homo sapiens placental protein 13-like protein (LOC56891), mRNA. /PROD=placental protein 13-like protein /FL=gb:NM_020129.1 gb:AF267852.1	3.55894	0.434263	2.47085	3.48E-03
50	Homo sapiens, Similar to receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, clone MGC: 12687, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 /FL=gb:BC006374.1	2.05578	0.178992	3.5007	4.46E-04
	ESTs	0.159066	-2.96514	-0.84976	3.25E-02
55	Homo sapiens, Similar to v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, clone MGC:29755 IMAGE:3946751, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 /FL=gb:BC017314.1	2.22285	-1.58562	-0.1074	2.63E-02
60	ESTs, Highly similar to dedicator of cytokinesis 1 (H.sapiens)	0.83871	-2.29829	-0.12951	1.85E-02
	ESTs	1.1465	-1.7403	0.682768	3.99E-02
65	ESTs	1.7466	-1.67509	0.283174	2.97E-03

(continua)

	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	ESTs, Weakly similar to PMXB_HUMAN PAIRED MESODERM HOMEBOX PROTEIN 2B (H.sapiens) ESTs	1.03192 3.22222	-2.44485 -0.29339	-0.51457 1.59904	1.87E-03 7.36E-03
15	Homo sapiens cDNA FLJ10561 fis, clone NT2RP2002672	2.295	-1.60823	-0.08369	3.93E-03
20	Homo sapiens, Similar to KIAA0441 gene product, clone MGC:45124 IMAGE:5578893, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to KIAA0441 gene product /FL=gb:BC036731.1	1.38545	-1.60426	0.86909	2.33E-03
25	Homo sapiens, clone IMAGE:4067166, mRNA ESTs	0.195869 1.5857	-2.50507 -2.61787	0.276993 -1.30022	1.16E-03 1.12E-02
30	Homo sapiens methyl-CpG binding protein MBD2 (MBD2) mRNA, complete cds. /PROD=methyl-CpG binding protein MBD2 /FL=gb:NM_003927.2 gb:AF072242.1	0.490598	-3.45465	-1.70163	3.90E-03
35	KIAA1151 protein H.sapiens mRNA for B-HLH DNA binding protein. /PROD=B-HLH DNA binding protein /FL=gb:NM_000474.1	0.642527 5.43034	-2.04288 1.56039	1.00885 3.45122	4.09E-03 1.12E-04
40	Homo sapiens, Similar to hypothetical protein FLJ32001, clone MGC:39559 IMAGE:4828136, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to hypothetical protein FLJ32001 /FL=gb:BC036200.1	0.520711	-1.99011	1.26899	2.63E-02
45	Homo sapiens Wilms tum or 1 (WT1), transcript variant D, mRNA. /PROD=Wilms tumor 1 isoform D /FL=gb:NM_024424.1 gb:NM_024426.1	2.40462	-2.96375	-2.43546	1.41E-02
50	ESTs Homo sapiens, Similar to cadherin 6, type 2, K- cadherin (fetal kidney), clone MGC:1470, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetalkidney) /FL=gb:BC000019.1	1.53104 2.54746	-1.54553 -0.69811	1.37309 2.13419	8.14E-03 1.45E-04
55	ESTs paternally expressed 3	0.133612 2.87581	-3.77953 -1.67669	-1.56636 -0.0118	1.40E-02 2.17E-02
60	Homo sapiens Charot-Leyden crystal protein (CLC), mRNA. /PROD=Charot-Leyden crystal protein /FL=gb:NM_001828.3 gb:L01664.1	3.30086	-0.41644	2.1096	2.08E-02
65	ESTs Homo sapiens tachykinin, precursor 1 (substance K, substance P, neurokinin 1, neurokinin 2, neuromedin L, neurokinin alpha, neuropeptide K, neuropeptide gamma) (TAC1), transcript variant beta, mRNA. /PROD=tachykinin 2 precursor, isoform beta /FL=gb:U3	3.26198 2.77265	-0.72777 -1.02081	1.5682 1.48319	3.16E-03 4.07E-04
	Homo sapiens PNAS-123 mRNA, complete cds	1.59659	-1.46656	1.84663	3.90E-03

		(continua)			
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt-3 ^a en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20075 (FLJ20075), mRNA. /PROD=hypothetical protein FLJ20075 /FL=gb:NM_017655.1	-0.359245	-3.46654	-0.06528	2.55E-03
	Human platelet-derived growth factor alpha-receptor (PDGFRA) mRNA, exons 13-16	2.44464	-0.5846	2.90484	3.63E-04
15	Homo sapiens cDNA: FLJ22547 fis, clone HSI00356	4.29365	-0.10882	2.09548	1.54E-02
	Homo sapiens HSPC156 protein (HSPC156), mRNA. /PROD=HSPC156 protein /FL=gb:NM_014178.1 gb:AF161505.1	0.786188	-2.32161	1.29619	8.62E-05
20	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586P1124 (from clone DKFZp586P1124)	0.485642	-4.8524	-3.09356	2.02E-02
	caldesmon 1 /FL=gb:M64110.1 gb:NM_004342.2	7.09236	2.67863	5.63436	7.47E-03
25	Homo sapiens, Similar to hypothetical protein FLJ10058, clone MGC:34305 IMAGE:5167647, mRNA, complete cds. /PROD=Similar to hypothetical protein FLJ10058 /FL=gb:BC034293.1	1.69808	-2.74939	0.215566	1.92E-02
	Homo sapiens, Similar to LIM homeobox protein 8, clone IMAGE:4839343, mRNA.	-0.062884	-4.30121	-1.10961	1.16E-02
30	Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 4, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone 2, isoform4 /FL=gb:NM_022646.1	0.812166	-2.21846	2.21843	3.60E-03
35	Homo sapiens HES-related repressor protein 1 HERP1 mRNA, complete cds. /PROD=HES-related repressor protein 1 HERP1 /FL=gb:NM_012259.1 gb:AF311884.1 gb:AB044755.1 gb:AF232238.1 gb:AF237949.1 gb:AF173901.1	2.80599	-1.19396	2.40562	2.44E-03
40	Homo sapiens cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) (CDH6), mRNA. /PROD=cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) /FL=gb:D31784.1 gb:NM_004932.1	0.824752	-3.83509	-0.87634	2.49E-02
45	paternally expressed 3	2.87398	-4.12925	-3.49232	2.19E-02
	Homo sapiens CDNA FLJ11398 fis, clone HEMBA1000637.	2.5268	-1.71619	1.84868	4.46E-04
50	Homo sapiens BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing) (BIK), mRNA. /PROD=BCL2-interacting killer /FL=gb:NM_001197.2 gb:BC001599.1 gb:U34584.1 gb:U49730.1	4.30042	0.023414	3.56237	1.94E-03
55	Homo sapiens testis expressed sequence 14 (TEX14), mRNA. /PROD=testis expressed sequence 14 /FL=gb:NM_031272.1	3.51154	-2.84891	-1.3824	2.18E-02
	Homo sapiens growth hormone 2 (GH2), transcript variant 2, mRNA. /PROD=growth hormone 2, isoform 2 precursor /FL=gb:J03756.1 gb:NM_022557.1	0.922569	-2.77587	1.4679	1.60E-03
60	Homo sapiens, clone IMAGE:4828836, mRNA.	0.972907	-4.24111	-1.48398	1.63E-02
65					

(continua)					
	Título de Gen	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA +Wnt- 3ª en MATRIGEL	Tratamiento DE en serum bajo + AA en MEFS	P-Valor Benjamini y Hochberg
5					
10	Homo sapiens galanin receptor 1 (GALR1), mRNA. /PROD=galanin receptor 1 /FL=gb:NM_001480.2 gb:U23854.1 gb:L34339.1 gb:U53511.1	2.50745	-3.13141	-0.33802	3.38E-03
15	Homo sapiens, serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3, clone MGC:12244, mRNA, complete cds. /PROD=serine (or cysteine) proteinase inhibitor, cladeB (ovalbumin), member 3 /FL=gb:NM_006919.1 gb:U19556.1 gb:BC005224.1	1.96851	-4.13943	-1.56568	3.06E-02
20	DKFZP566K1924 protein	2.88225	-2.59632	1.39062	0.00E+00
	ESTs, Moderately similar to ALU2_HUMAN ALU SUBFAMILY SB SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY (H.sapiens)	4.24074	-0.69782	3.87444	1.12E-04
25	Human mRNA upregulated during camptothecin- induced apoptosis of U937 cells.	0.494505	-4.62912	-0.18915	4.38E-02
	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 ESTs	1.77902 -1.3795	-4.02806 -6.08172	-0.19682 -0.94606	4.34E-02 6.91E-04
30	Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 2 (CSH2), transcript variant 1, mRNA. /PROD=chorionic somatomammotropin hormone 2, isoform 1 precursor /FL=gb:NM_020991.2 gb:BC002717.1	1.12437	-3.12138	2.61605	1.12E-04
35	Homo sapiens mRNA for SCCA2b, complete cds. /PROD=SCCA2b /FL=gb:AB046400.1	3.32911	-3.16288	0.568045	1.93E-02
	Homo sapiens KIAA0469 gene product (KIAA0469), mRNA. /PROD=KIAA0469 gene product /FL=gb:AB007938.1 gb:NM_014851.1	4.03097	-1.94826	2.56518	2.49E-04
40	ESTs	4.45389	-2.40636	5.33359	5.65E-04

TABLA VII: EL EFECTO DEL TRATAMIENTO WNT-3A EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINA EN POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE DEL SISTEMA EMBRIONARIO LINEA H9.

		Lisado celular				Medios acondicionados de células			
		w/o wnt 1	w/o wnt 2	w/ wnt 1	w/ wnt 2	w/o wnt 1	w/o wnt 2	w/ wnt 1	w/ wnt 2
5	POS	62,842.33	67,606.06	49,758.34	50,702.57	96,585.15	109,721.82	199,709.04	195,889.94
	NEG	23.38	34.49	370.82	400.66	58.06	34.45	216.90	105.20
	Angiogenin	38.50	132.91	619.40	750.85	13,726.35	11,749.55	57,442.48	54,969.04
	BDNF	167.50	167.82	763.51	951.45	689.22	563.39	770.08	715.86
	BLC	2.00	48.99	742.24	476.36	107.69	512.77	337.12	249.80
10	BMP-4	247.00	273.70	348.44	304.48	583.40	541.83	1,158.54	771.19
	BMP-6	8.50	141.92	571.23	641.05	354.91	355.28	985.70	670.60
	CK beta 8-1	1.00	1.13	22.48	21.54	17.79	25.31	42.78	75.44
	CNTF	1.00	55.19	1,382.51	1,060.82	282.81	211.86	787.19	541.51
	EGF	32.50	82.22	742.24	984.39	1,681.85	1,406.12	23,331.57	22,768.53
	Eotaxin	1.00	7.32	301.87	253.80	207.89	199.67	622.91	291.71
15	Eotaxin-2	262.00	336.77	1,155.31	960.31	890.56	744.31	2,156.21	1,445.14
	Eotaxin-3	184.50	284.96	934.12	847.56	975.77	665.56	2,140.81	1,480.35
	FGF-6	629.00	379.57	1,327.92	964.54	1,239.85	947.73	3,283.94	2,519.78
	FGF-7	31.00	222.45	1,075.02	941.73	449.49	352.47	1,086.66	861.72
	Flt-3 Ligand	44.00	180.21	857.45	795.19	315.58	277.47	511.67	792.98
20	Fractalkine	23.50	62.51	792.02	456.51	120.80	145.30	359.37	367.15
	GCP-2	1.00	45.05	593.71	538.86	203.21	166.86	451.78	362.12
	GDNF	84.00	292.84	436.75	444.68	176.99	194.98	443.22	509.66
	GM-CSF	433.00	636.37	1,343.17	1,161.75	777.25	722.75	1,808.82	1,446.82
	I-309	152.50	246.10	708.52	743.25	1,828.87	179.05	318.30	288.36
	IFN-gamma	349.00	441.52	1,202.67	1,037.60	283.74	559.64	1,238.97	1,435.08
25	IGFBP-1	1.50	3.38	59.41	85.73	33.71	24.37	227.60	155.91
	IGFBP-2	3,785.50	5,554.45	2,671.90	2,414.72	27,656.85	28,473.95	42,215.53	43,934.33
	IGFBP-4	5,553.00	6,043.27	4,459.85	4,173.19	10,091.09	6,029.45	18,988.34	13,380.14
	IGF-I	1.00	2.25	558.38	208.19	88.96	148.11	254.98	187.77
	IL-10	158.00	422.93	1,222.75	1,096.30	722.93	564.32	1,625.71	1,129.96
30	IL-13	428.50	555.84	1,486.89	1,407.96	1,114.36	786.49	2,522.42	1,807.27
	IL-15	599.50	808.13	1,677.16	1,601.79	1,140.59	858.67	2,495.04	1,981.62
	IL-16	2.00	137.97	651.11	668.50	259.39	214.67	436.38	405.71
	IL-1alpha	1,236.00	1,216.99	1,612.93	1,421.89	10,155.70	5,842.90	3,999.26	3,545.79
	IL-1beta	1.00	1.13	352.05	312.08	117.99	75.93	316.59	278.30
	IL-1ra	33.00	25.91	302.68	198.48	142.34	93.74	354.23	581.75
35	IL-2	210.50	681.99	966.23	1,133.88	188.22	363.72	758.10	881.84
	IL-3	3,146.50	1,976.13	2,119.94	1,497.48	4,598.86	5,260.77	11,345.78	12,174.73
	IL-4	17.50	74.34	625.42	638.94	357.72	239.04	804.30	673.95
	IL-5	400.50	555.84	1,245.23	1,167.24	1,056.31	791.18	2,120.27	1,713.38
	IL-6	828.50	516.98	1,121.19	842.07	7,377.28	9,527.88	9,774.82	9,991.93
	IL-7	190.00	313.12	1,212.31	531.68	456.98	430.27	681.09	1,017.63
40	Leptin	900.50	617.79	1,234.39	1,091.65	2,999.42	2,016.38	7,238.71	4,886.99
	LIGHT	10.50	232.02	1,081.04	888.10	619.92	453.71	1,346.78	1,108.17
	MCP-1	242.50	282.71	1,022.03	1,076.03	572.17	500.58	2,015.89	1,567.53
	MCP-2	24.00	109.25	909.63	1,152.46	129.23	351.53	694.78	694.07
	MCP-3	1.00	168.38	1,184.61	1,255.50	401.73	169.67	701.62	583.42
45	MCP-4	7.50	46.74	1,380.51	1,606.86	123.61	61.87	231.02	276.62
	M-CSF	1.00	63.64	852.63	867.83	529.09	269.04	740.98	684.01
	MDC	1.00	2.25	269.36	280.41	157.32	52.50	280.65	132.44
	MIG	291.00	226.39	1,113.16	1,137.26	272.50	486.52	617.77	1,222.17
	MIP-1-delta	1.50	1.13	491.75	322.22	144.21	66.56	474.02	291.71
	MIP-3-alpha	1.00	5.63	1,602.09	1,399.93	55.25	0.00	208.78	184.41
50	NAP-2	1.00	6.19	465.66	177.37	97.39	110.61	371.35	343.68
	NT-3	1.00	1.13	316.73	275.76	97.39	171.55	571.57	427.51
	PARC	1.00	2.25	352.85	353.04	170.43	81.56	474.02	363.80
	PDGF-BB	437.00	1,644.99	517.84	597.56	4,729.96	8,521.09	2,635.37	2,005.09
	RANTES	1.00	89.54	724.98	637.25	393.31	347.78	682.80	855.01
	SCF	74.50	148.67	1,152.50	1,021.13	691.09	487.46	1,394.69	2,155.98
55	SDF-1	23.50	51.25	940.14	1,294.78	382.07	123.74	326.85	616.95
	TARC	1.50	5.07	372.93	343.33	206.95	71.24	277.23	1,642.97
	TGF-beta 1	362.00	230.33	1,426.67	1,240.30	752.90	740.56	1,827.65	1,849.18
	TGF-beta 3	3.00	25.91	377.74	1,130.93	111.44	115.30	294.34	343.68
	TNF-alpha	431.00	579.49	2,851.74	1,285.91	1,205.20	929.91	2,609.70	2,167.71
	TNF-beta	241.00	342.40	1,049.33	1,026.62	675.17	671.19	1,701.01	1,637.94
60	ternal Control	18,642.67	18,642.67	18,642.67	18,642.67	18,642.67	18,642.67	18,642.67	18,642.67
	POS	60,794.83	48,106.85	35,652.42	47,391.58	94,013.71	90,889.16	141,321.30	149,125.43
	NEG	11.13	5.53	11.22	30.45	24.93	17.75	36.22	33.27
65	Acrp30	1,036.00	744.50	601.61	690.66	1,797.52	1,319.88	2,795.71	2,302.99
	AgRP	11.00	153.99	77.82	89.00	378.17	195.90	651.26	482.21
	ngliopoietin-2	28.50	10.43	357.97	771.04	655.82	632.60	65,959.24	71,664.21
	mphiregulin	17.50	15.44	73.63	154.62	250.52	151.01	619.07	782.60
	Axl	637.50	795.83	88.59	139.03	401.31	324.05	610.40	748.34
	bFGF	59,820.50	54,057.29	11,722.95	21,398.52	7,948.03	4,993.83	1,226.99	1,241.09

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, que incluye los siguientes pasos:
 - a. cultivo de las células madre pluripotentes,
 - b. diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, cultivando las células madre pluripotentes en un medio definido químicamente que comprende un medio complementado con B27 y que trata las células pluripotentes con activina A,
 - c. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con por lo menos un factor del crecimiento fibroblástico, o con ácido retinoico y por lo menos un factor de crecimiento fibroblástico y
 - d. diferenciación de las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático a células que expresan marcadores característicos del linaje endocrino pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático con un inhibidor de la secretasa gamma.
2. El método de la reivindicación 1, cuando las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido químicamente que comprende DMEM-F12 complementado con B27 y activina A.
3. El método de la reivindicación 1, cuando el paso (b) también incluye el prensado de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde B27 se usa a una concentración de aproximadamente 1 %.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde B27 se usa a una concentración de aproximadamente 1 %.
6. El método de la reivindicación 1, donde el paso de la diferenciación de las células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue por un método que comprende los pasos:
 - a. prensado de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular,
 - b. cultivo de las células madre pluripotentes con activina A y un ligando de Wnt en un primer medio de cultivo complementado con B27 y
 - c. cultivo de las células madre pluripotentes con activina A en un segundo medio de cultivo complementado con B27.
7. El método de la reivindicación 1, donde el paso de diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje de endodermo definitivo se consigue por un método que también incluye el prensado de las células madre pluripotentes en una capa de distribuidor fibroblástico.
8. El método de la reivindicación 7, donde las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido químicamente que comprende DMEM-F12 complementada con B27, un ligando de Wnt y activina A.
9. El método de la reivindicación 7, donde las células madre pluripotentes se cultivan en un medio definido químicamente que comprende DMEM-LG complementado con B27, un ligando Wnt y activina A.
10. Un método para diferenciar células madre pluripotentes a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, que comprende los siguientes pasos:
 - a. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio definido químicamente que comprende un medio complementado con B27,
 - b. diferenciación de las células madre pluripotentes en células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo, tratando las células pluripotentes con activina A y
 - c. diferenciación de las células que expresan los marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo a células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico pancreático, tratando las células que expresan marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo con por lo menos un factor de crecimiento fibroblástico, o con ácido retinoico y por lo menos un factor de crecimiento fibroblástico.
11. Un método para diferenciar células madre pluripotentes a células que expresan marcadores que son característicos del linaje endodérmico definitivo, que comprende los siguientes pasos:
 - a. prensado de las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo de tejido recubierto con una matriz extracelular y
 - b. cultivo de las células madre pluripotentes en un medio definido químicamente que incluya un medio complementado con B27 y tratamiento de las células pluripotentes con activina A.

12. El método de la reivindicación 11, donde las células madre pluripotentes se cultiven en un medio definido químicamente que comprenda DMEM-F12 complementado con B27, un ligando Wnt y activina A.
- 5 13. El método de la reivindicación 11, donde las células madre pluripotentes se cultiven en un medio definido químicamente que comprenda DMEM-LG complementado con B27, un ligando Wnt y activina A.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el B27 se use a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 %.
- 10 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el B27 se use a una concentración de aproximadamente 1 %.
- 15 16. El método de la reivindicación 10 o reivindicación 11, donde el paso de la diferenciación de las células madre pluripotentes a células que expresen marcadores característicos del linaje endodérmico definitivo se consigue por un método que también incluye el prensado de células madre pluripotentes en una capa de administración de fibroblasto.

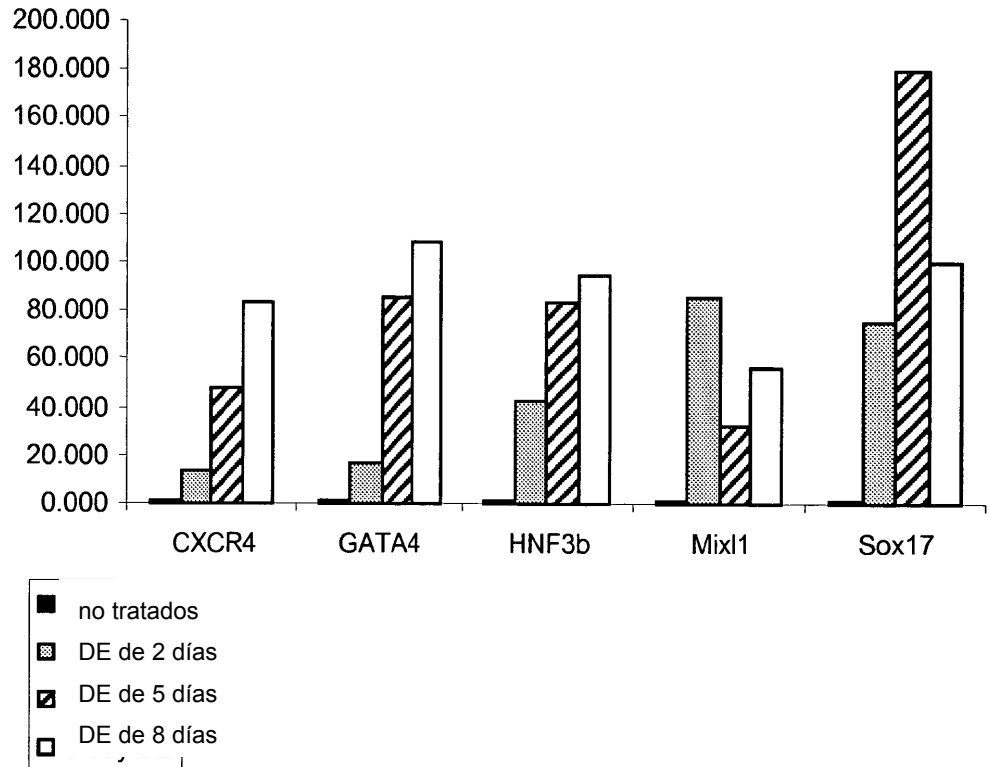
Figura 1.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

ORIGINAL

a)

Aumento de
veces por
encima de
control no
tratado



b)

Aumento de
veces

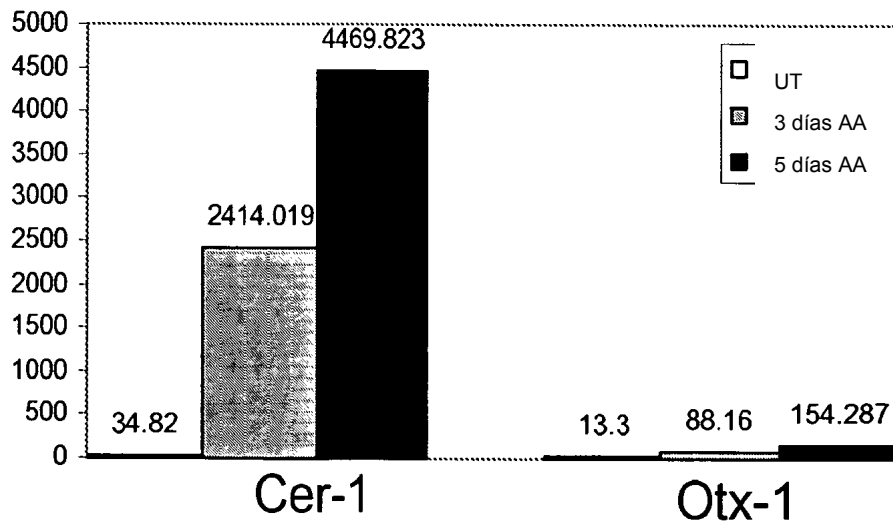


Figura 2.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei
Diferenciación de células madre embrionarias

ORIGINAL

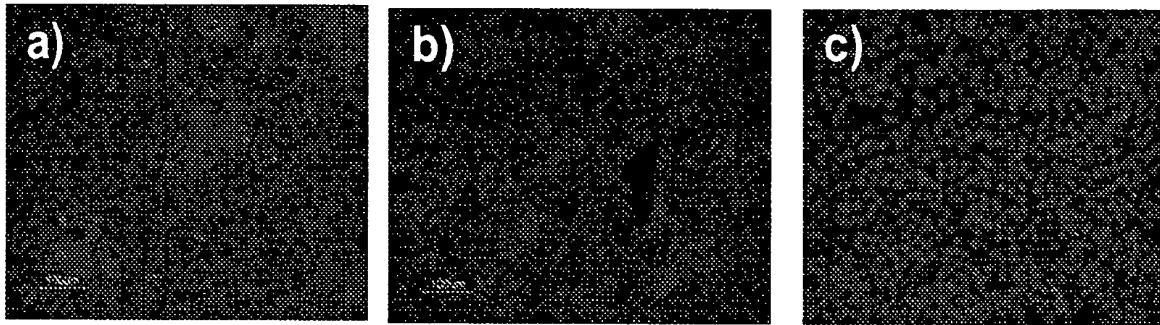


Figura 3.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

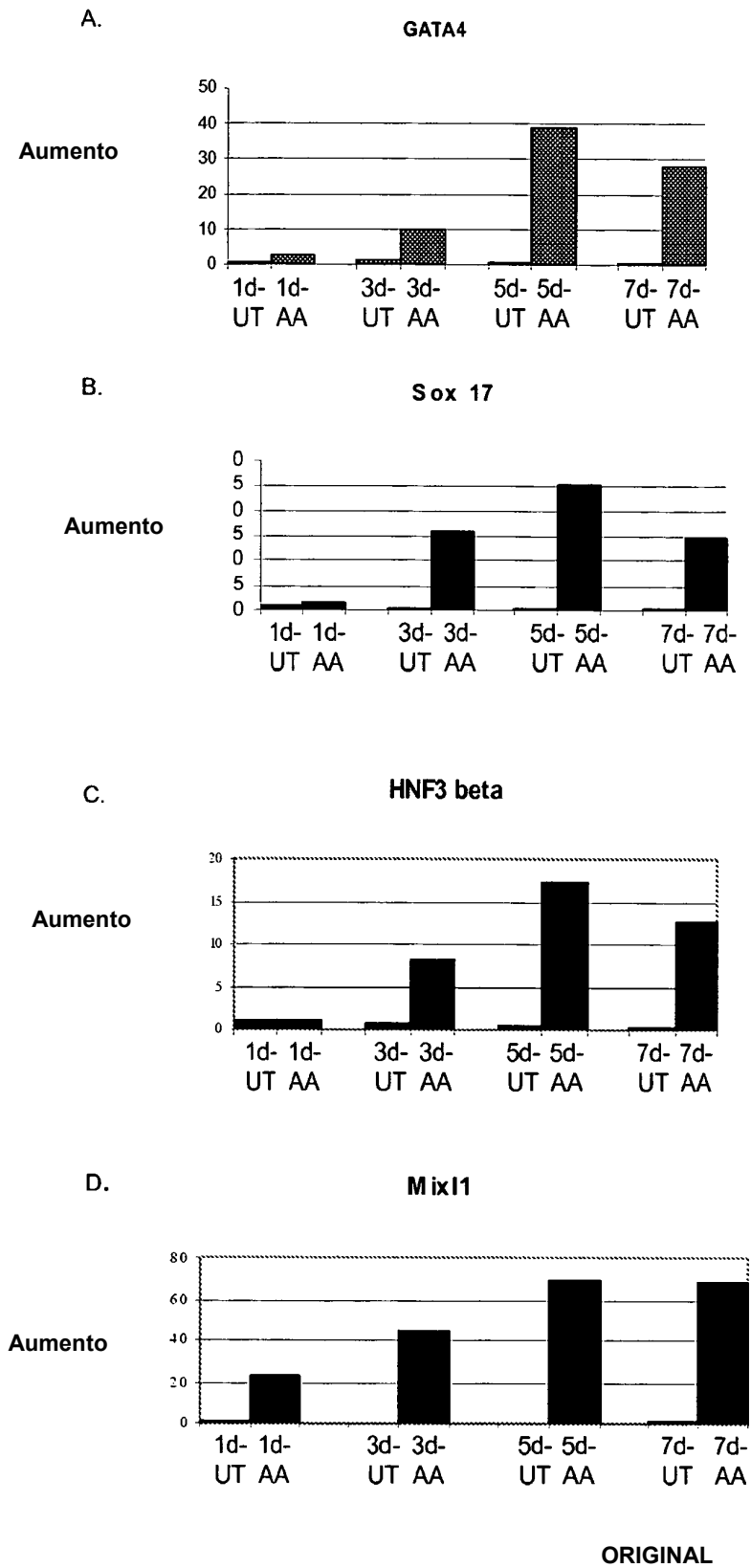
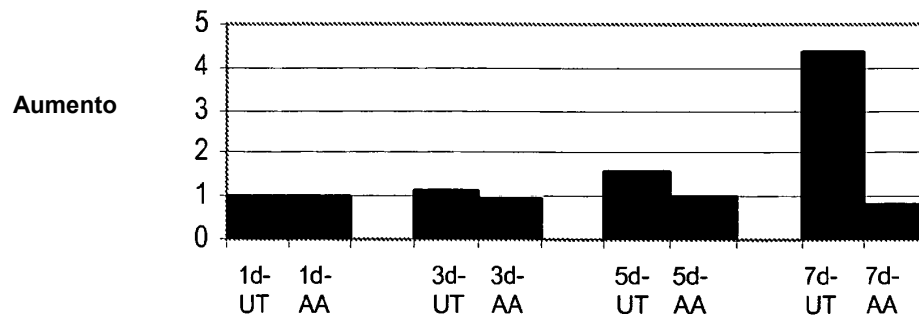


Figura 4.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

A.

Sox 7



B.

AFP

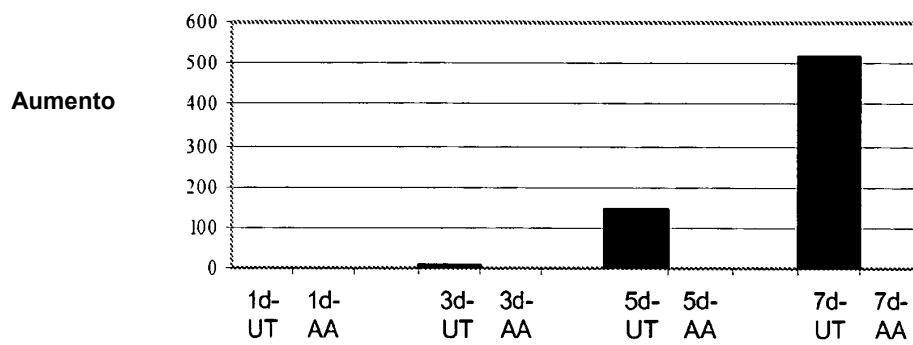
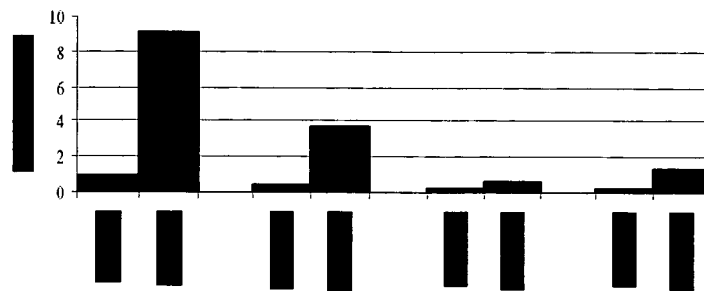


Figura 5.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

A.

Braquiuro



B.

Zic 1

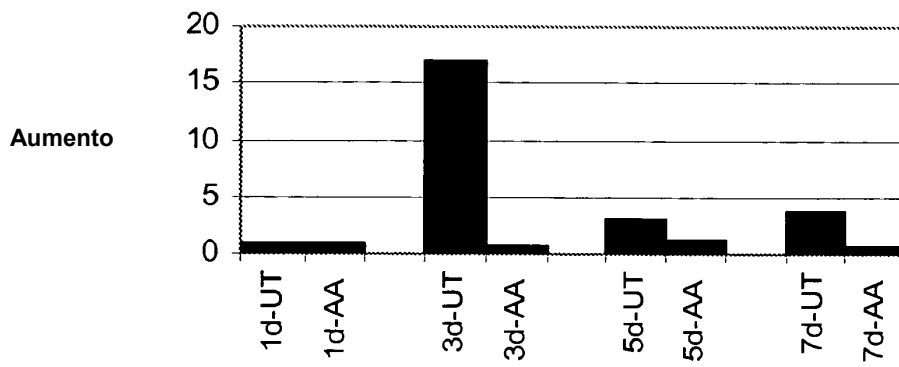


Figura 6.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei
Diferenciación de células madre embrionarias

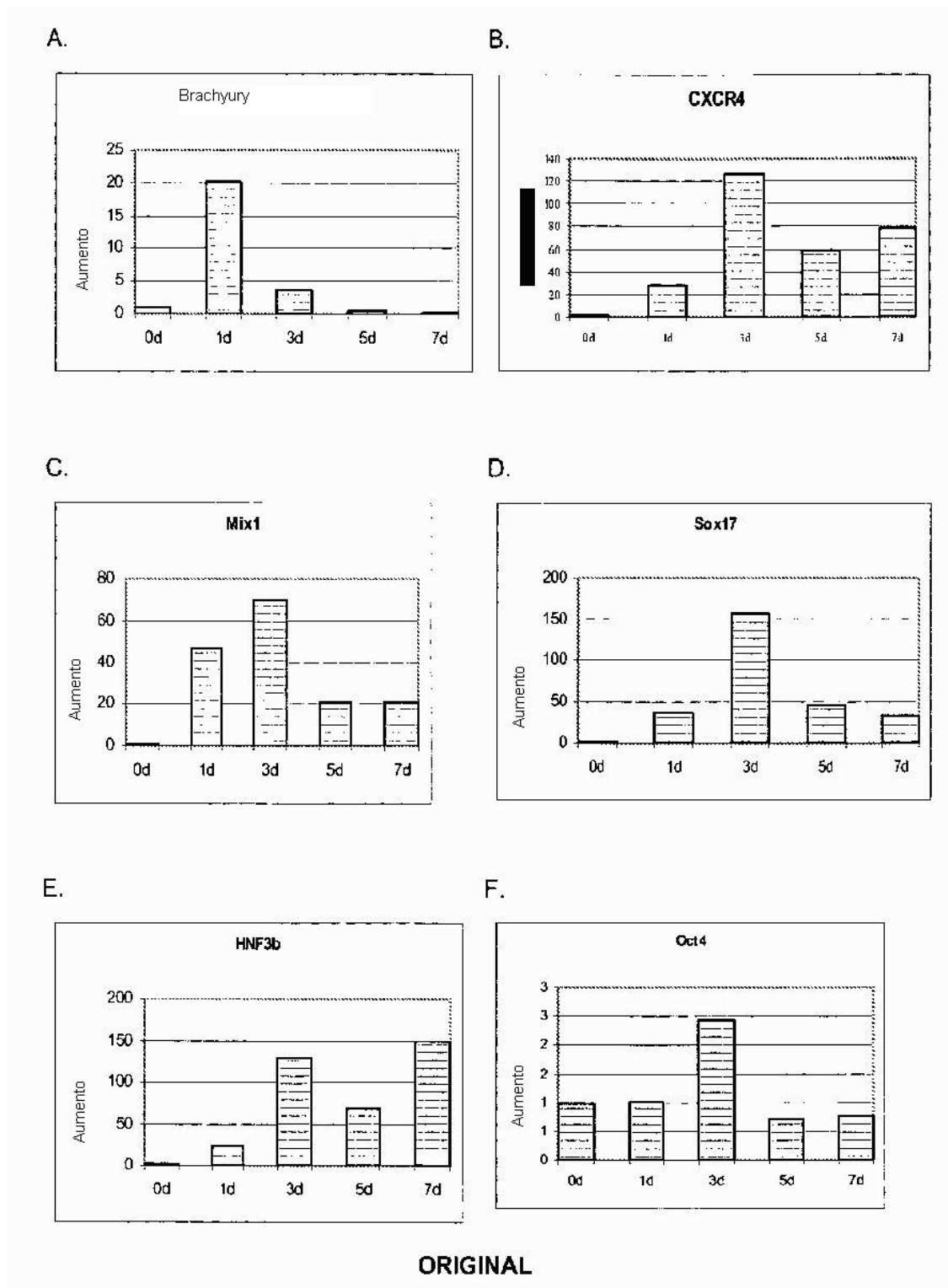
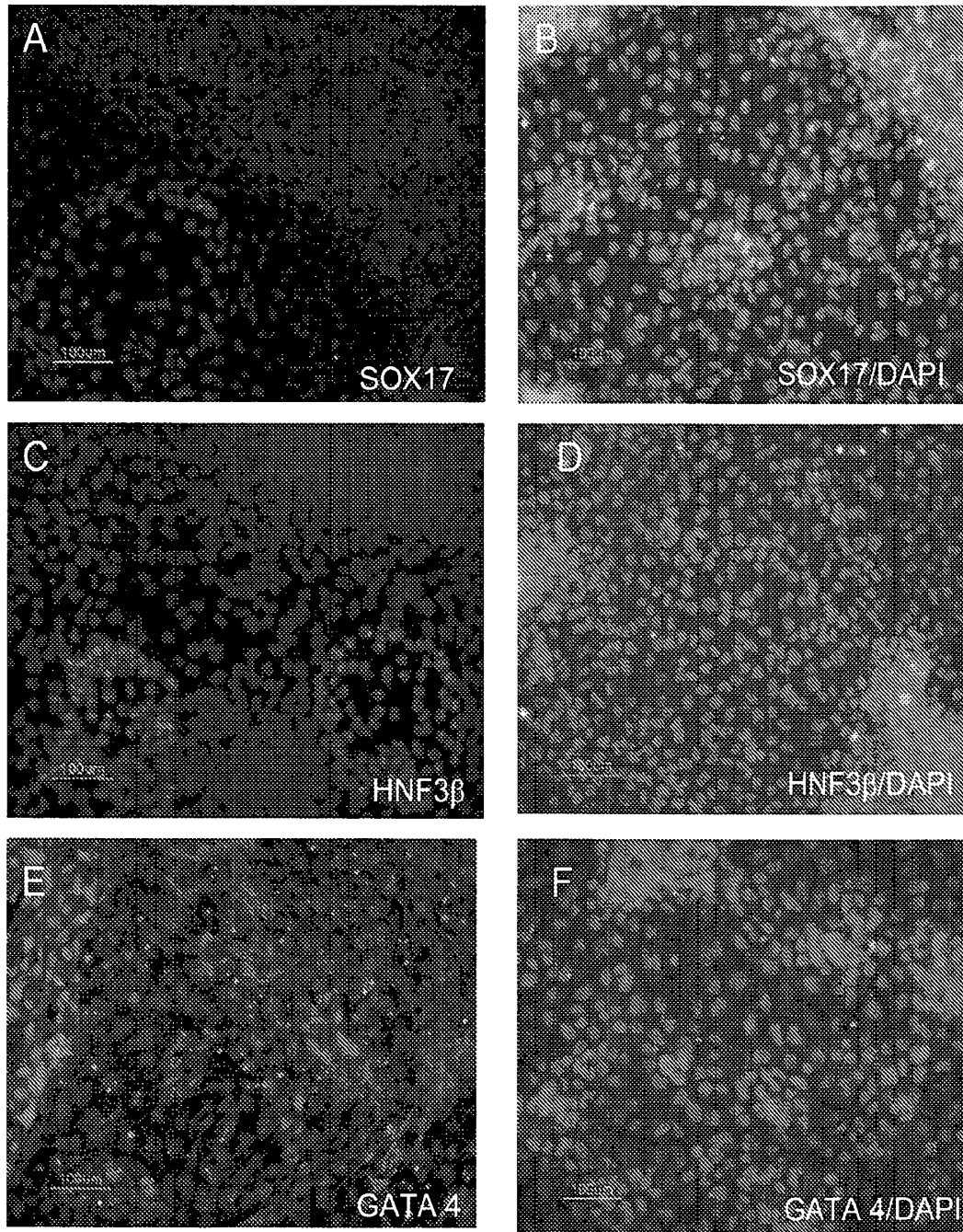


Figura 7.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei
Diferenciación de células madre embrionarias

NO TRATADAS

TRATADAS



ORIGINAL

Figura 8.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

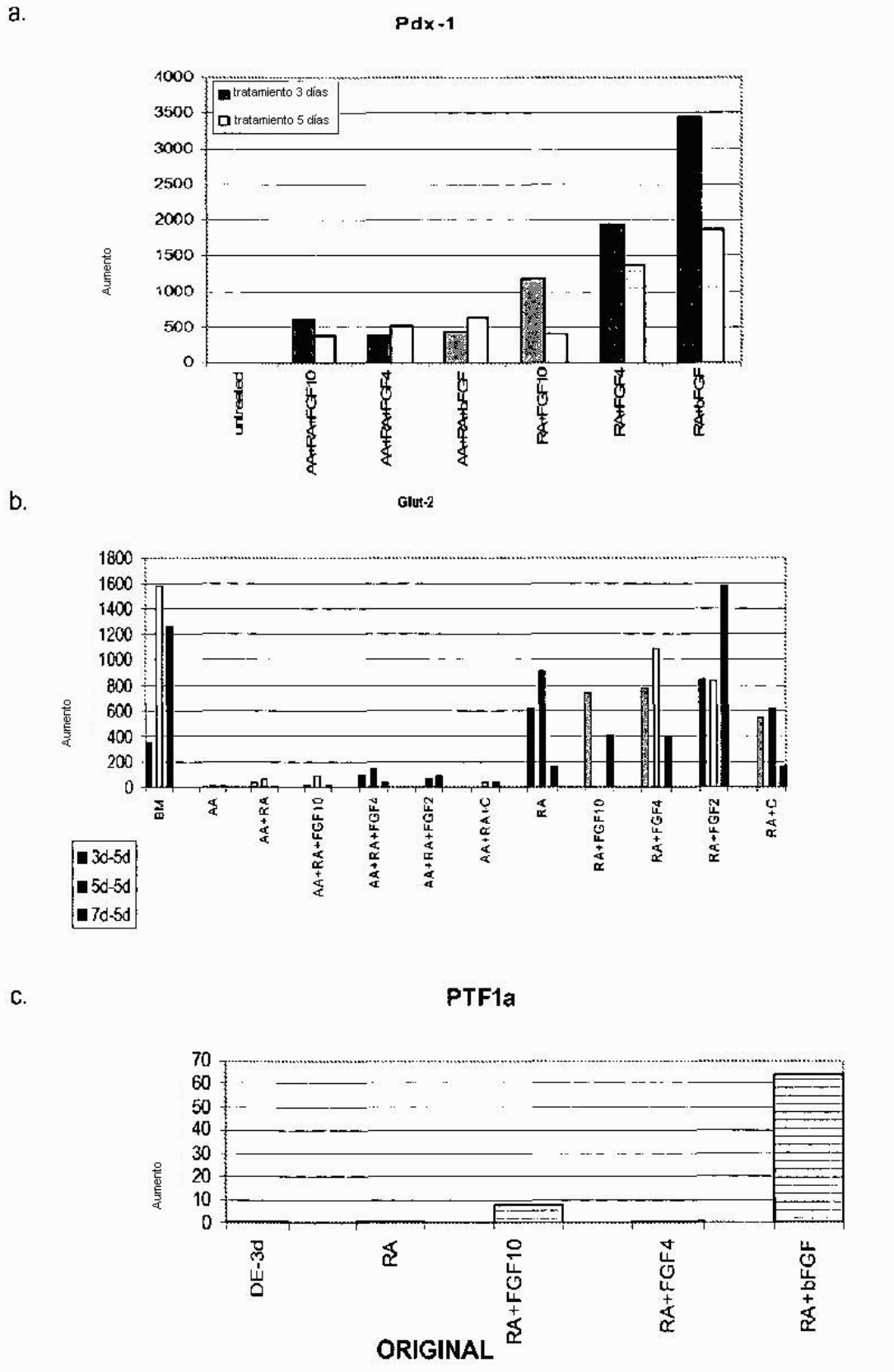
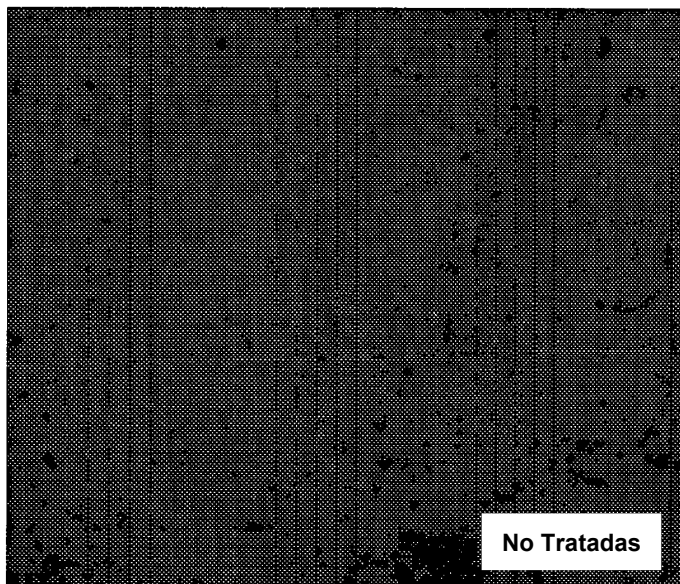


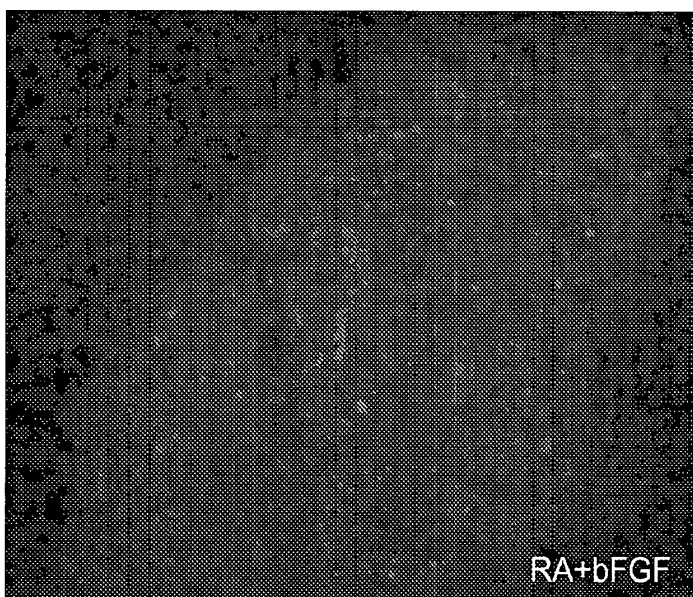
Figura 9.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanian
Diferenciación de células madre embrionarias

a. PDX1



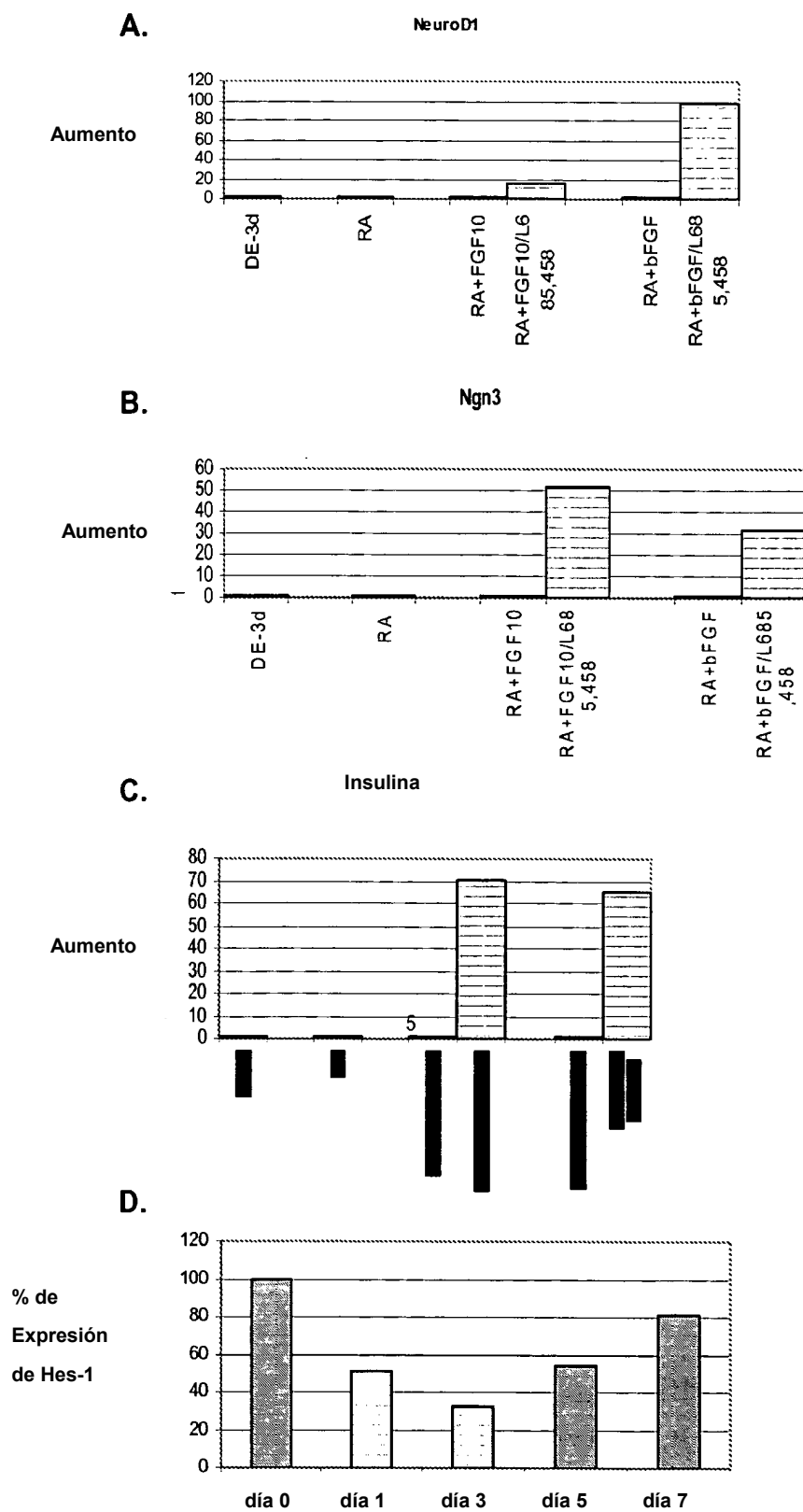
b.



ORIGINAL

Figura 10.

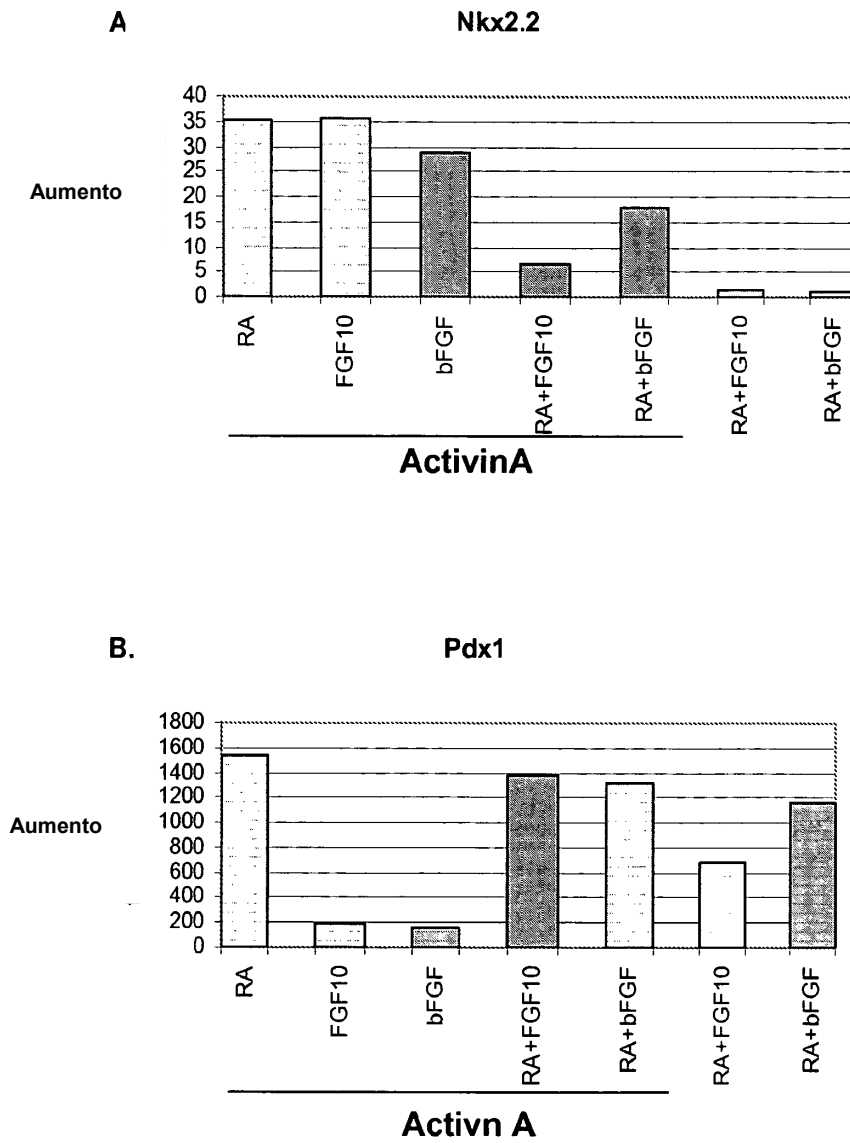
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 11.

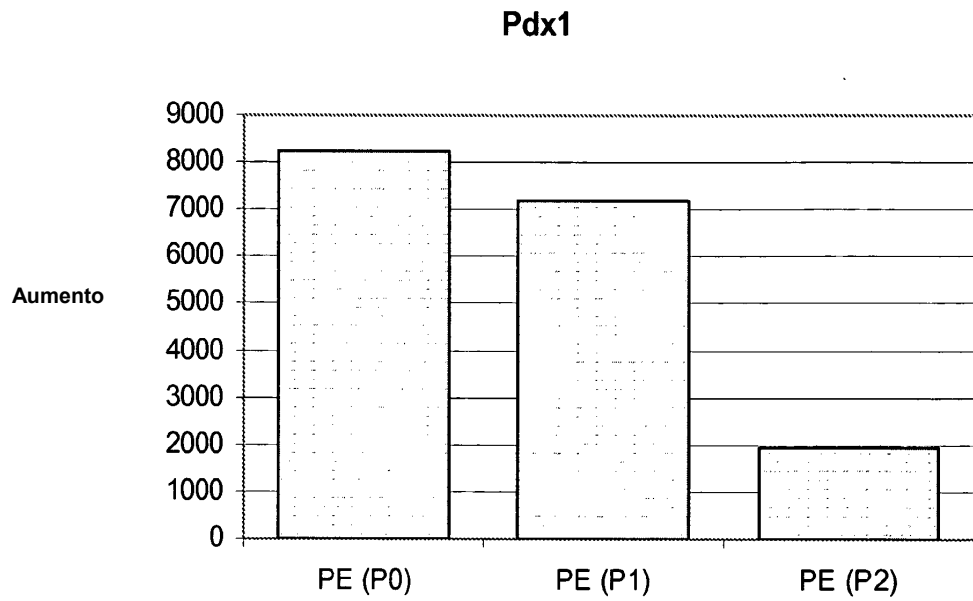
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 12.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

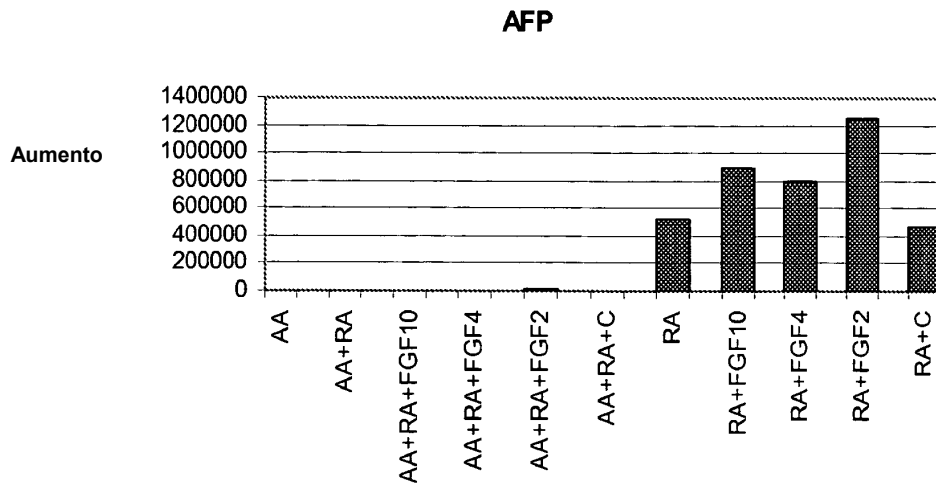


ORIGINAL

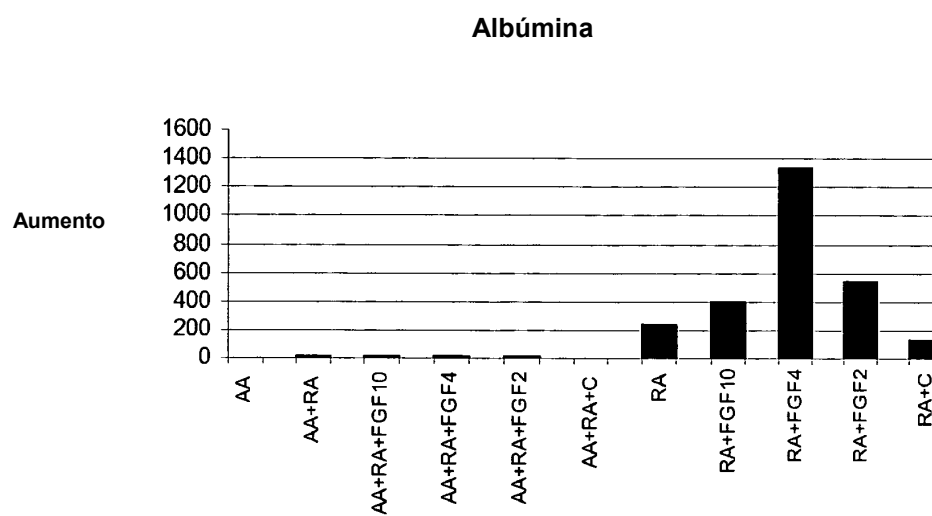
Figura 13.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



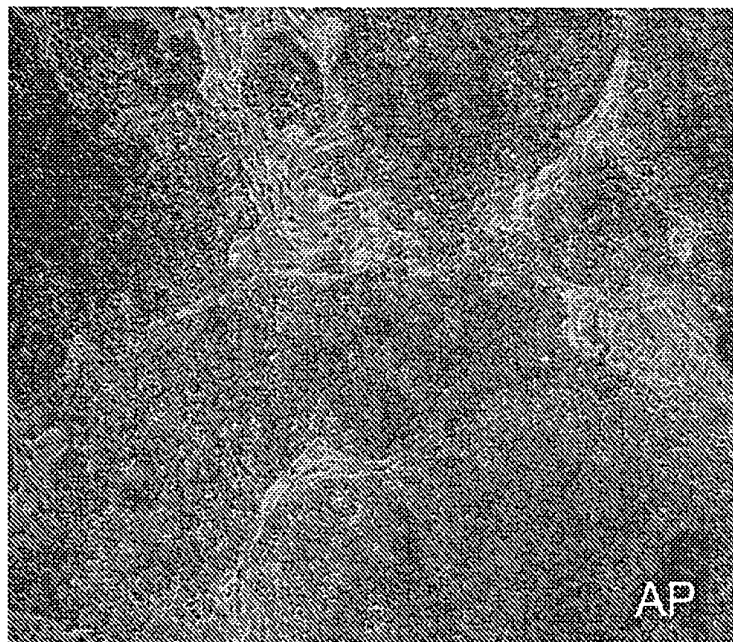
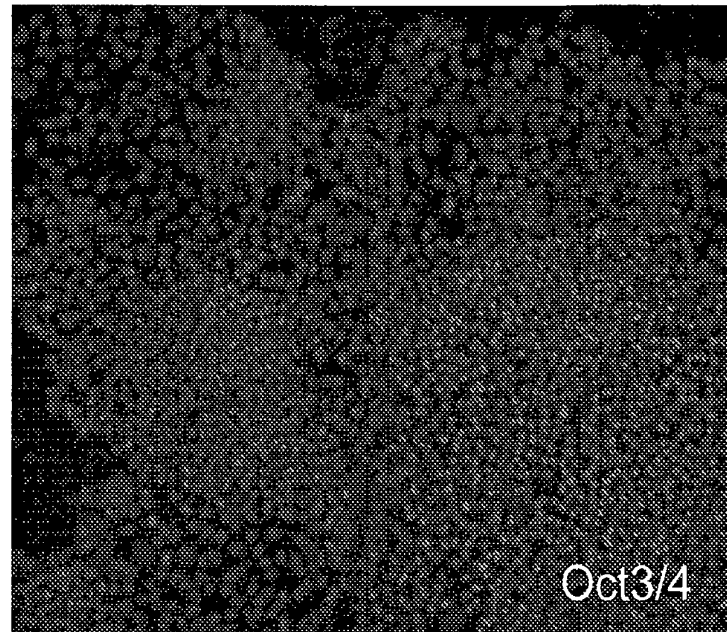
B.



ORIGINAL

Figura 14.

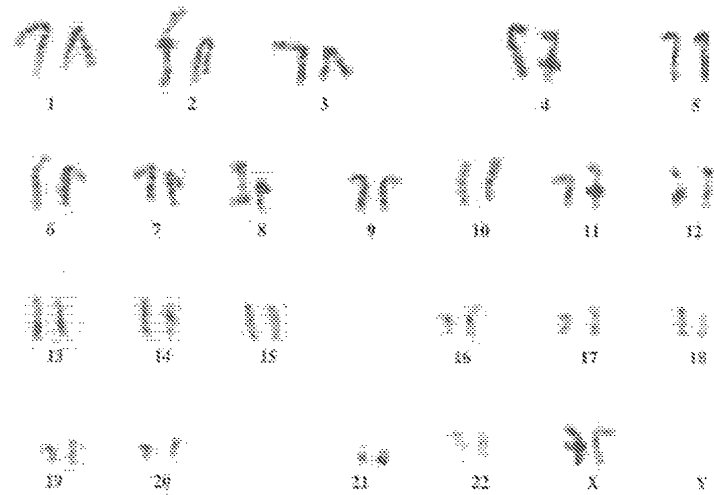
LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 15.

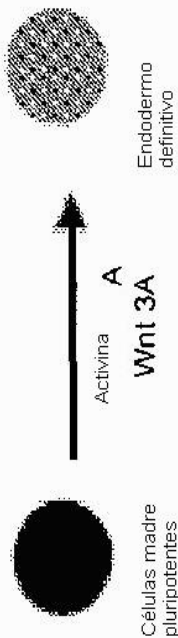
LFS5131USCIP1: Alireza Rezaei
Diferenciación de células madre embrionarias



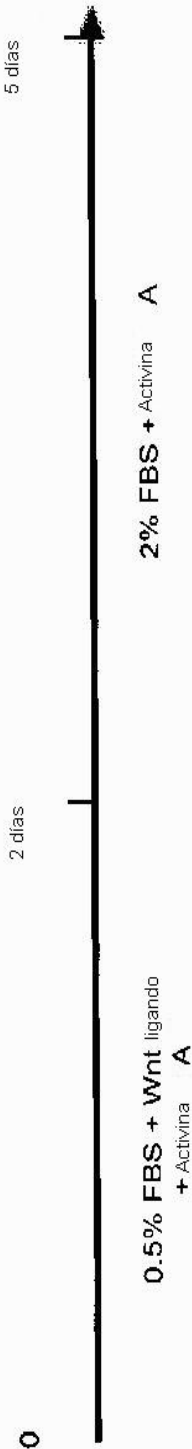
ORIGINAL

Figura 16

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanian
Diferenciación de células madre embrionarias



METODO:



MÉTODO ALTERNATIVO:

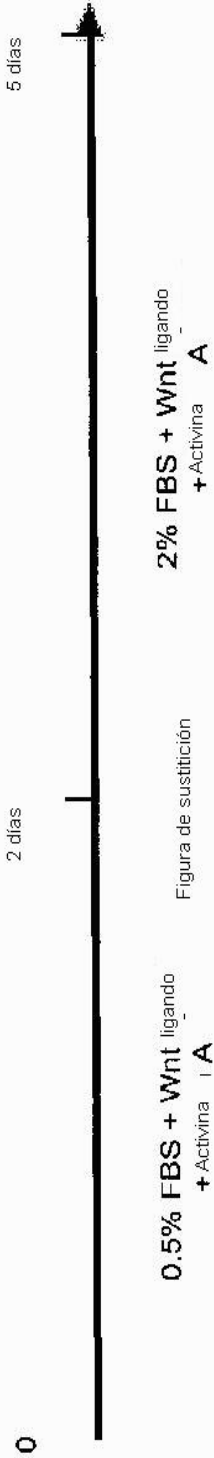
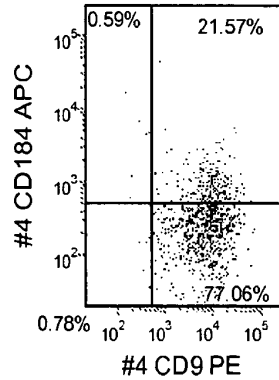


Figura de sustitución

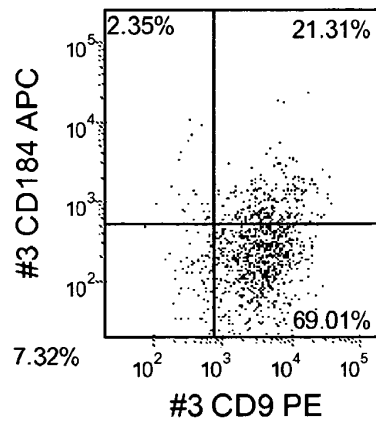
Figura 17.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia
Diferenciación de células madre embrionarias

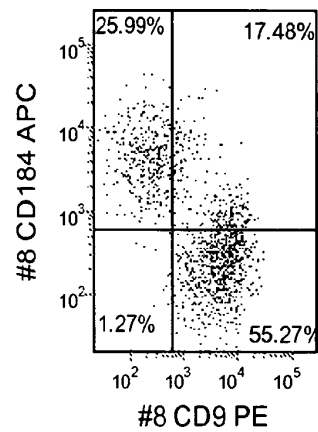
A. Dilución de Matrigel 1:60



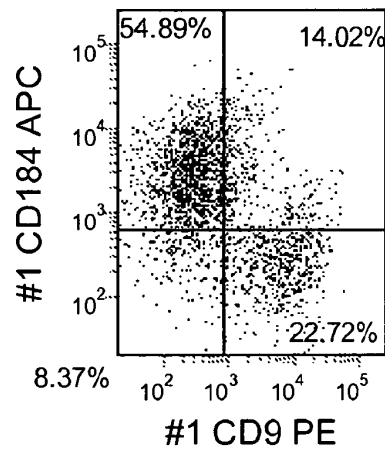
B. Dilución de Matrigel 1:30



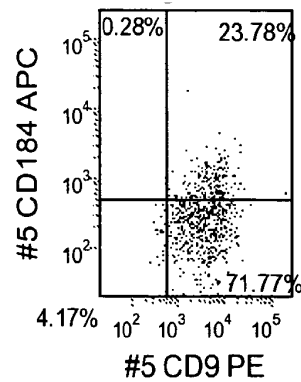
C. Dilución de Matrigel 1:15



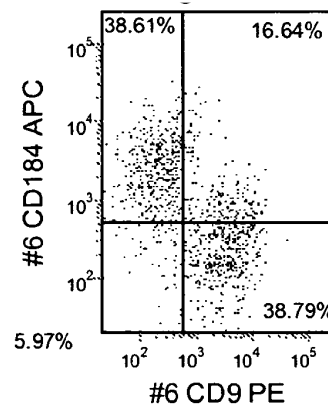
D. Dilución de Matrigel 1:10



E. Reducción de factor de crecimiento
Dilución de Matrigel 1:30



F. Reducción de factor de crecimiento
Dilución de Matrigel 1:10



ORIGINAL

Figura 18.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

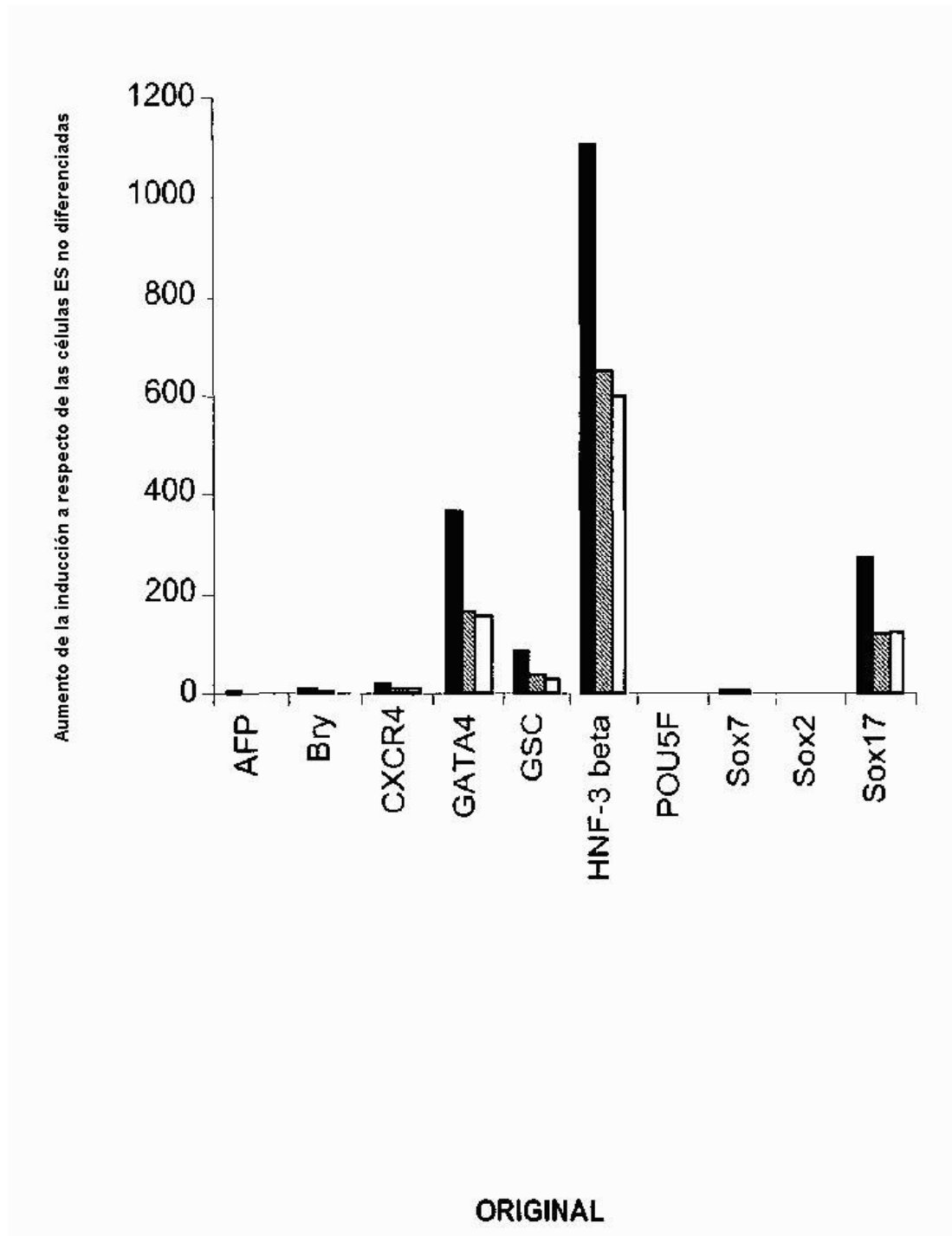
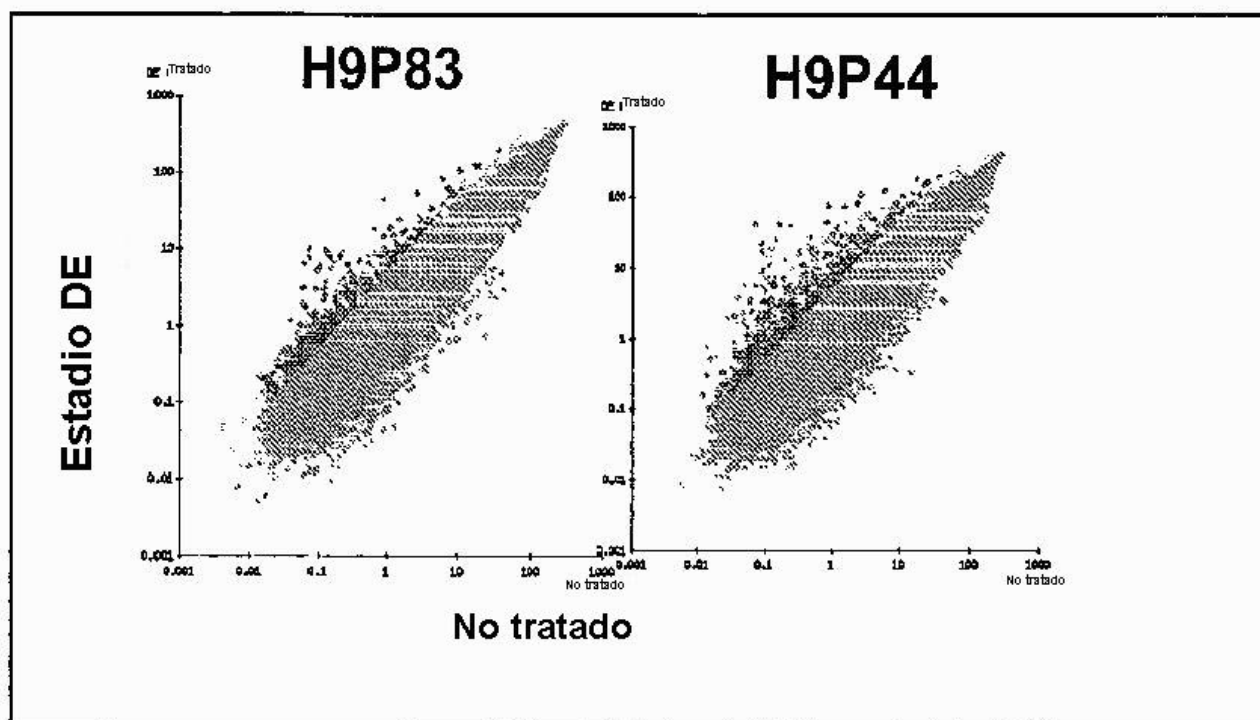


Figura 19.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 20.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanian
Diferenciación de células madre embrionarias

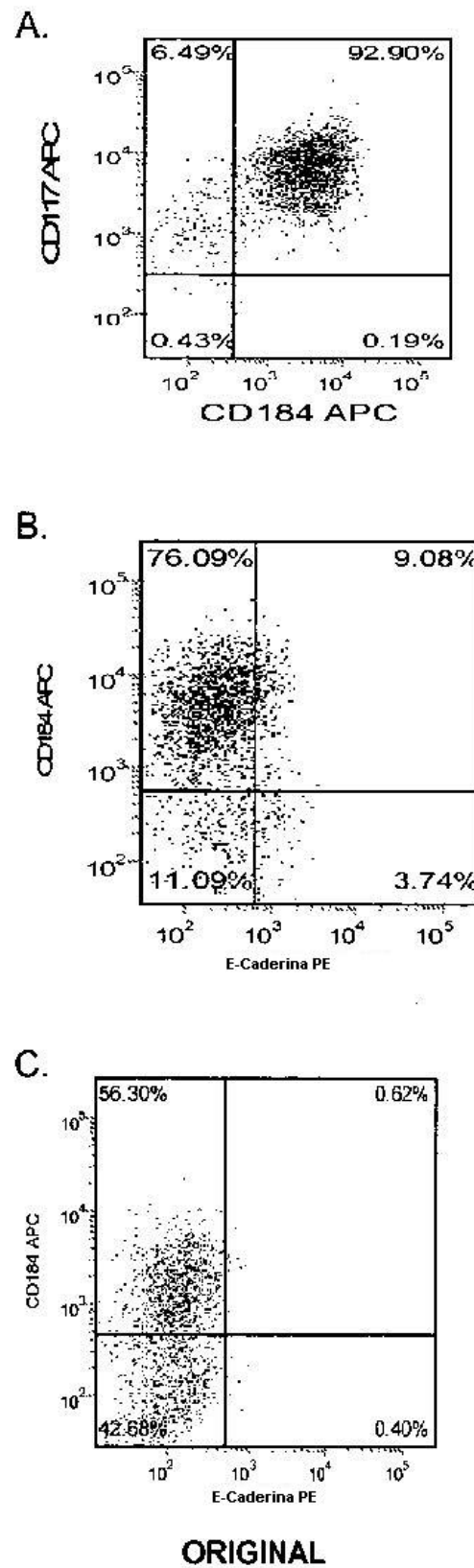
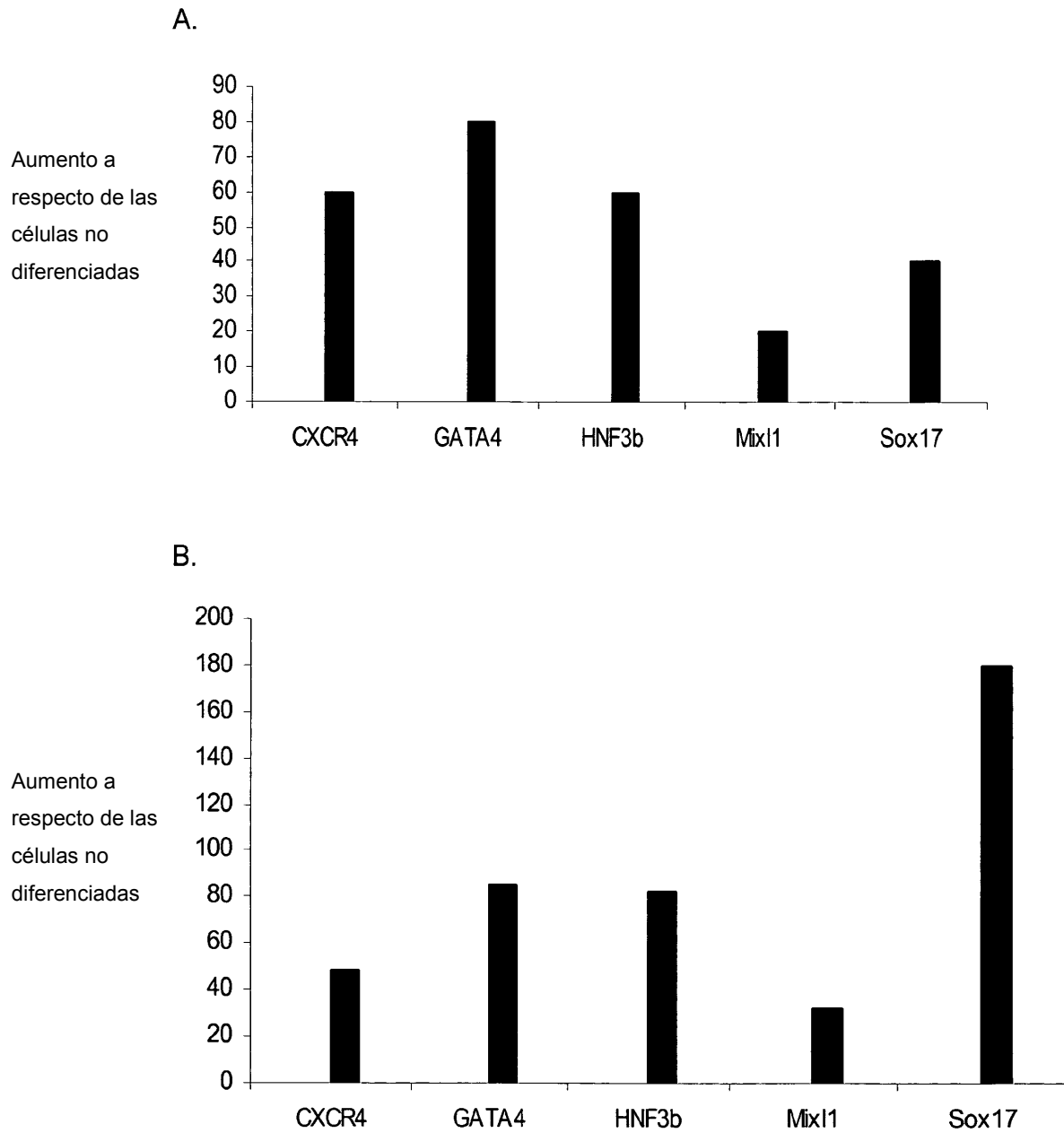


Figura 21.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanian
Diferenciación de células madre embrionarias

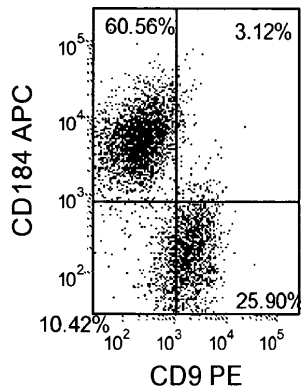


ORIGINAL

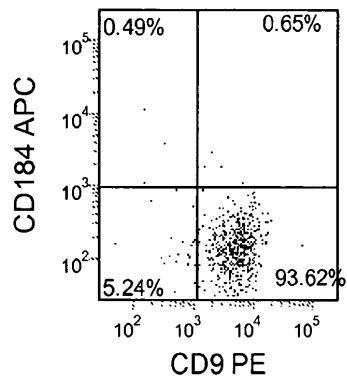
Figura 22.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

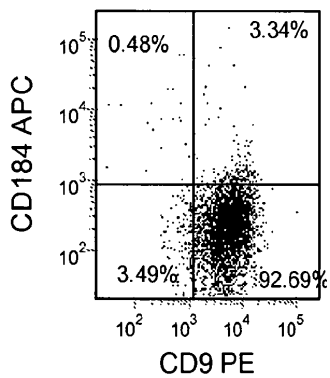
A.



B.



C.



ORIGINAL

Figura 23.

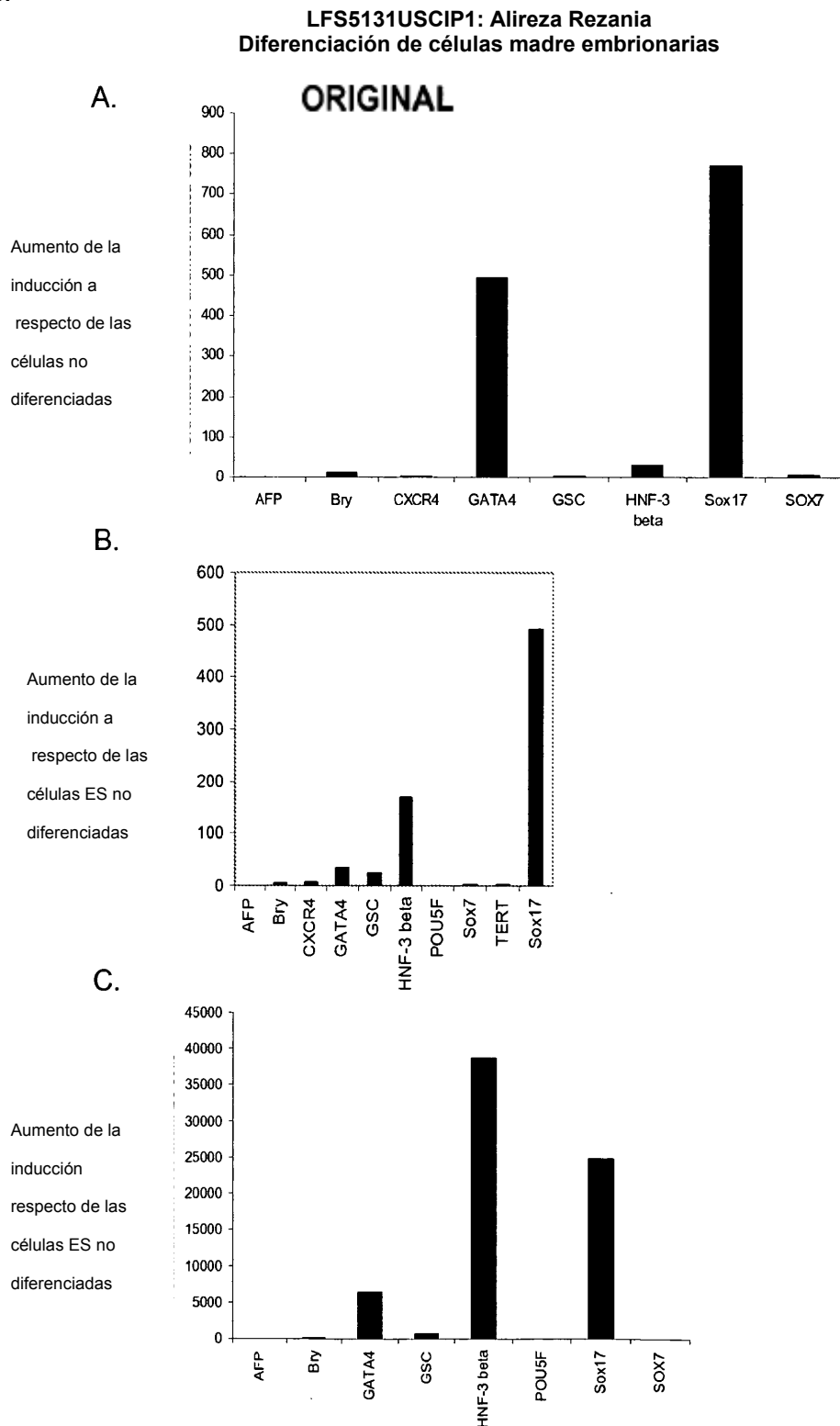
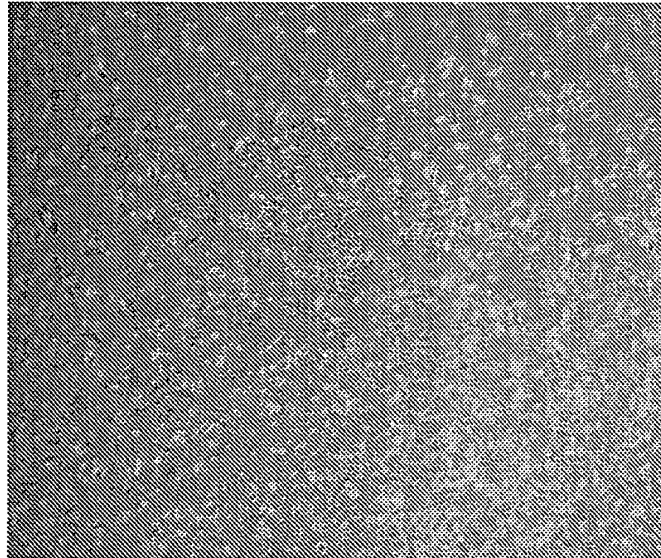


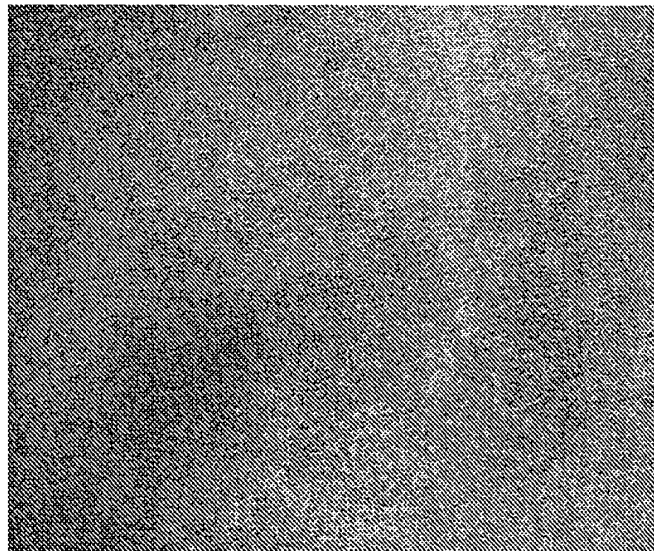
Figura 24.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanian
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



B.

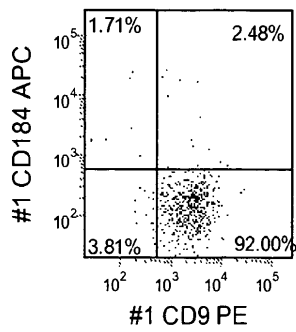


ORIGINAL

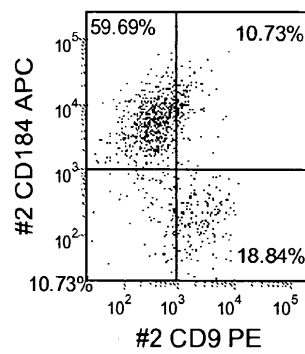
Figura 25.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

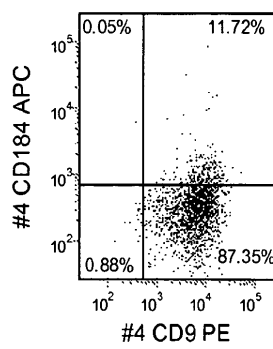
A.



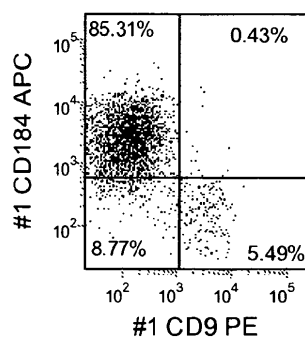
B.



C.



D.

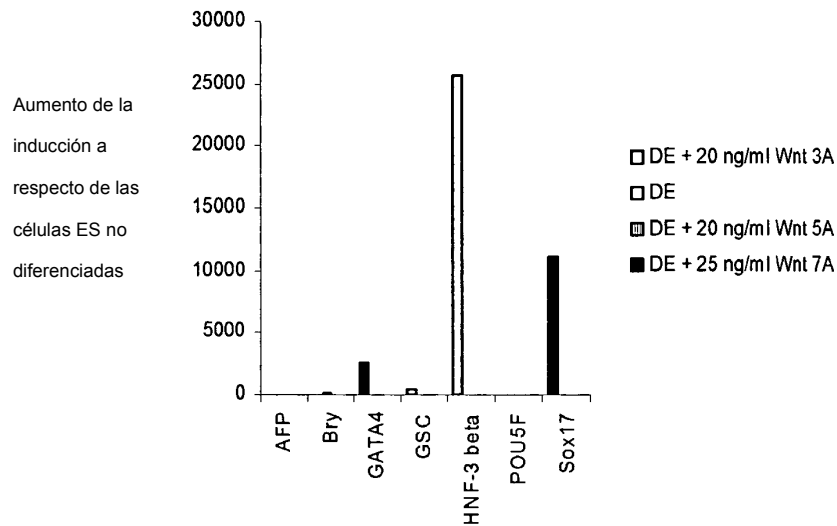


ORIGINAL

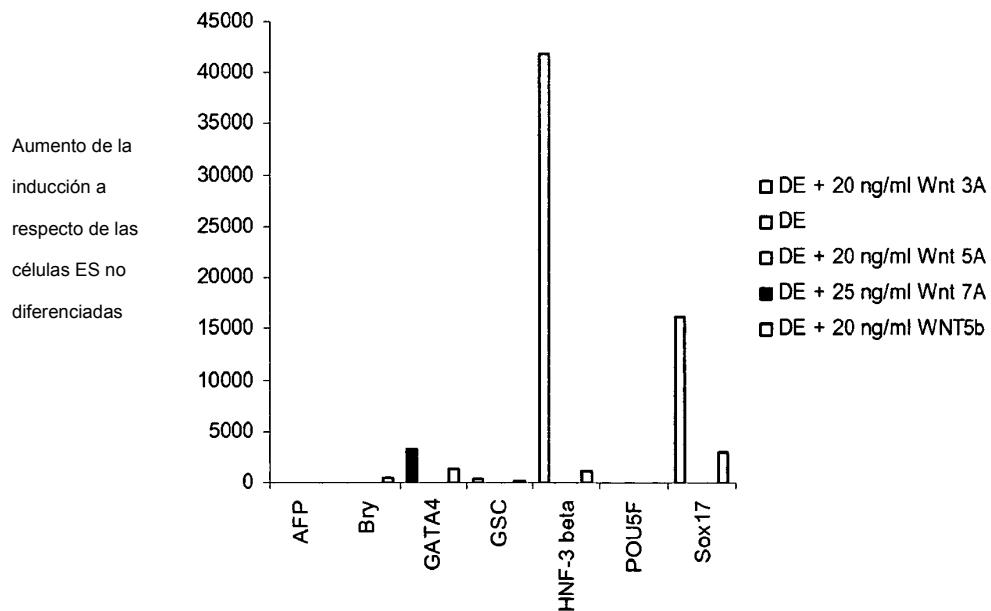
Figura 26.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



B.

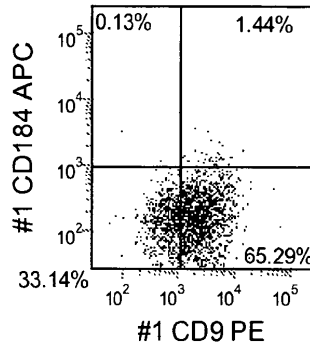


ORIGINAL

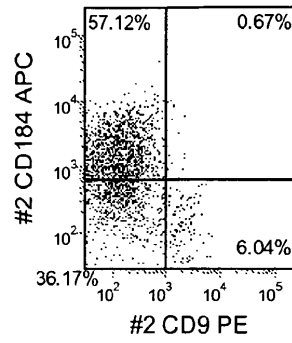
Figura 27.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

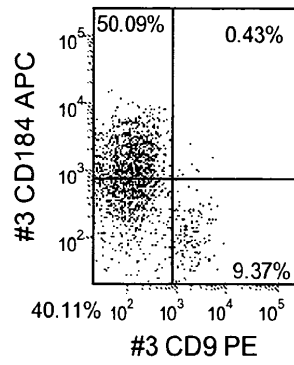
A.



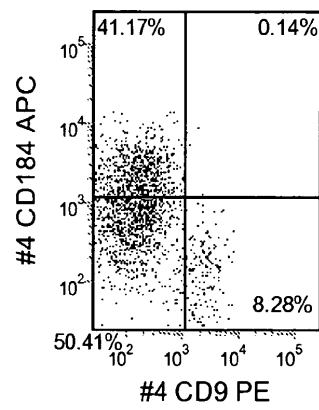
B.



C.

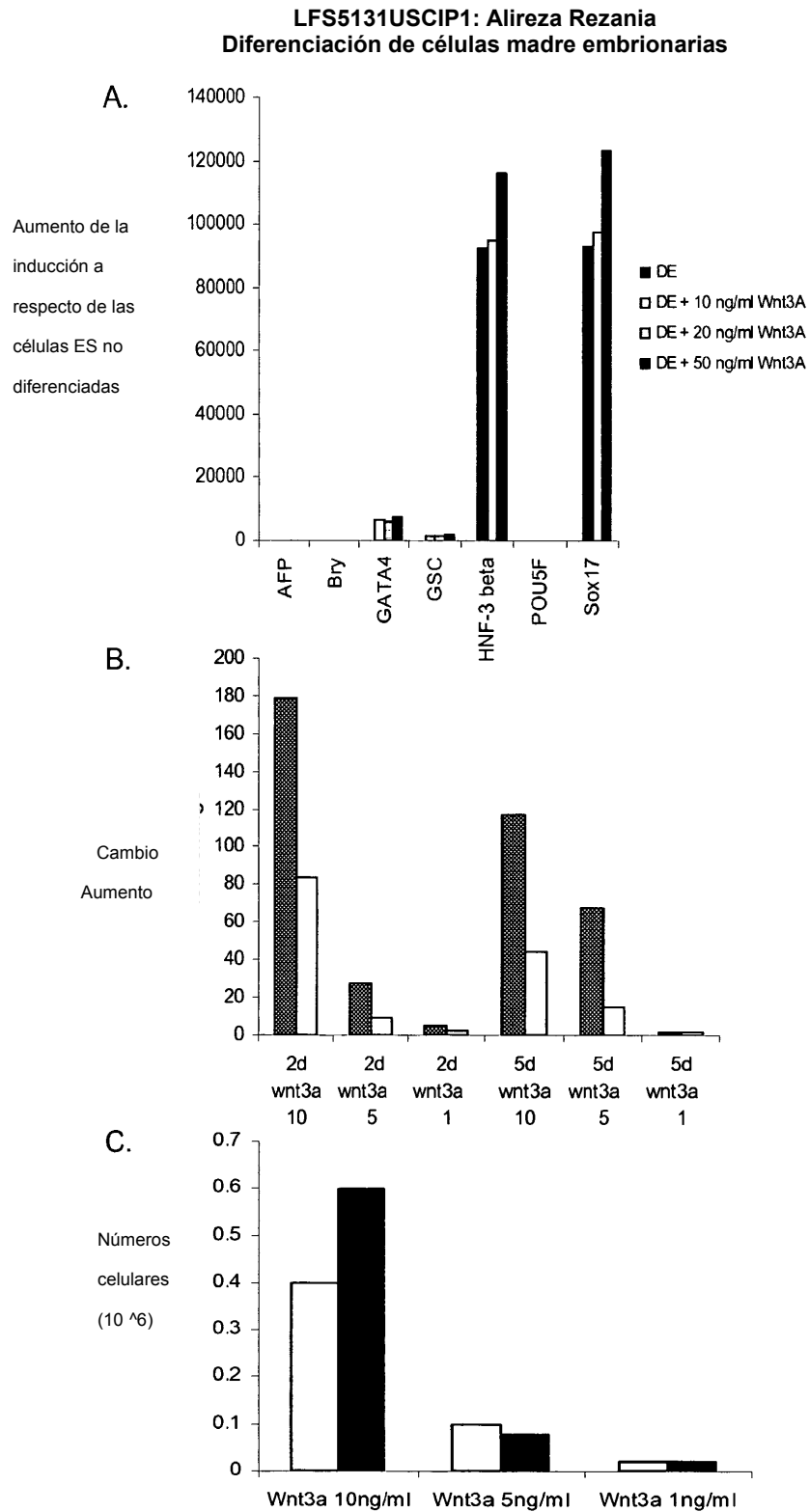


D.



ORIGINAL

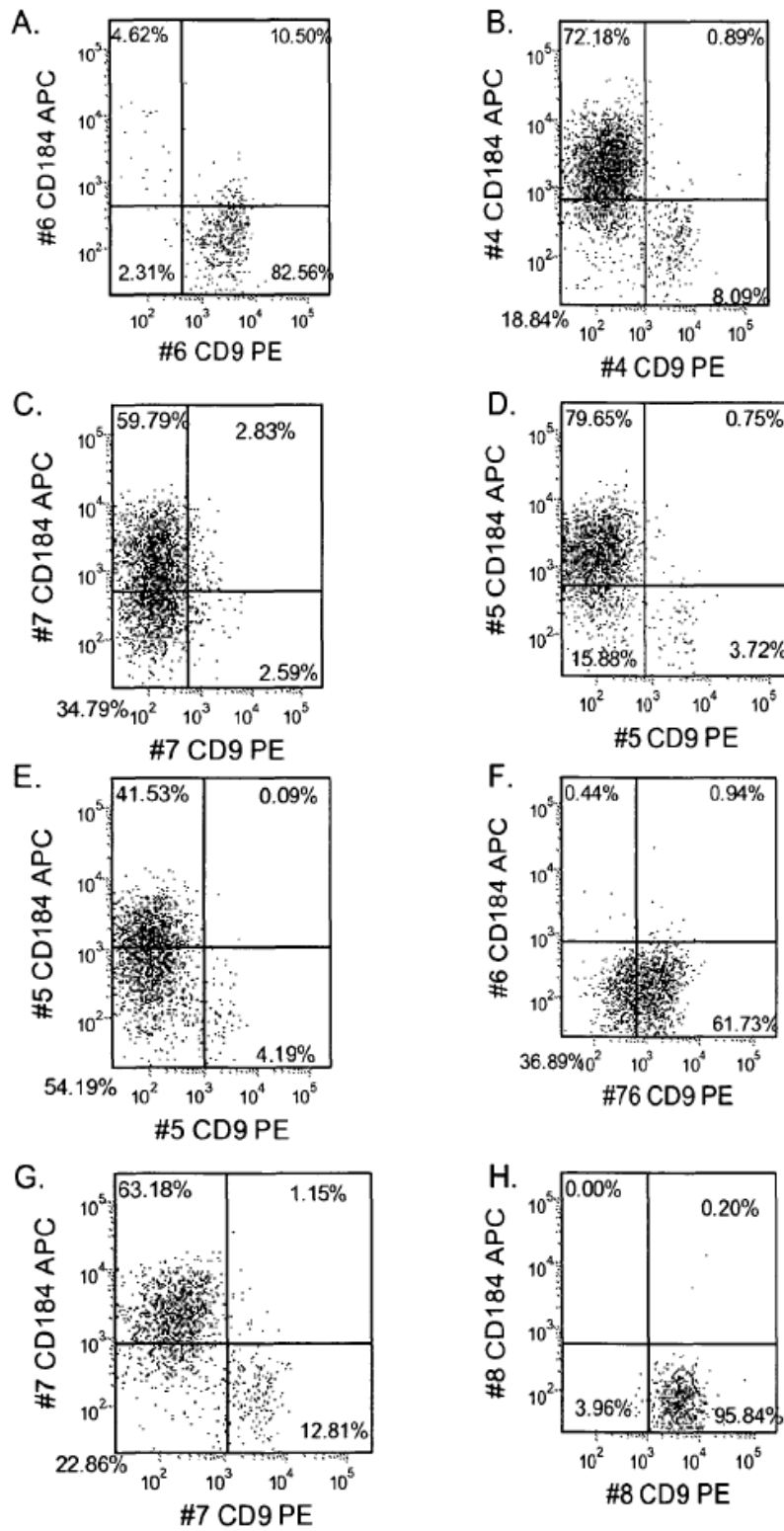
Figura 28.



ORIGINAL

Figura 29.

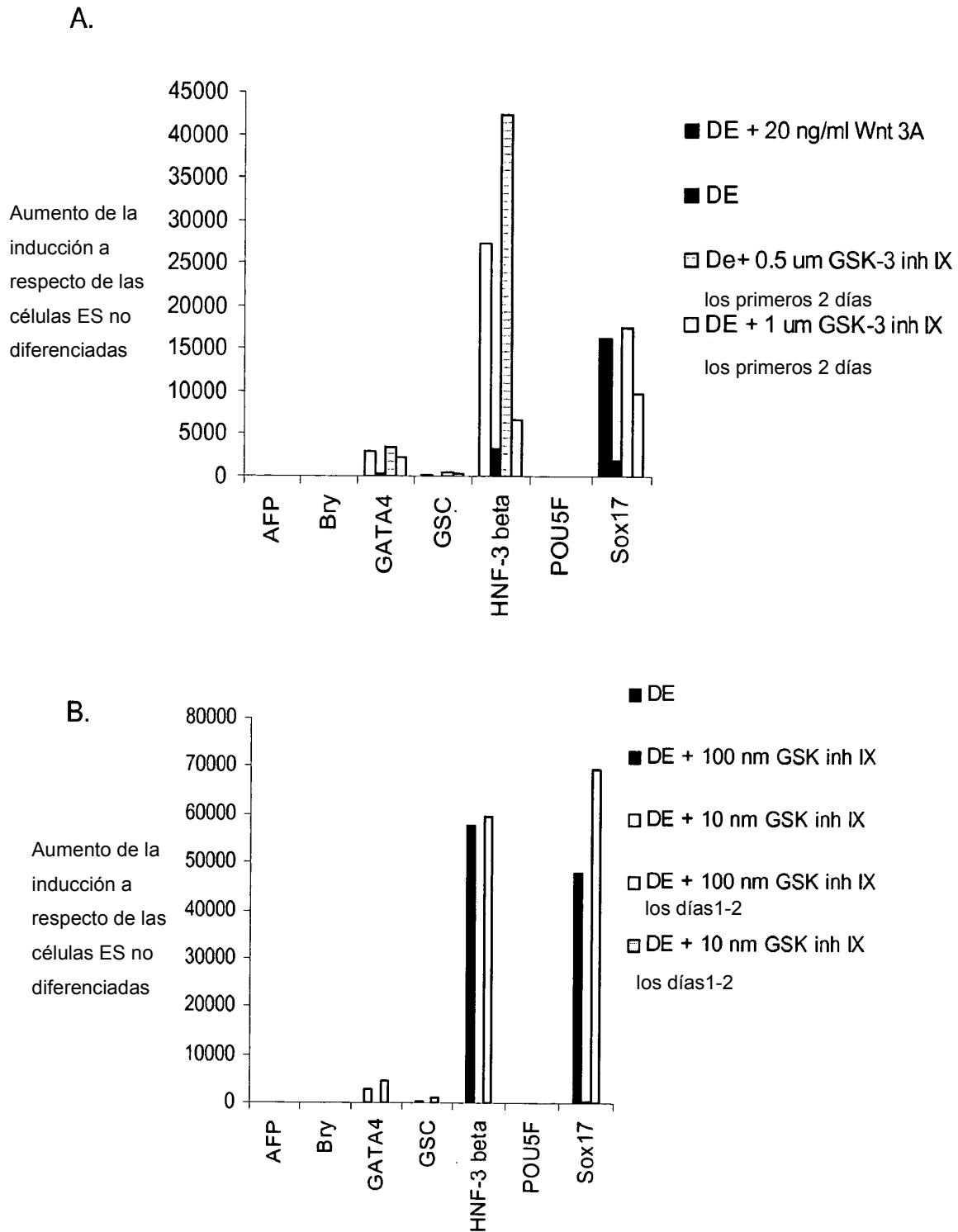
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 30.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 31.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia
Diferenciación de células madre embrionarias

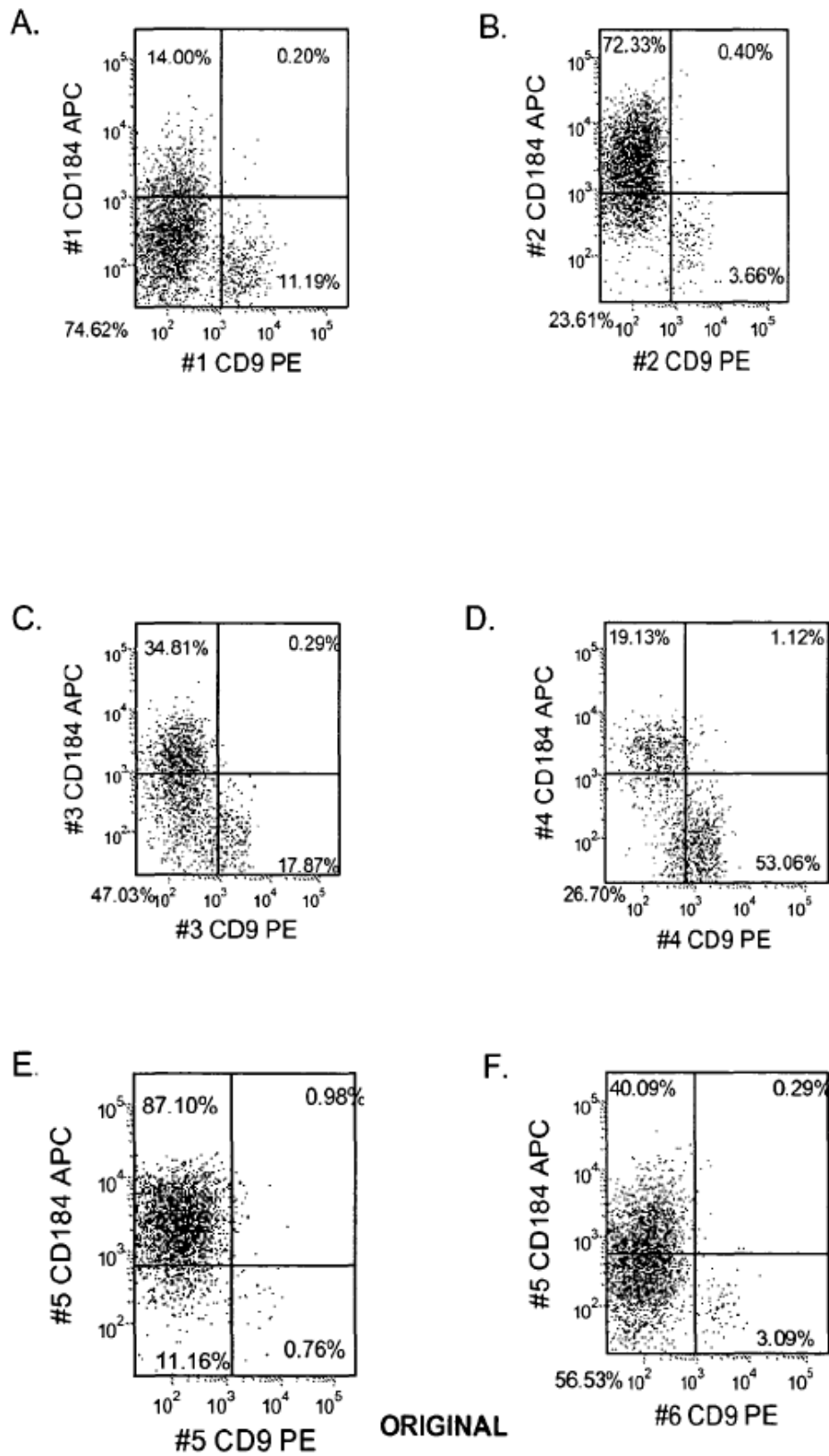


Figura 32.

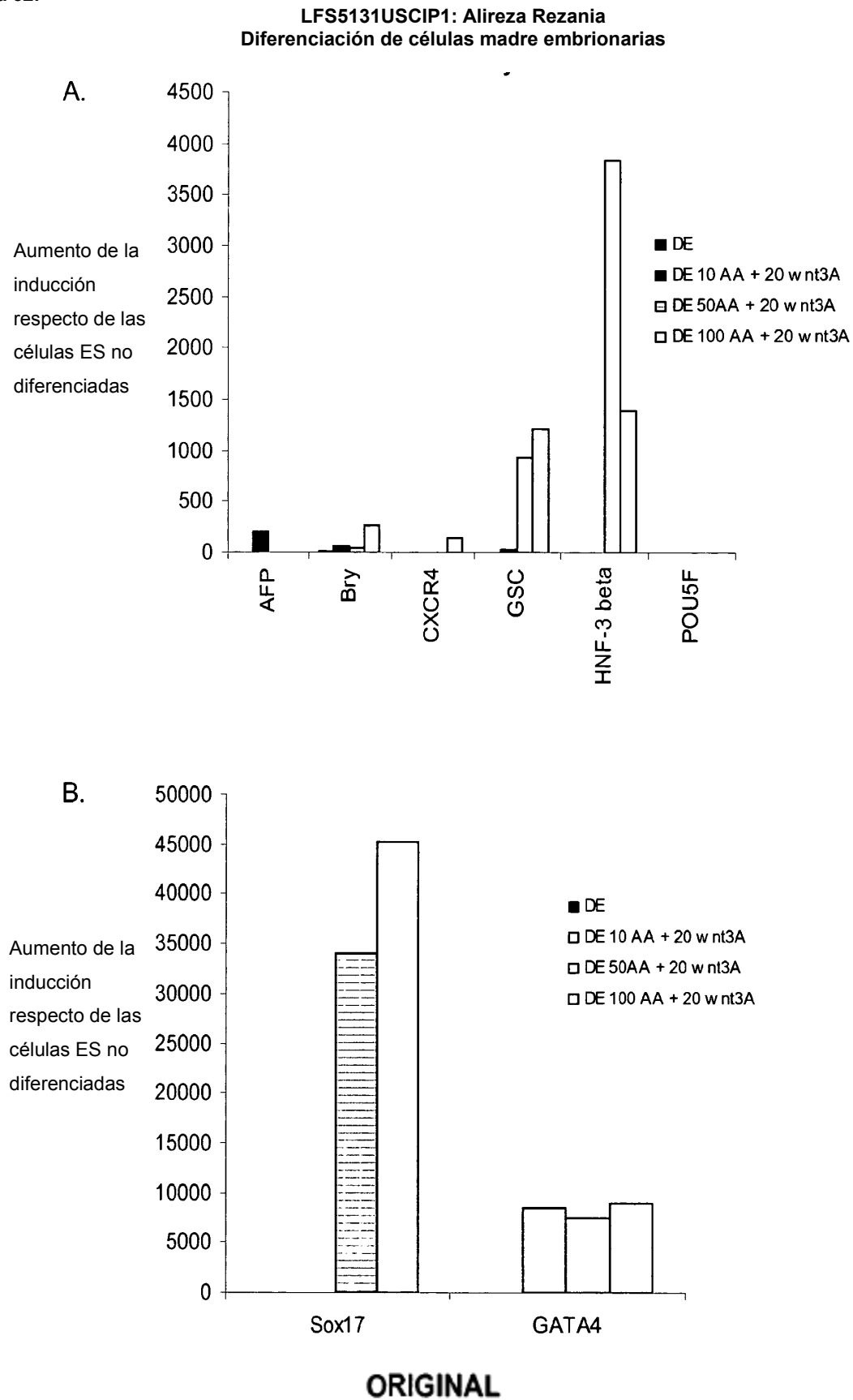
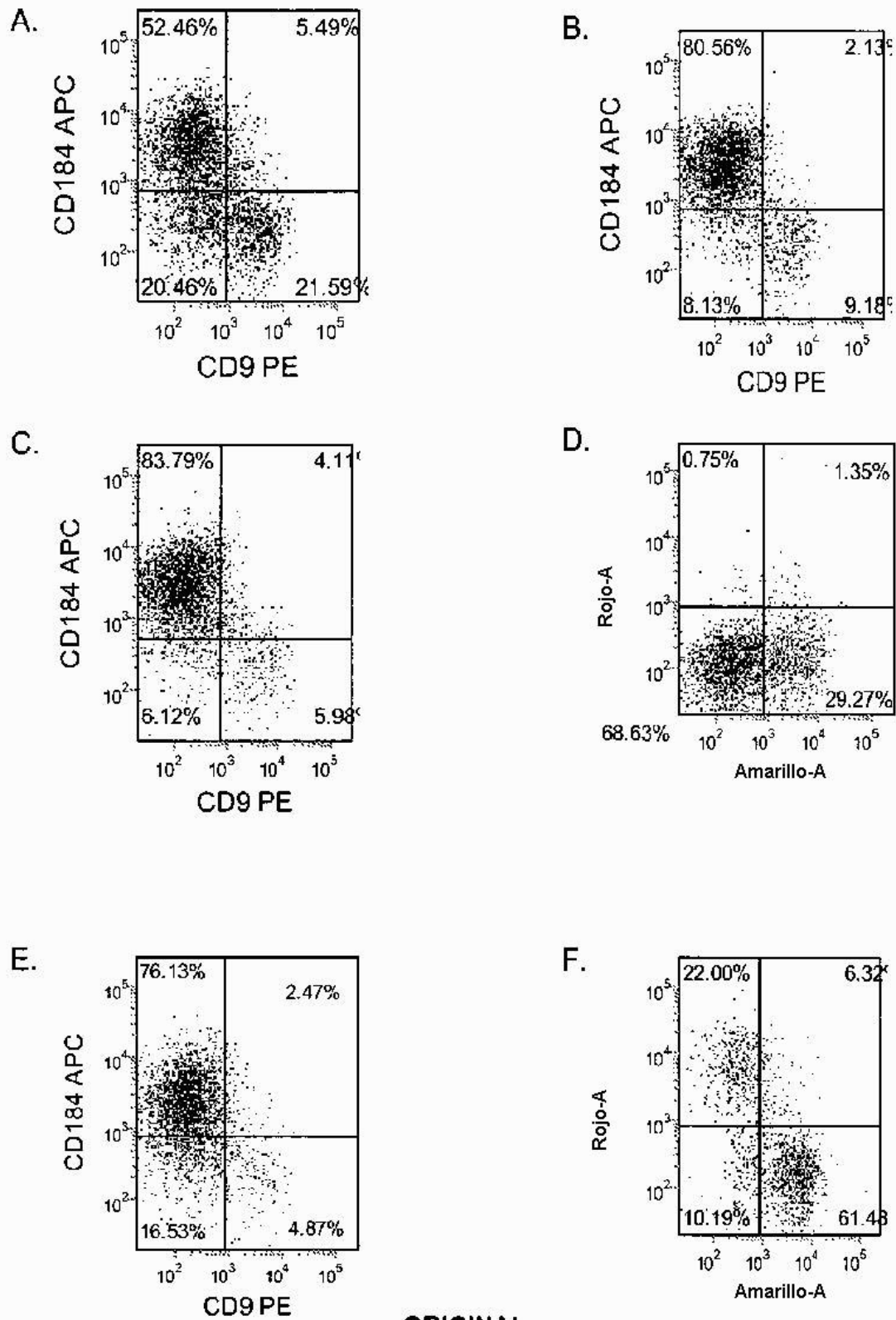


Figura 33.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 34.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

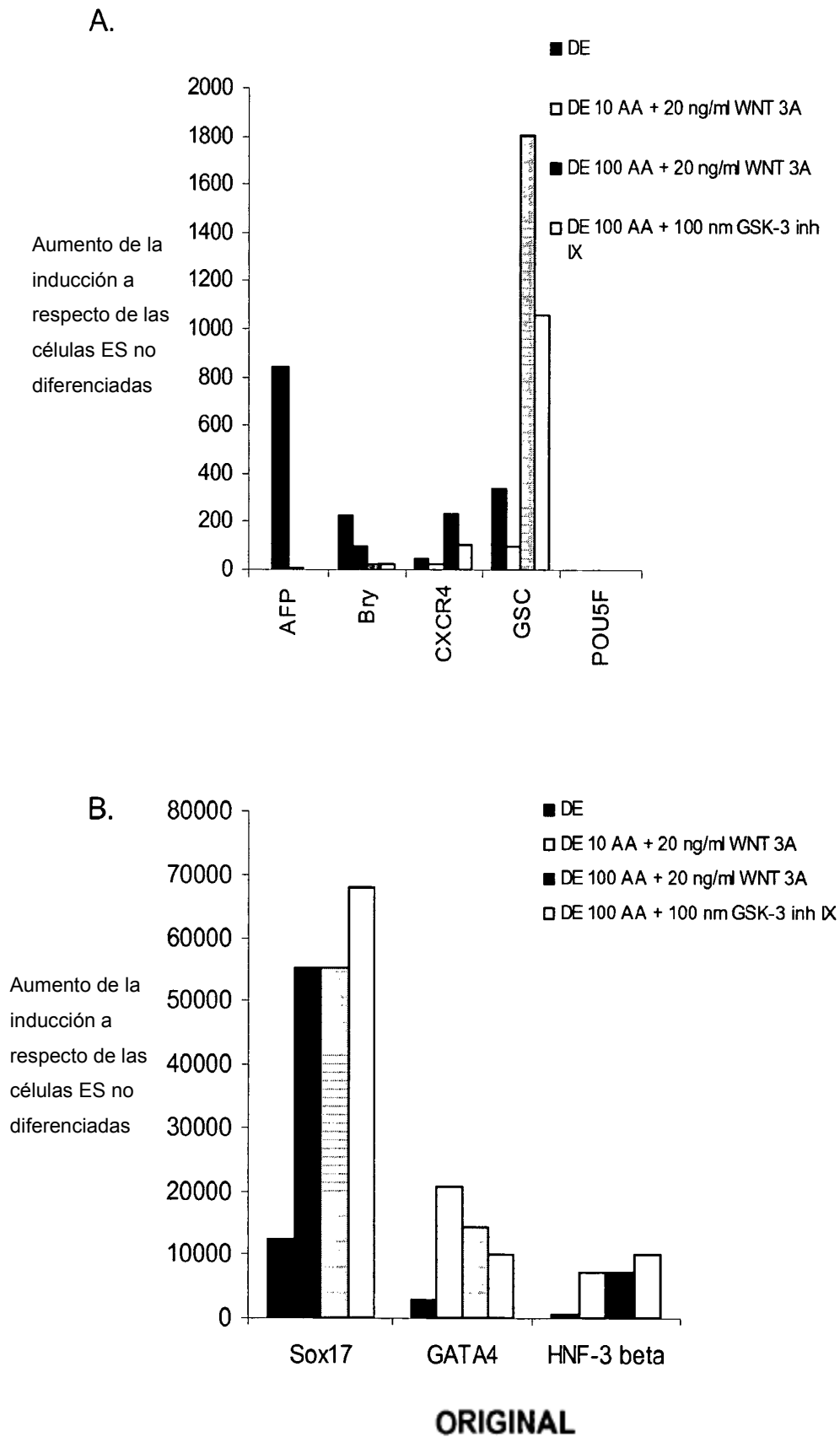


Figura 35.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

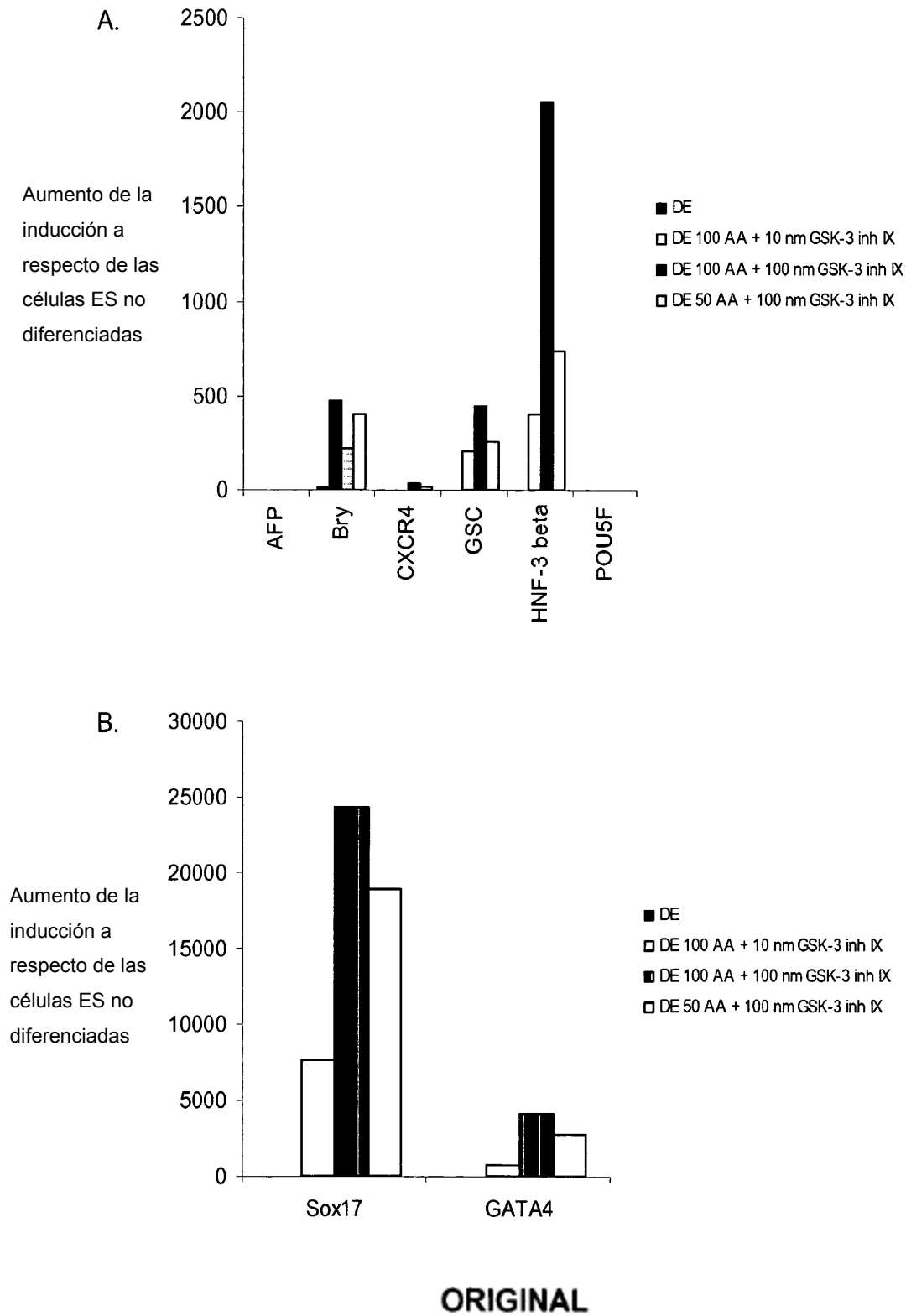


Figura 36.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezaia
Diferenciación de células madre embrionarias

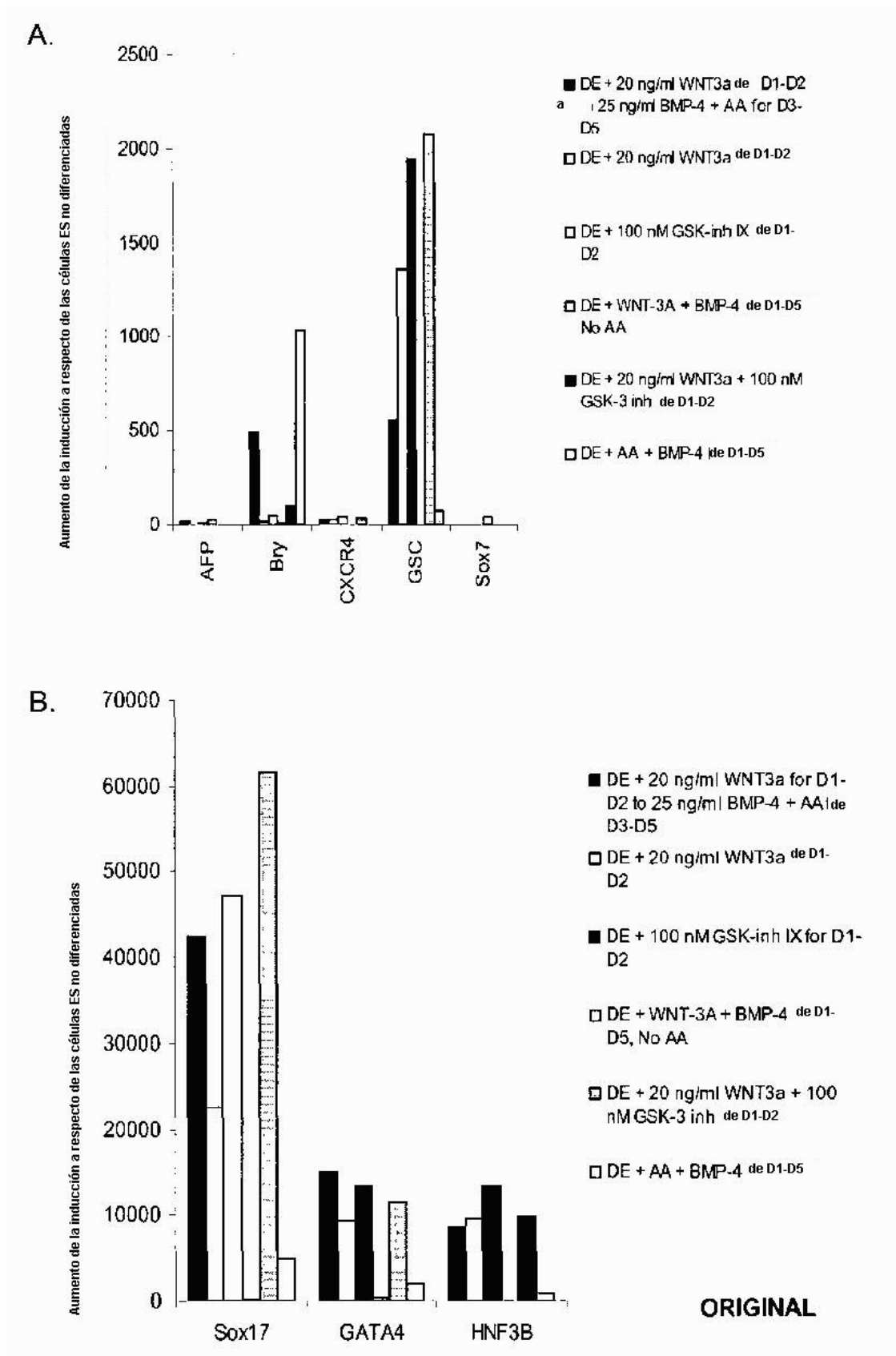
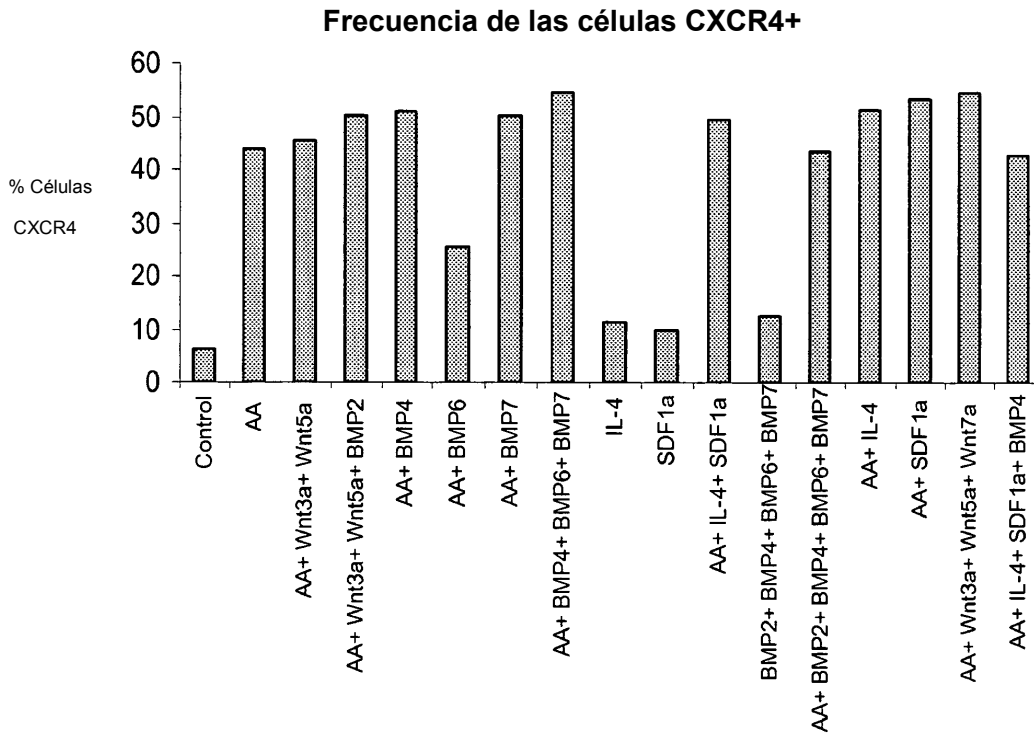


Figura 37.

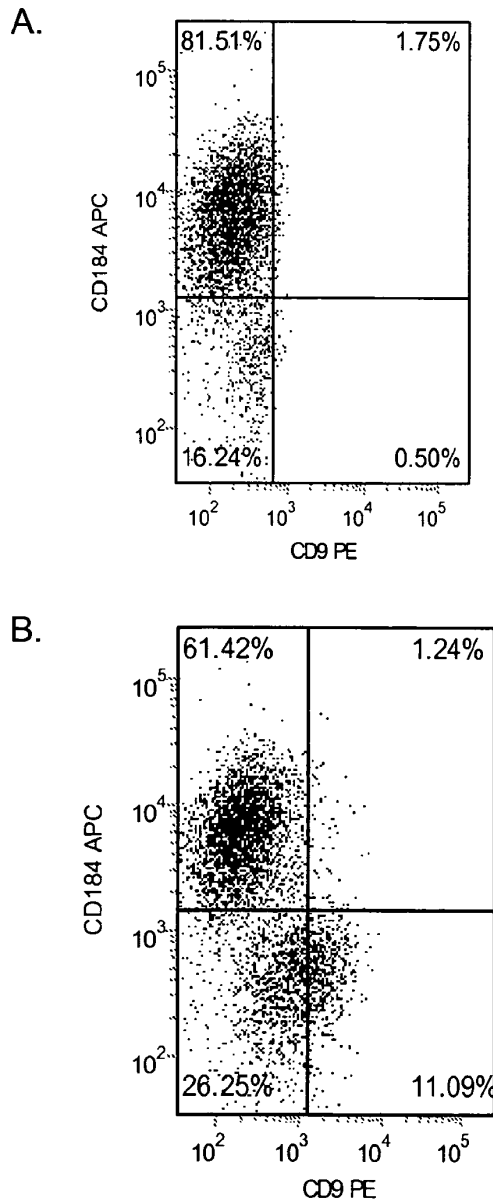
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 38.

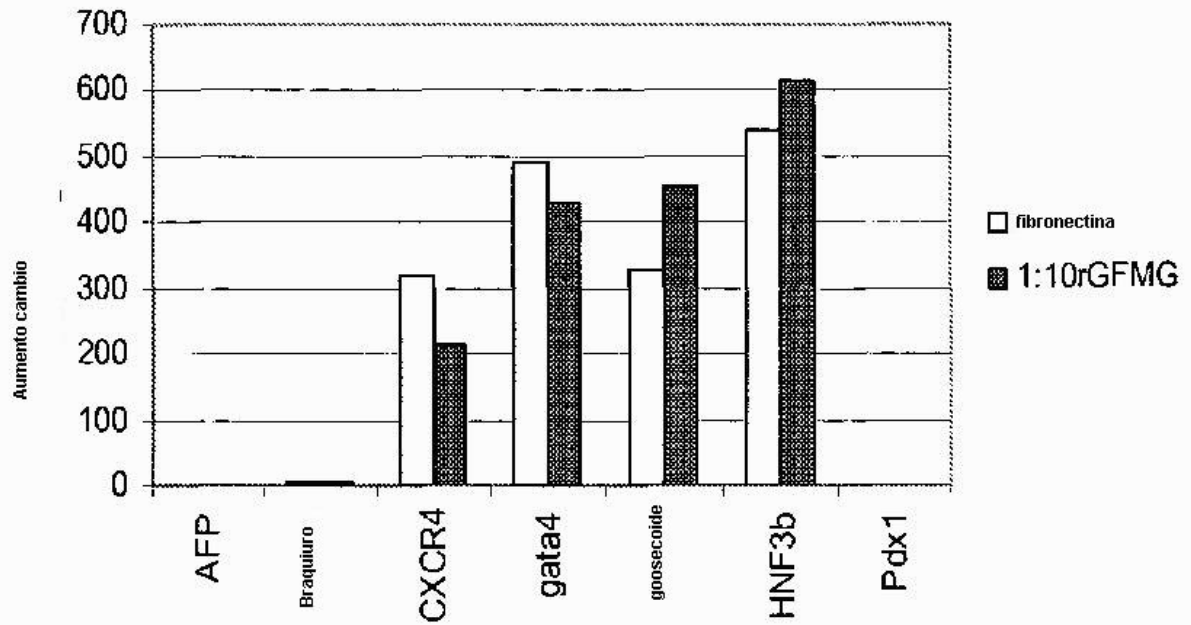
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 39.

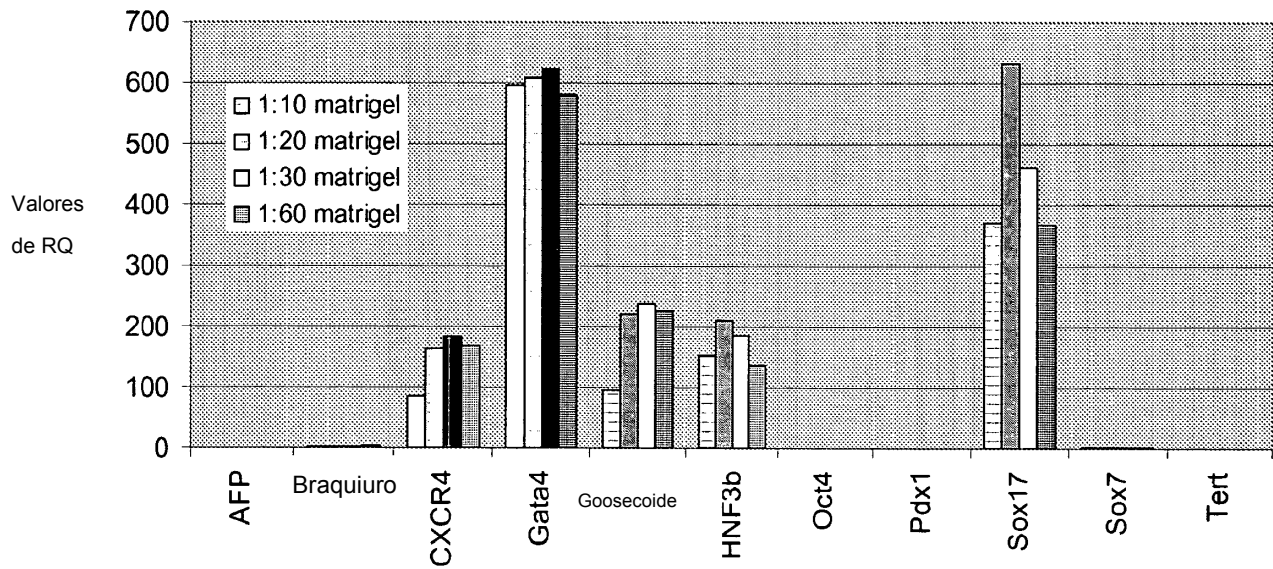
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 40.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 41-1.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

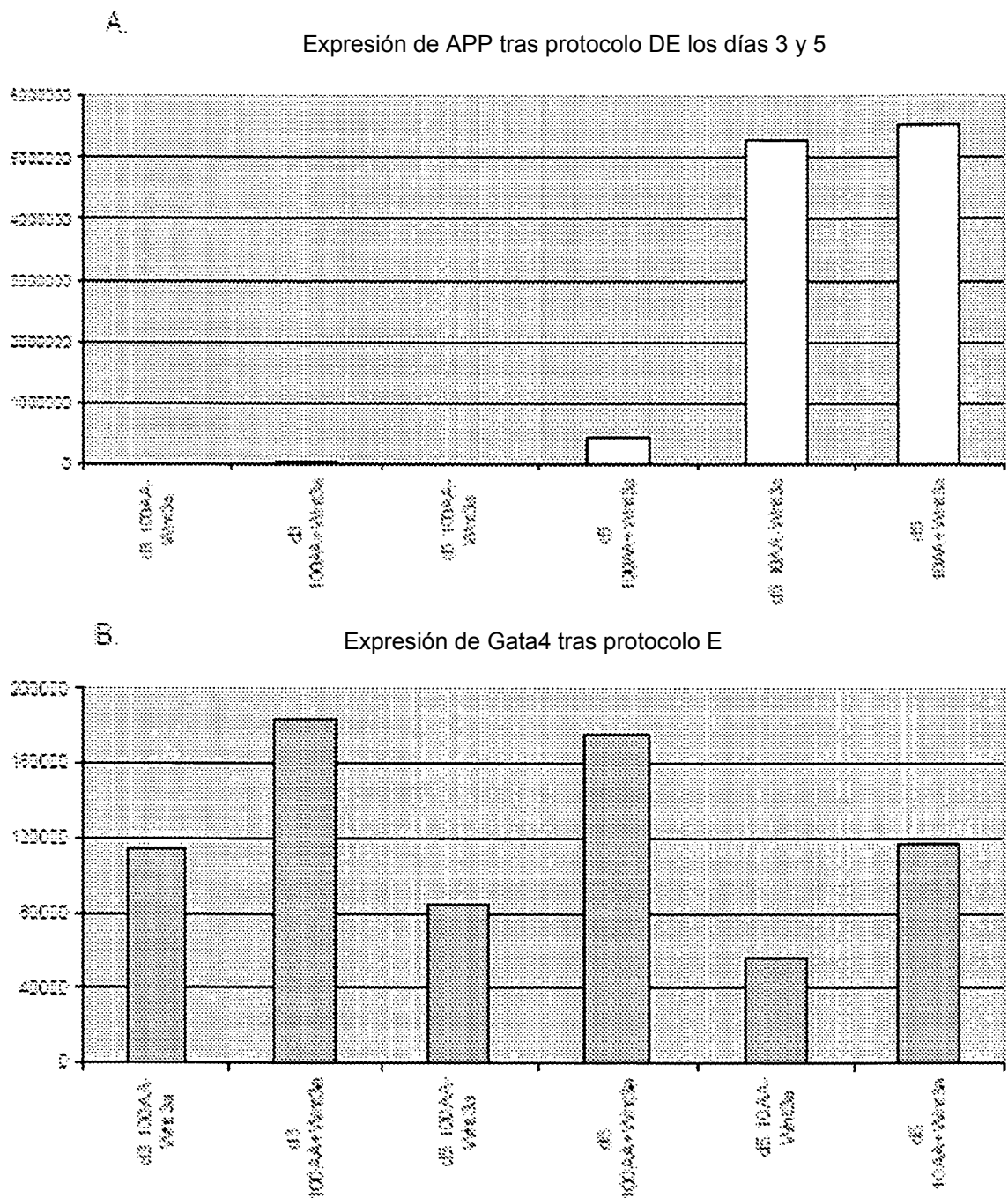


Figura 41-2.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

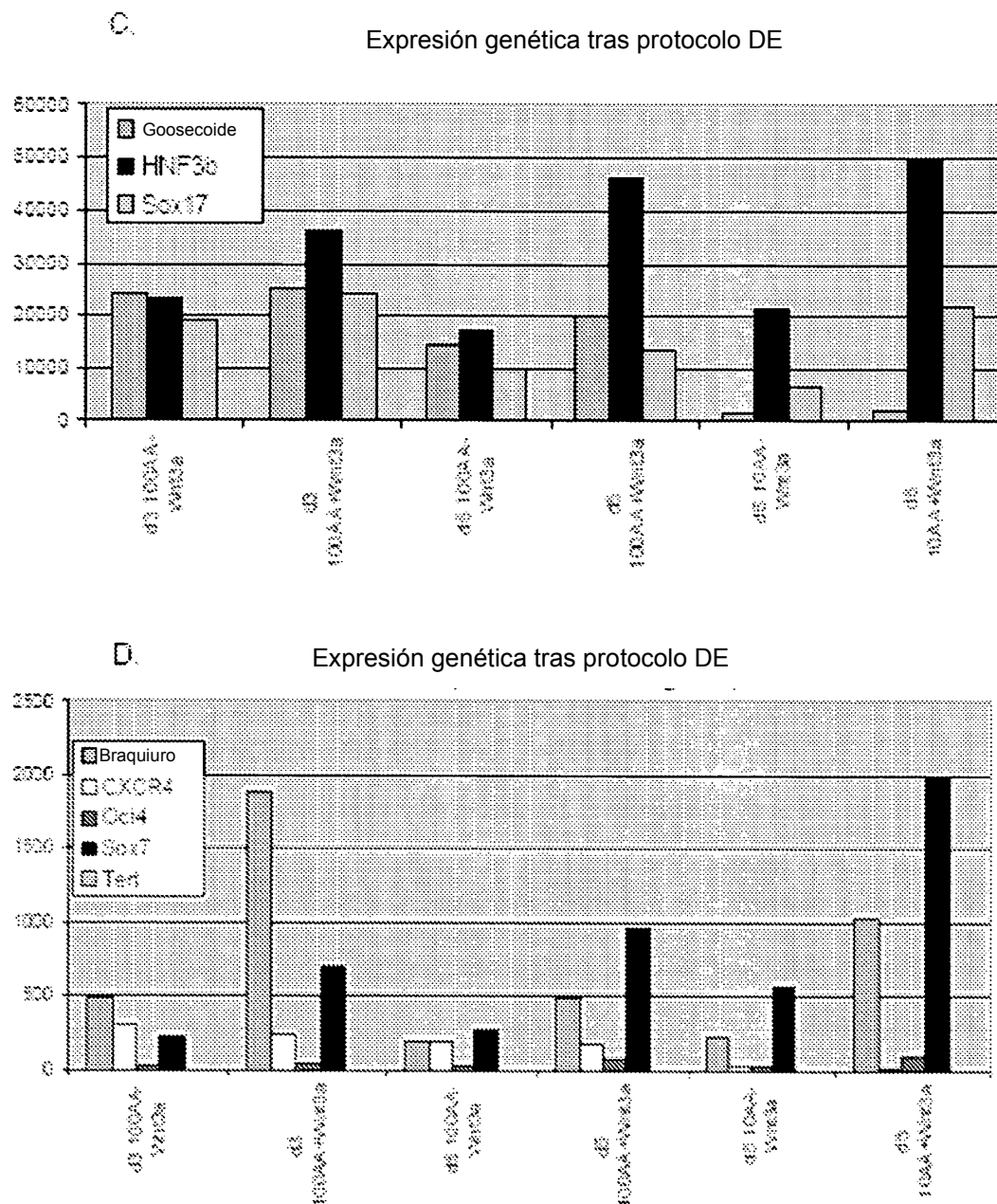


Figura 41-3.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

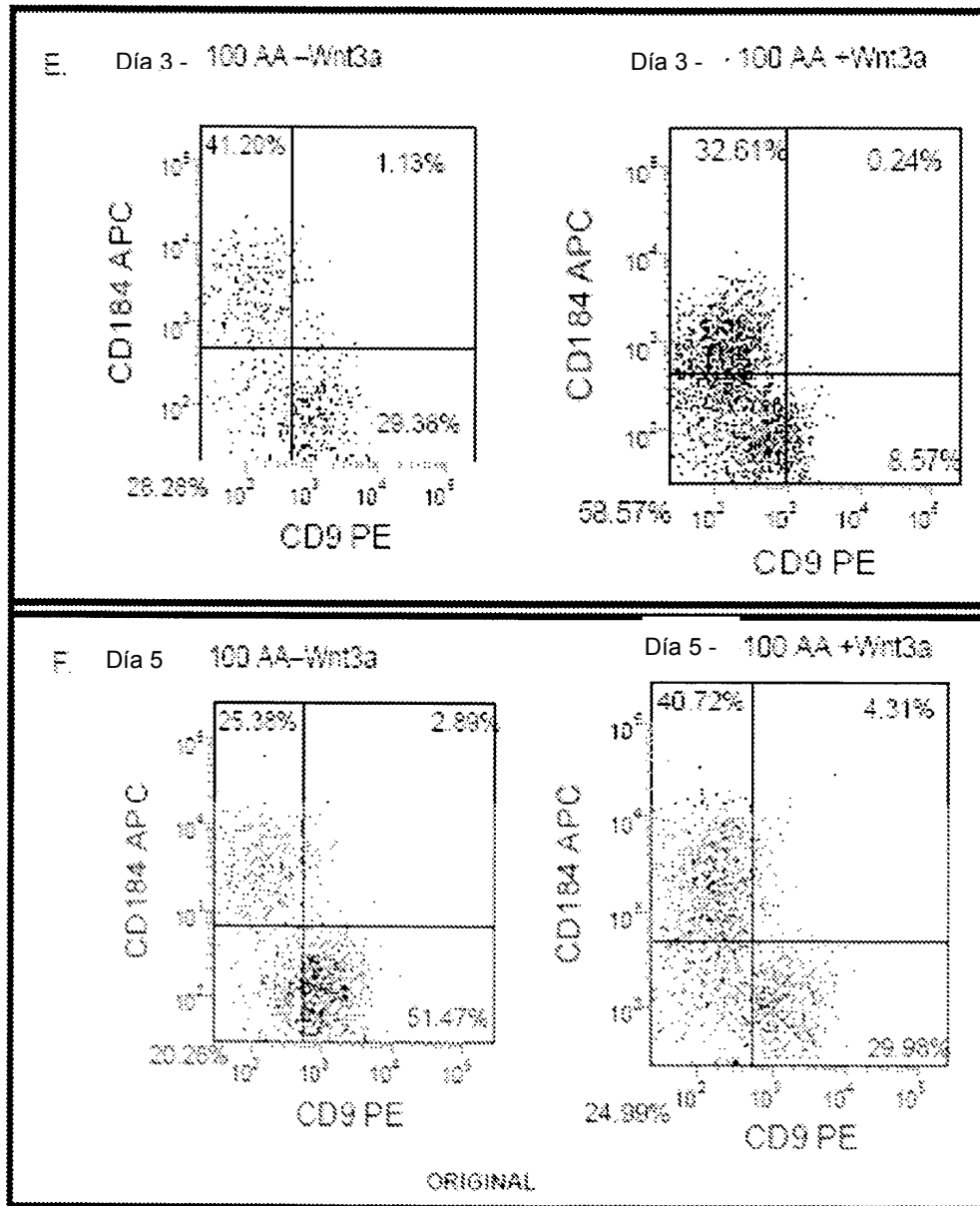


Figura 41-4.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

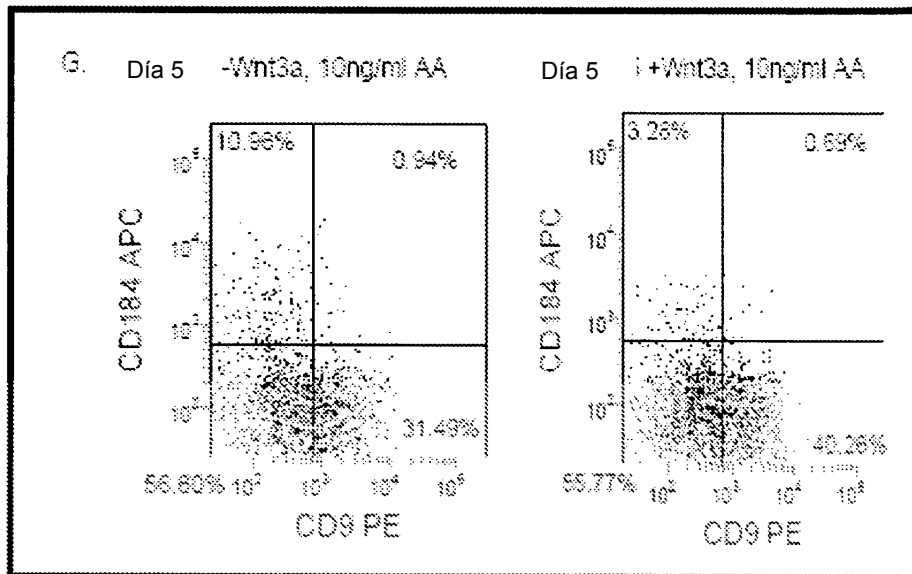
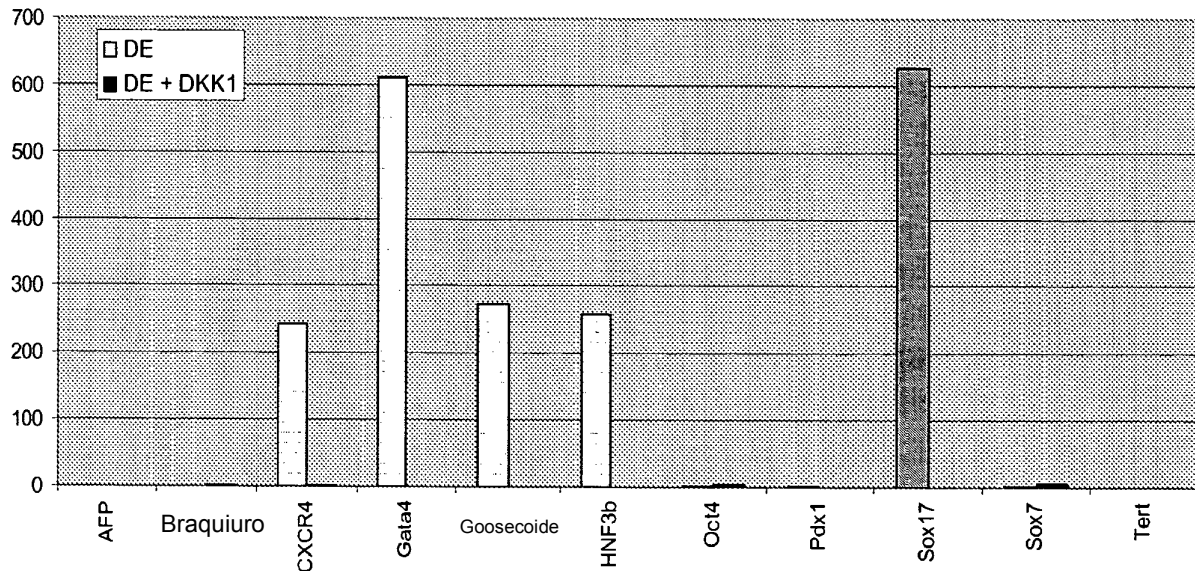


Figura 42.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

Expresión genética de células tratadas con protocolo DE



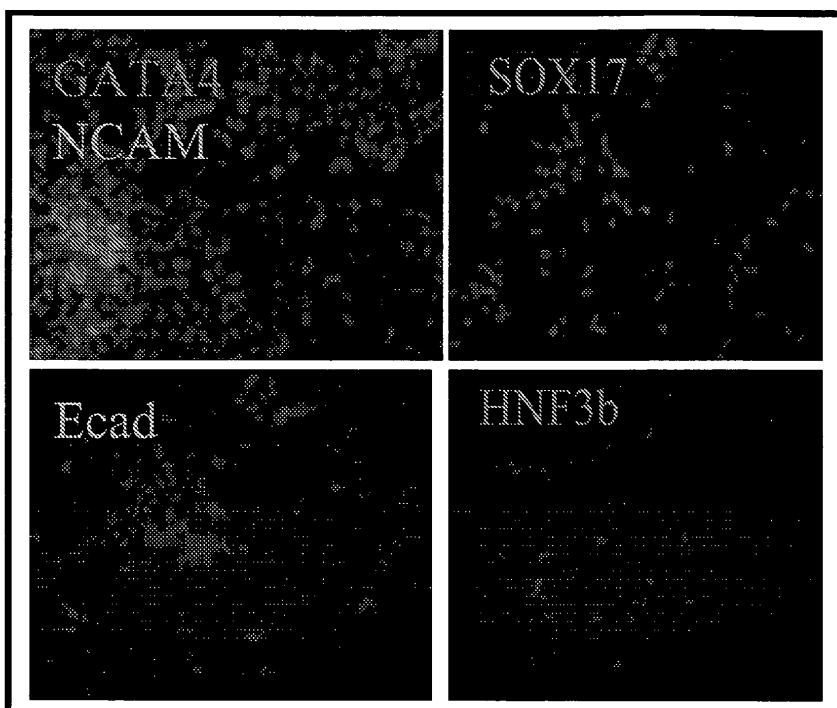
ORIGINAL

Figura 43.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

ORIGINAL

A.



B.

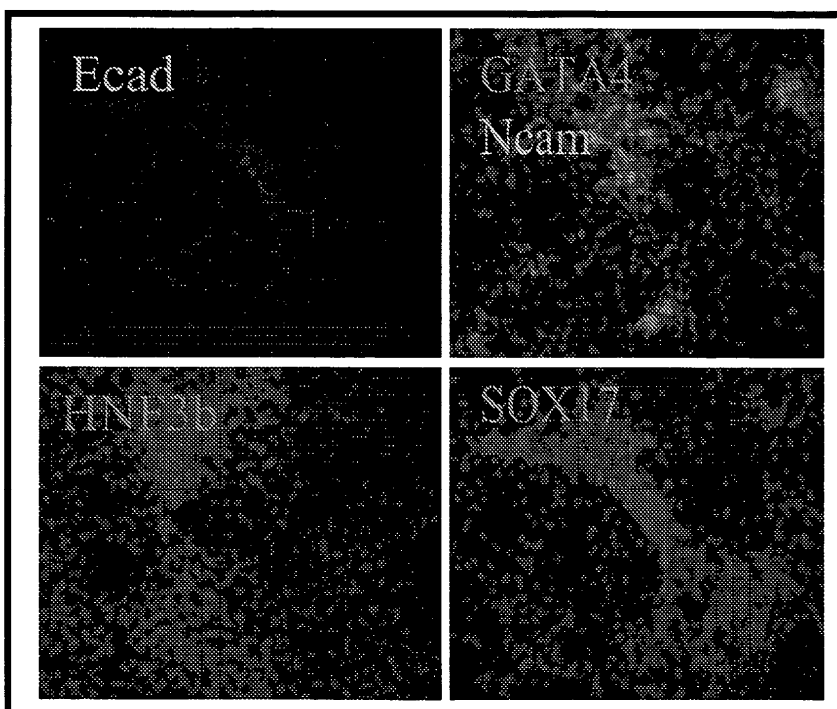


Figura 44.

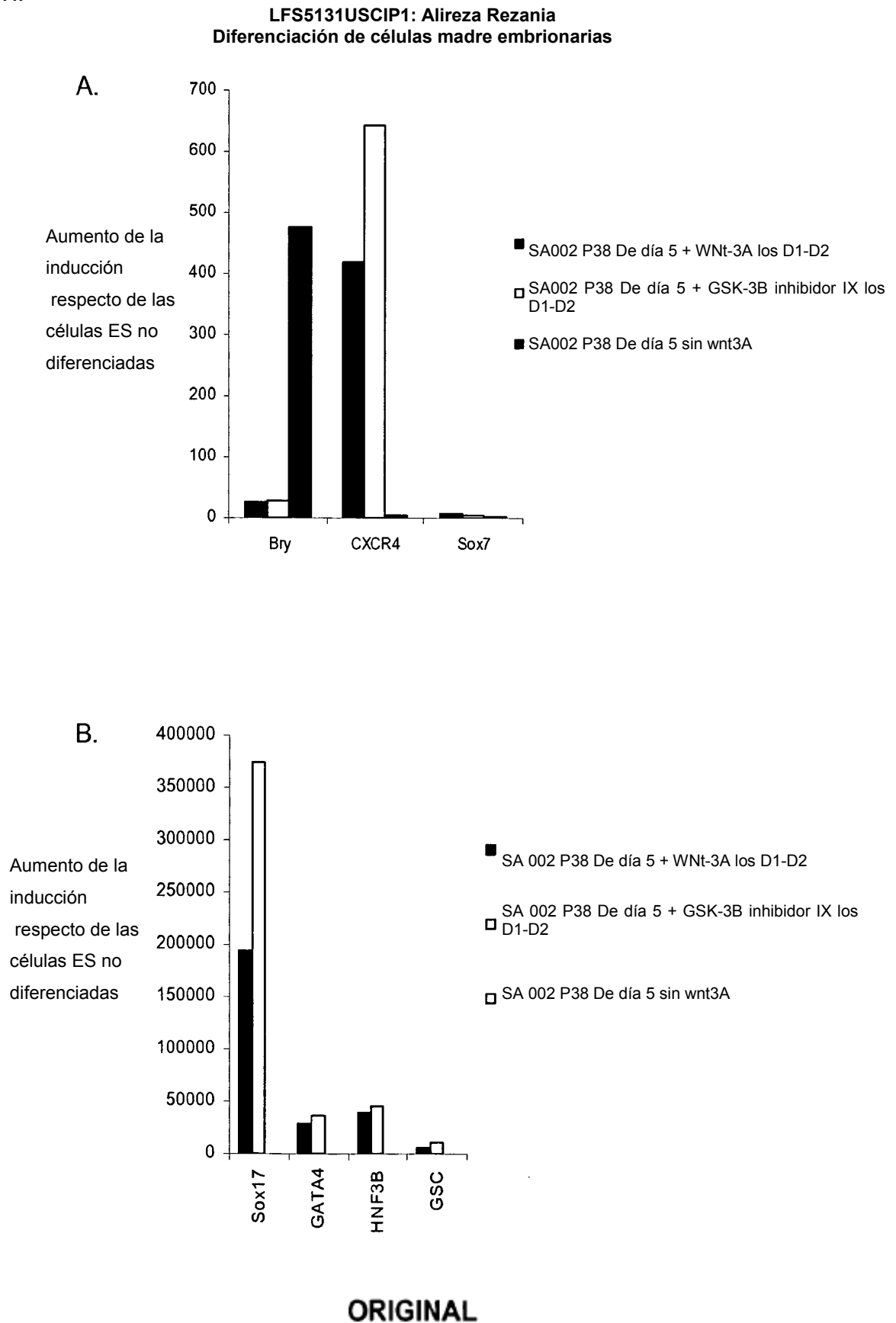
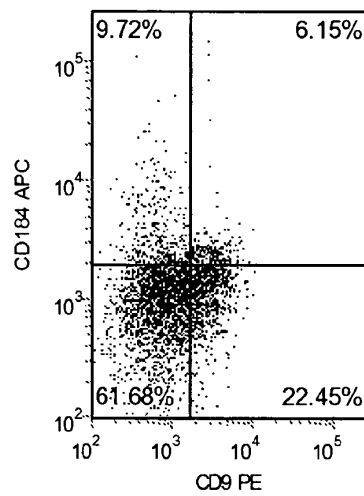


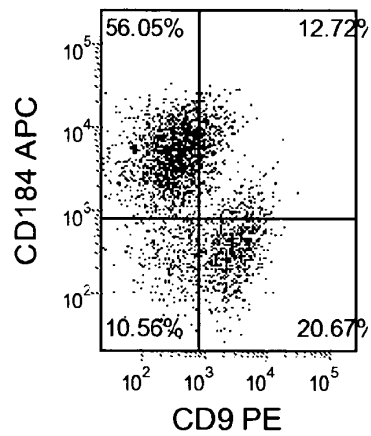
Figura 45.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

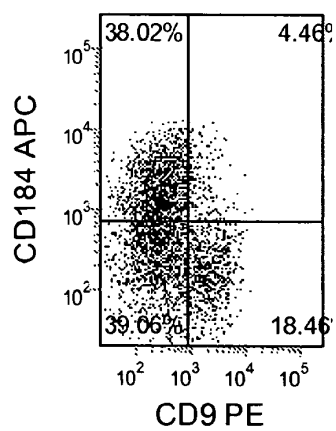
A.



B.



C.

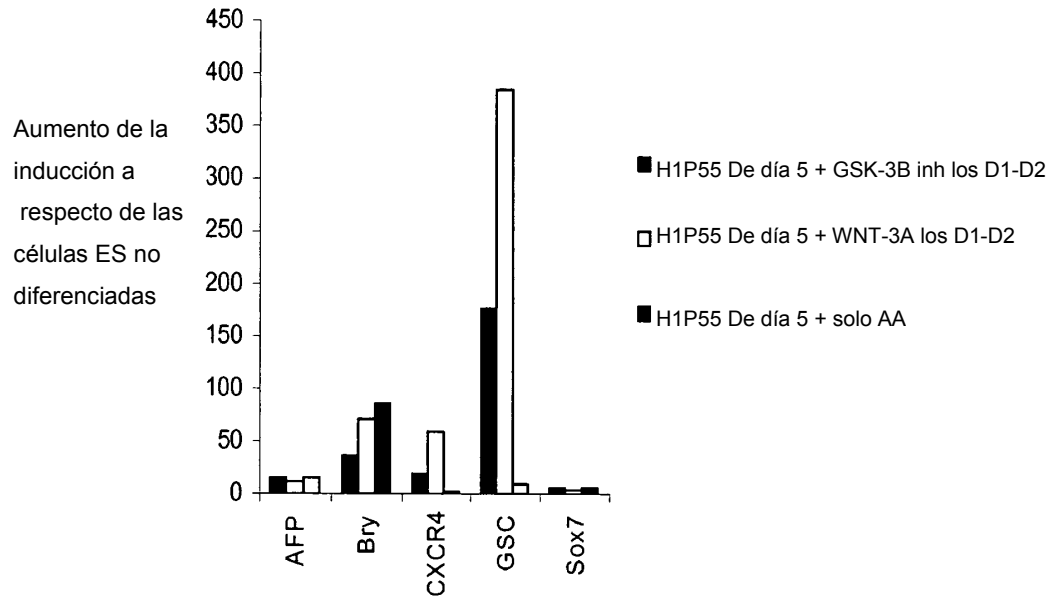


ORIGINAL

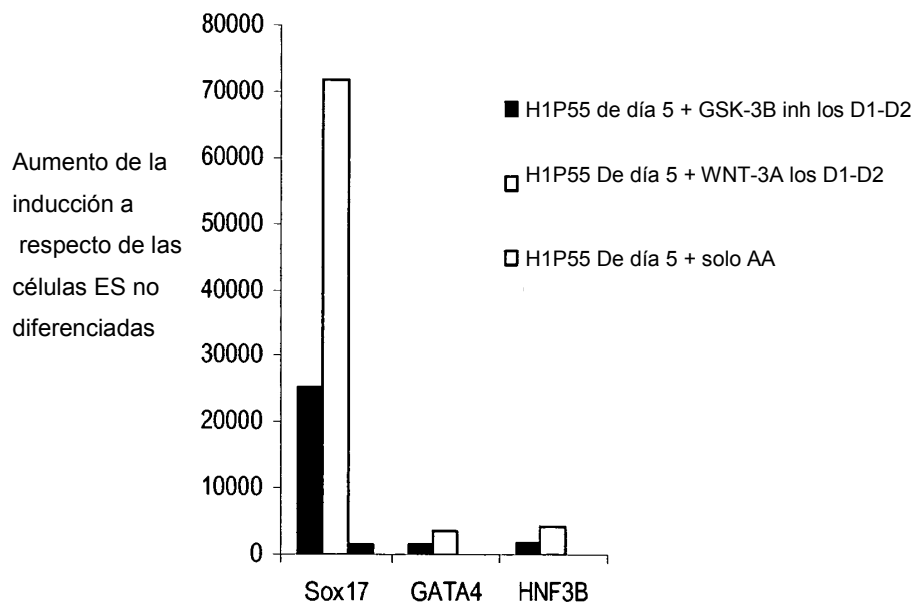
Figura 46.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

A. Formación de DE en placas recubiertas de suero hu



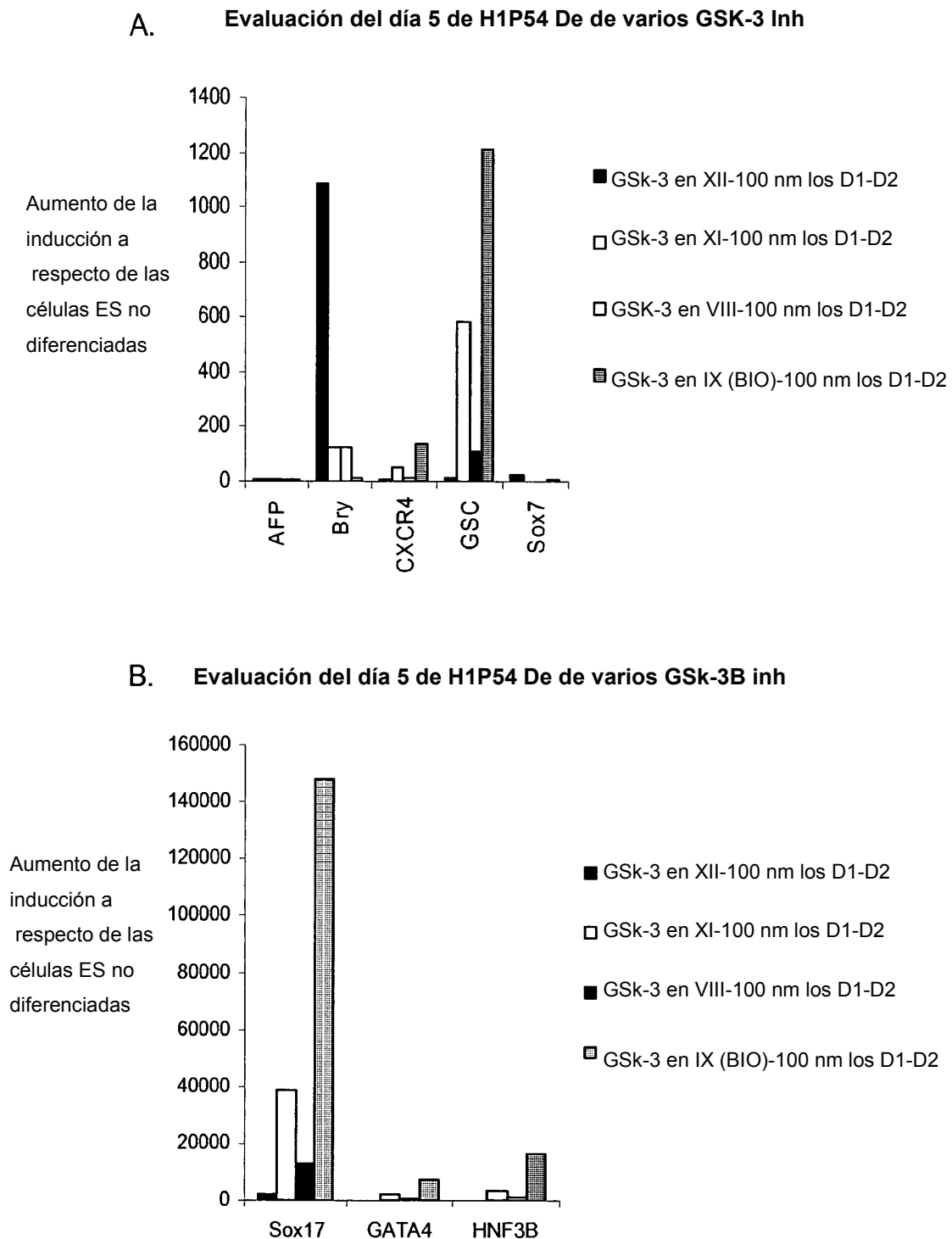
B. Formación de DE en placas recubiertas de suero hu



ORIGINAL

Figura 47.

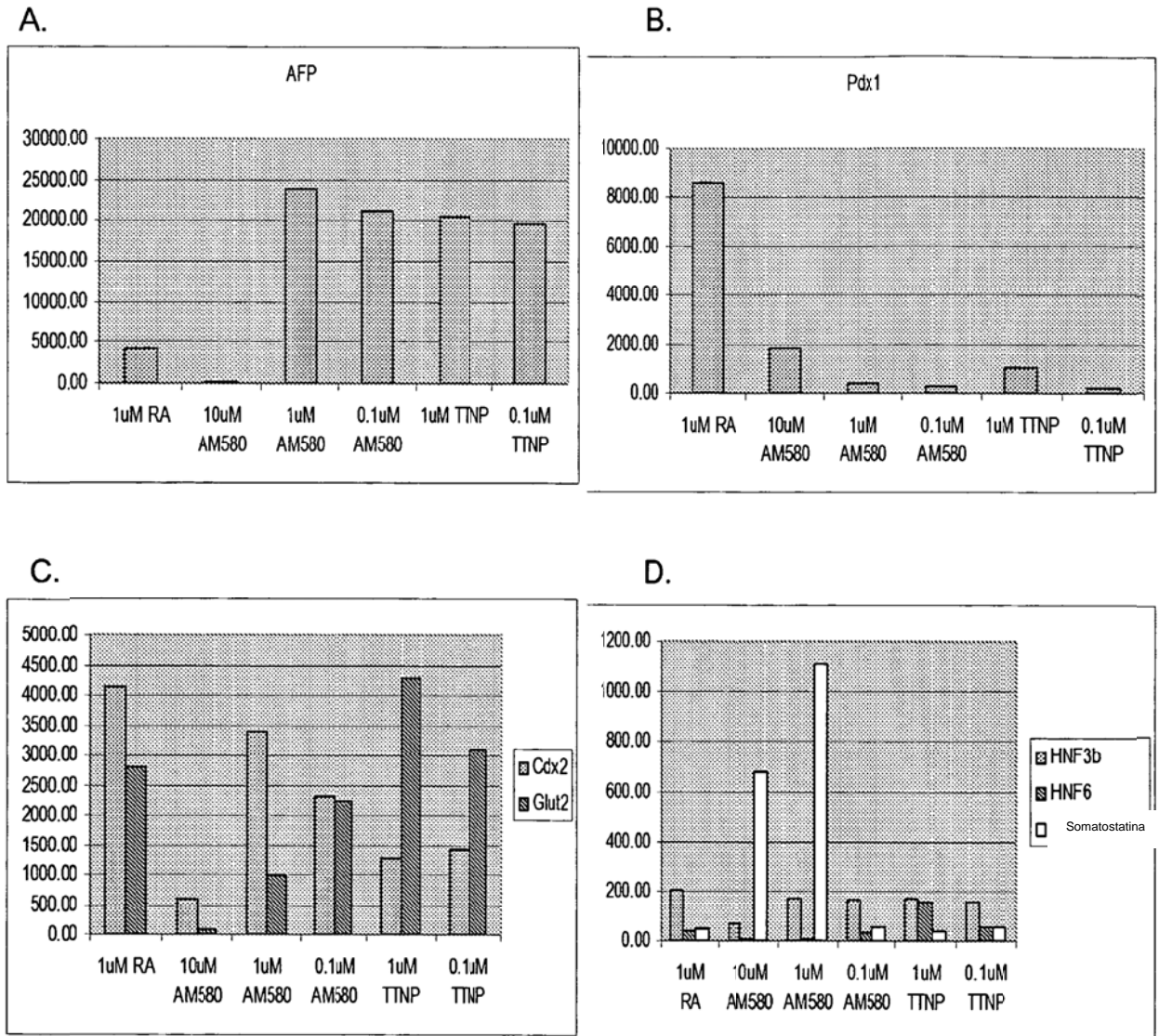
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 48.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezanian
Diferenciación de células madre embrionarias

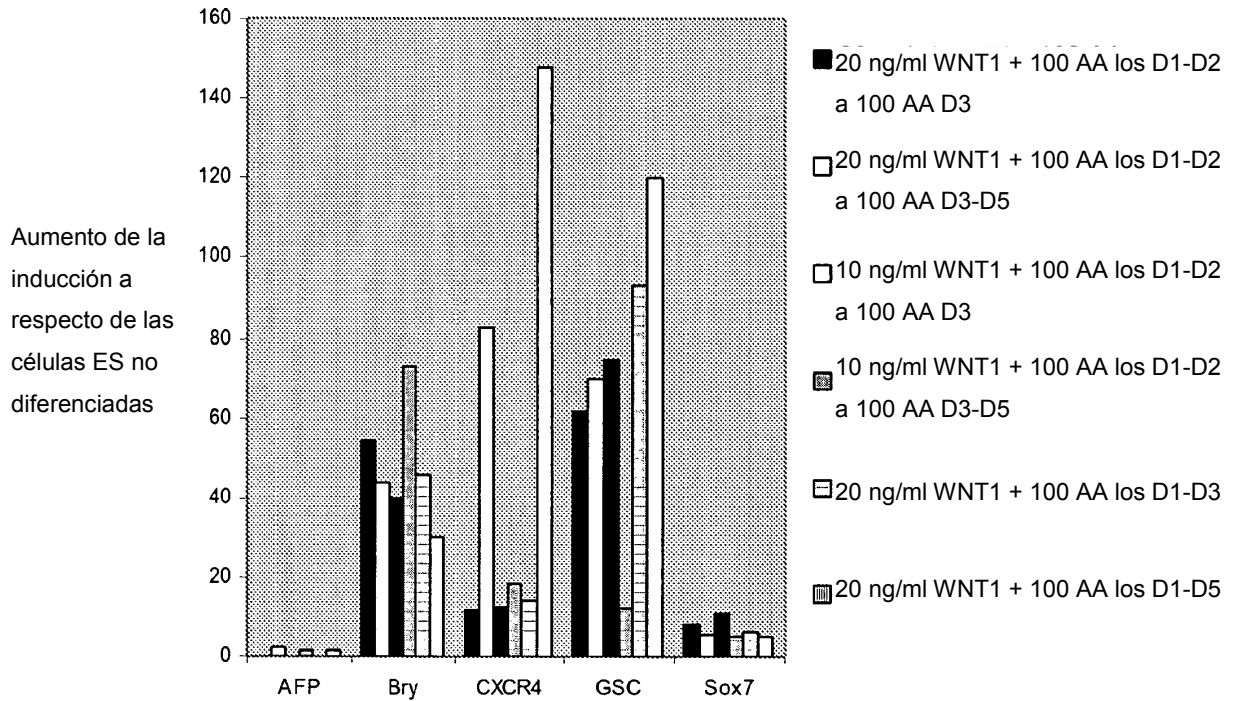


ORIGINAL

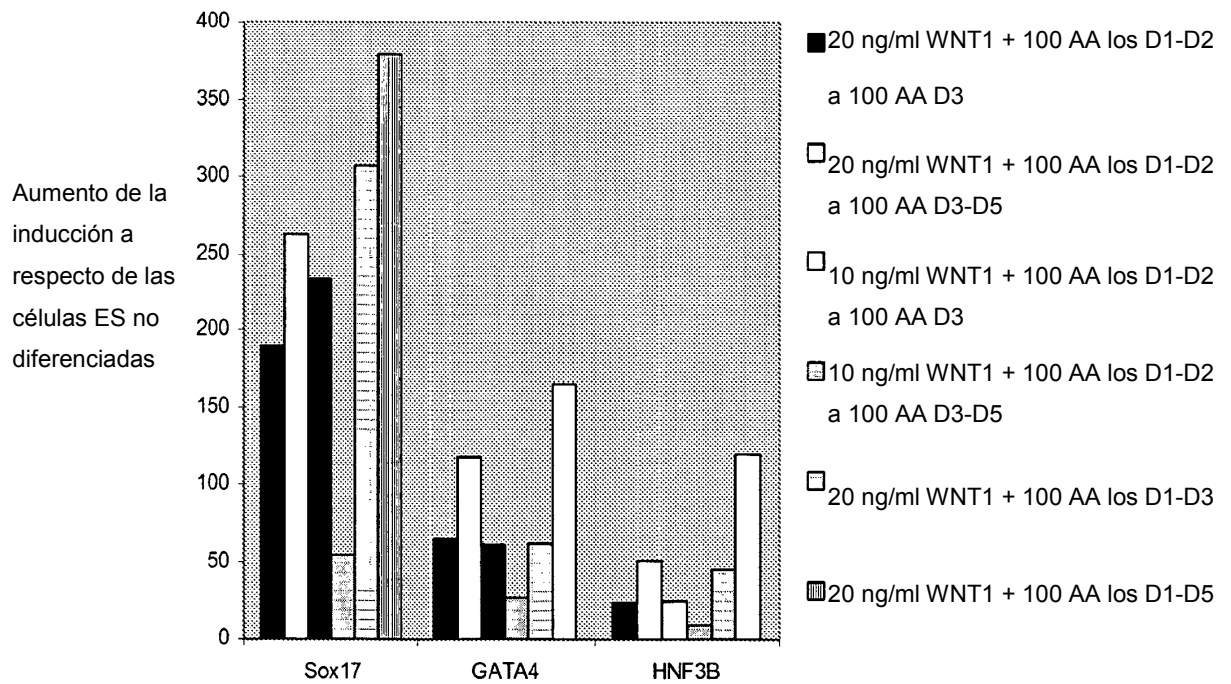
Figura 49.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

A.



B.



ORIGINAL

Figura 50.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

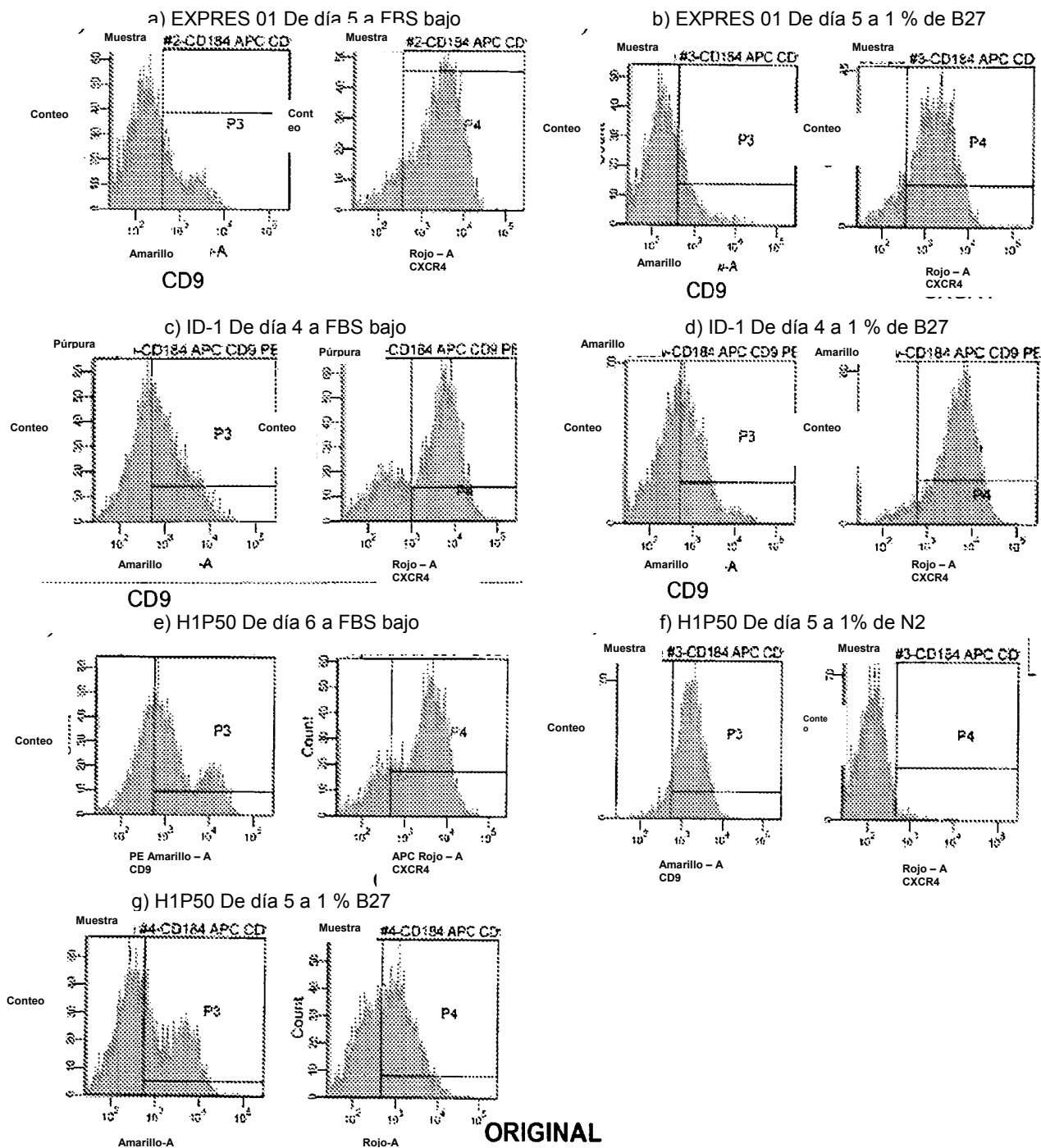
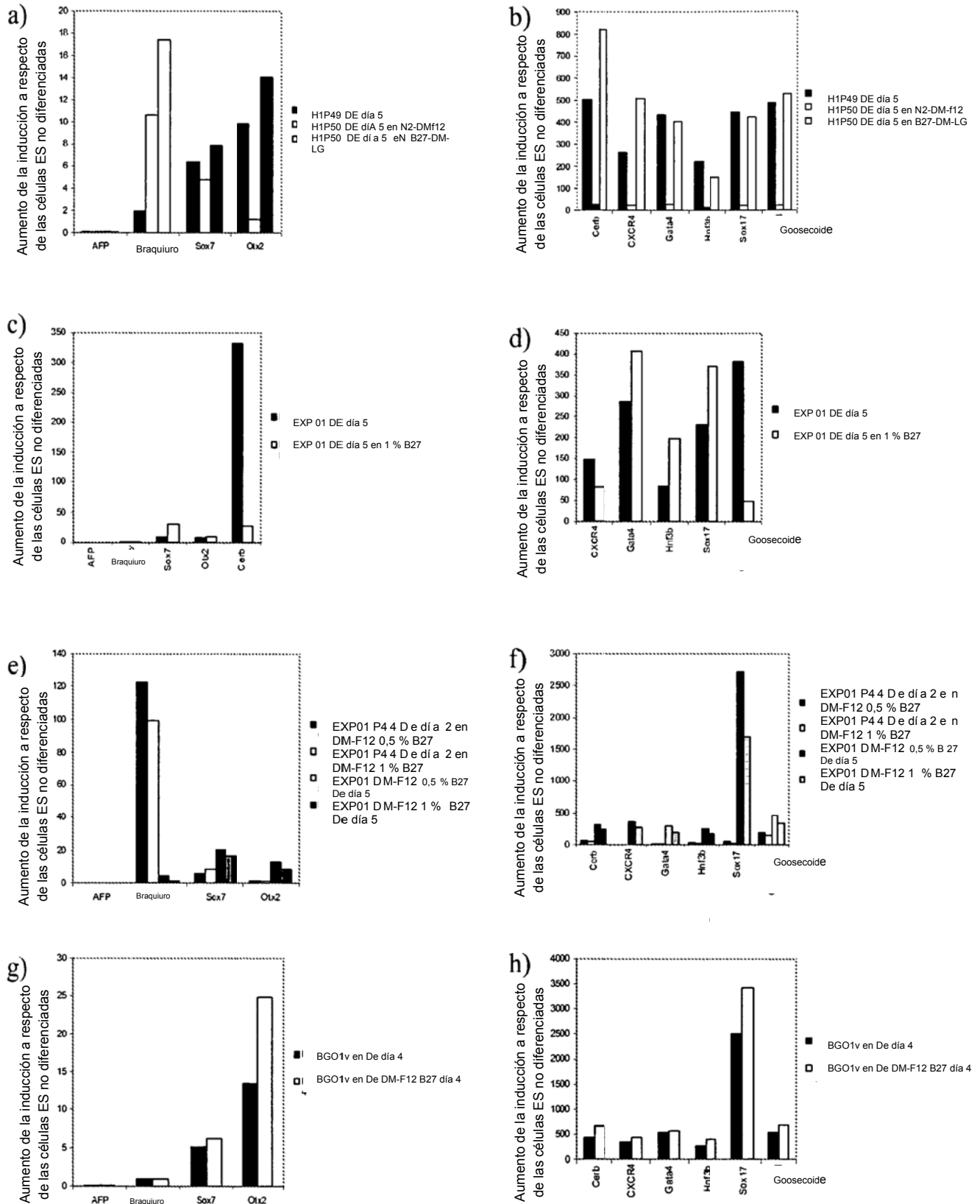


Figura 51.
LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 52.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

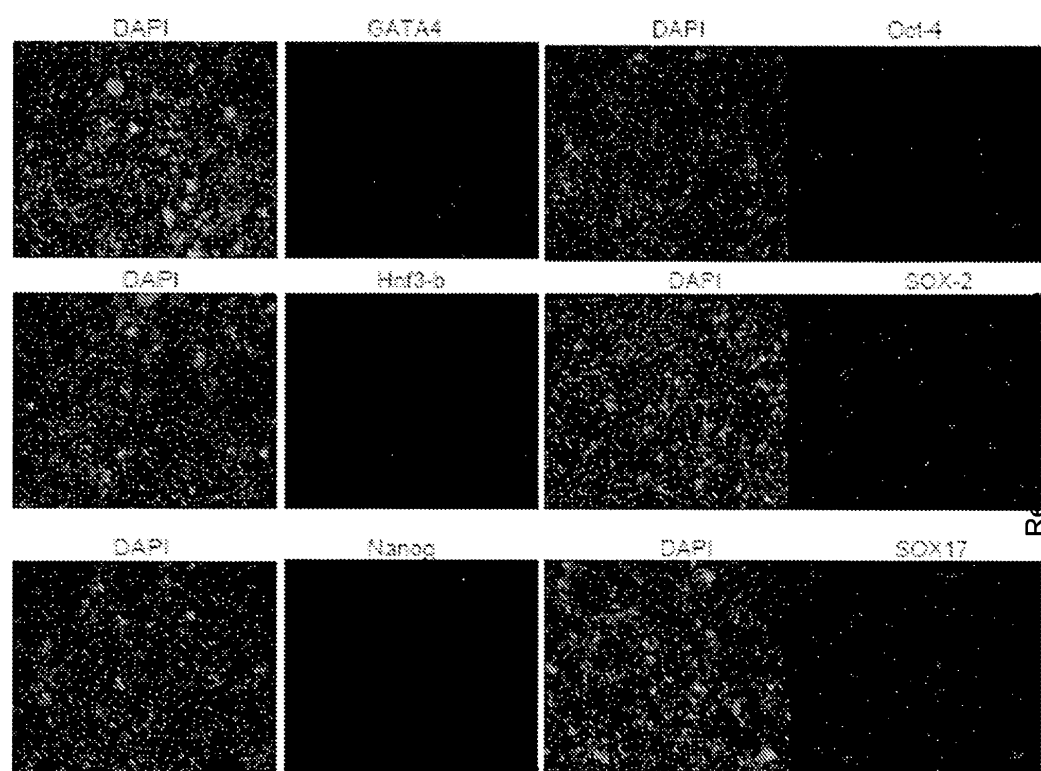
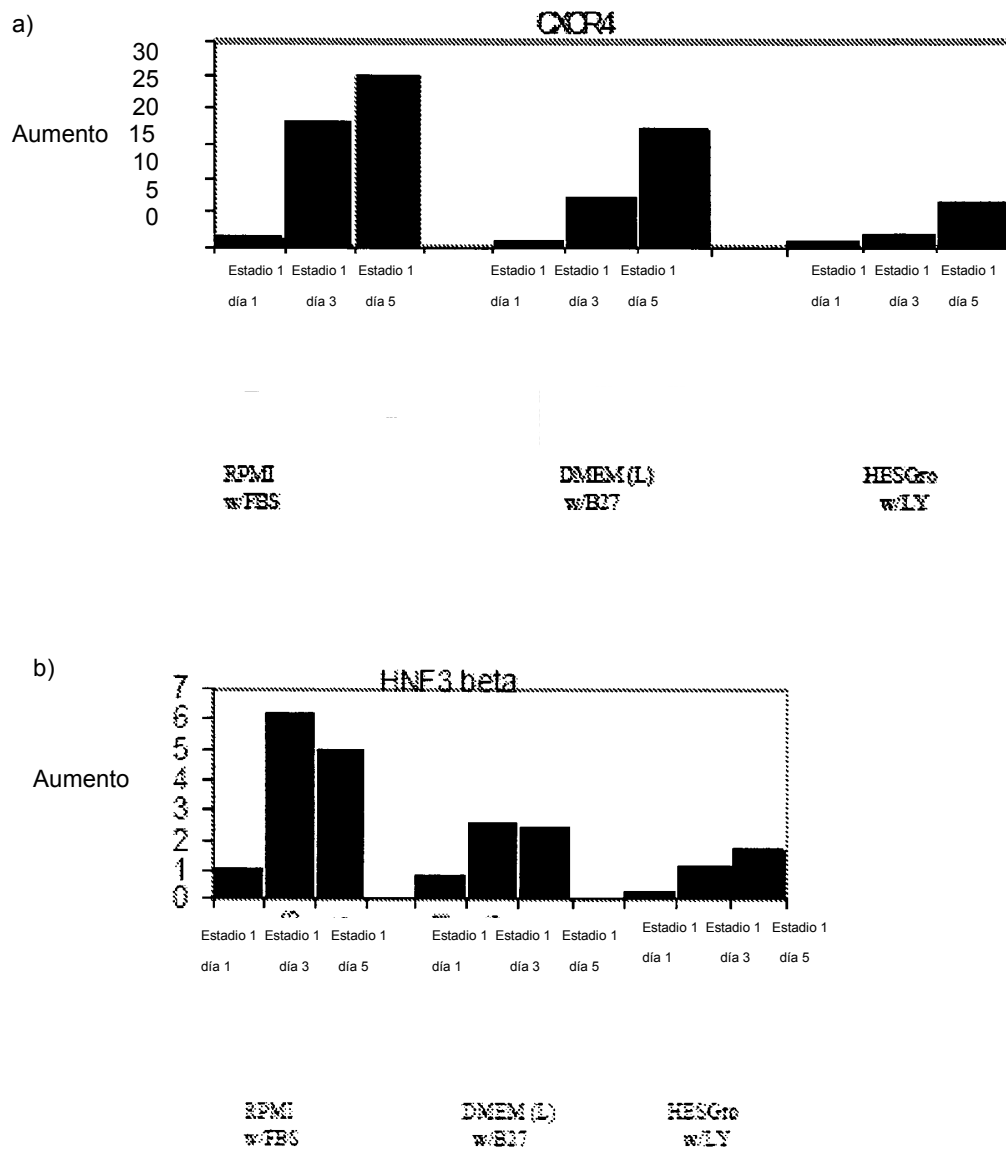


Figura 53-1.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias



ORIGINAL

Figura 53-2.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

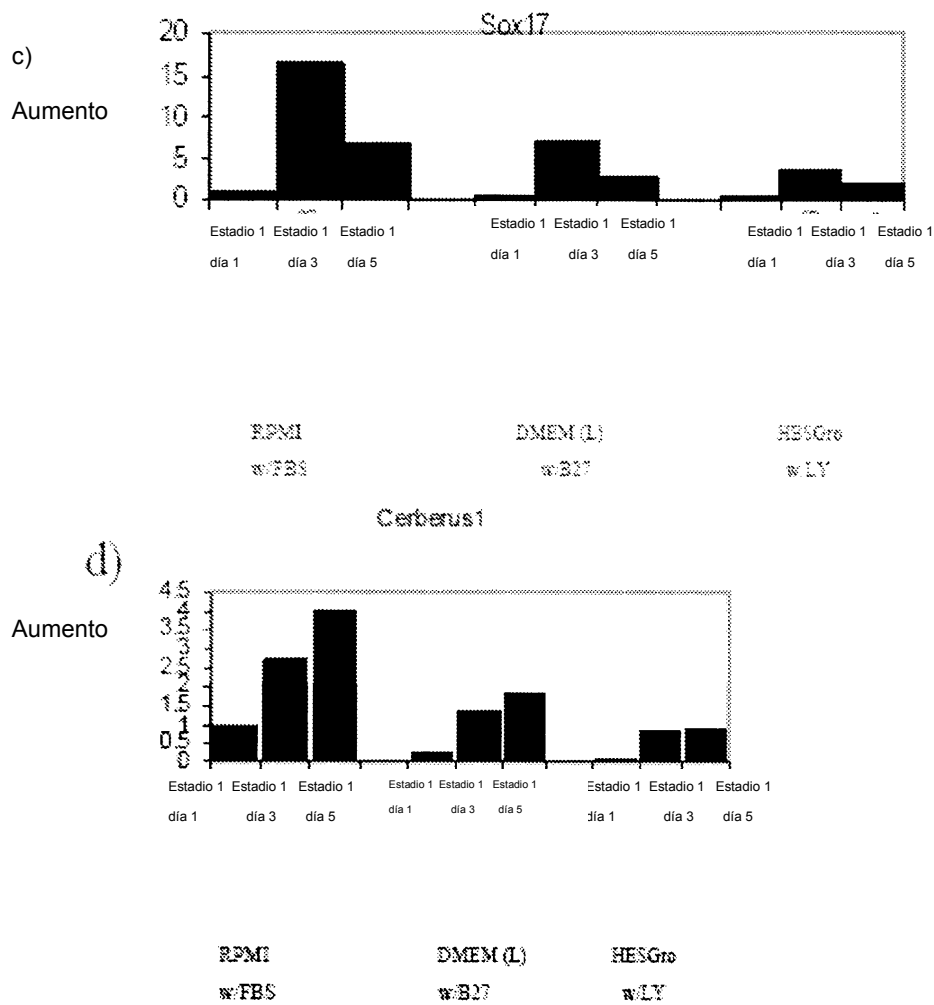


Figura 53-3.

LFS5131USCIP1: Alireza Rezania
Diferenciación de células madre embrionarias

