

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 015**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2007** **E 07869063 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2101747**

54 Título: **Estrategia de quimioprevención del cáncer basada en la pérdida de la impronta de IGF2**

30 Prioridad:

08.12.2006 US 873830 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2015

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)
3400 N. Charles Street

Baltimore, MD 21218, US y

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)

72 Inventor/es:

FEINBERG, ANDREW P.;

LEVCHENKO, ANDRE;

LONGO, DAN L. y

KO, MINORU S.H.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 543 015 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

Estrategia de quimioprevención del cáncer basada en la pérdida de la impronta de IGF2

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere generalmente al cáncer y, más específicamente, a métodos de quimioprevención del desarrollo de tumores mediante la inhibición de las vías de señales asociados con la pérdida de la impronta (LOI - Loss Of Imprinting) del gen del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2).

INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

- 10 La impronta genómica es una modificación epigenética en el gameto o cigoto que conduce al silenciamiento relativo de un alelo parental específico en las células somáticas de la descendencia. La pérdida de la impronta (LOI) del gen del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF2) se define como la expresión aberrante del alelo heredado de la madre normalmente silencioso, que se ha encontrado que está asociada con un aumento de cinco veces la frecuencia de la neoplasia intestinal en los seres humanos y un aumento de la frecuencia de cinco veces de los familiares de primer grado con cáncer colorrectal (CRC - ColoRectal Cancer), lo que sugiere que la LOI de IGF2
- 15 contribuye sustancialmente en la población de riesgo de CRC. Previamente, se desarrolló un modelo de epigenética-genética combinado de neoplasia intestinal, cruzando ratones hembras con una delección de la región diferencialmente metilada (DMR - Differentially Methylated Region) de *H19* así como *H19* propiamente dicho, con ratones machos que albergan una mutación en el gen poliposis adenomatosa coli (*Apc* - Adenomatous polyposis coli) (ratones Min). La transmisión materna de la delección DMR conduce a la activación aberrante del alelo materno
- 20 *Igf2* y LOI, a un aumento de la expresión de dos veces de IGF2 en el intestino y a un aumento de 1,8 a 2,5 veces en la frecuencia de adenomas intestinales en heterocigotos dobles Min LOI(+). La LOI conduce a un aumento en el compartimiento de células progenitoras (cripta) y a una tinción incrementada con marcadores de células progenitoras. Sin embargo, el mecanismo de una tumorigénesis incrementada puede implicar una proliferación incrementada, una apoptosis disminuida o un programa de maduración alterada en la cripta, y no se observaron
- 25 diferencias utilizando la proliferación o inmunotinciones específicas para la apoptosis en ese modelo de ratón que pudieran aclarar el mecanismo. Además, no está claro que el propio IGF2 sea el responsable de la tumorigénesis incrementada, ya que, alternativamente, podría reflejar otra alteración epigenética, ya sea de *H19* en el locus, o incluso a través de trans-efectos que se han observado entre la DMR de *H19* y loci en otros cromosomas.

- 30 IGF2 es un importante factor de crecimiento autocrino y paracrino en el desarrollo y el cáncer, principalmente a través de la señalización del receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R), un receptor tirosina quinasa de transmembrana. La activación de IGF1R conduce a la autofosforilación del receptor y la activación de cascadas de señalización, incluyendo el IRS-1/PI3K/AKT y vías GRB2/Ras/ERK. IGF2 se sobre-expresa en una amplia diversidad de tumores malignos, incluyendo el CRC.

- 35 Sin embargo, sigue siendo enigmático cómo la LOI puede conducir a cáncer. Además de la cuestión de la especificidad de la LOI para la cascada de señalización de IGF2 a diferencia de otros efectos epigenéticos cis o trans asociados con la LOI, no está claro cómo una simple duplicación de la dosis de IGF2, especialmente en los relativamente bajos niveles de expresión encontrado en colon normal, podría conducir a un riesgo incrementado de tumores. Al mismo tiempo, si pudiera establecerse un enlace mecánico de este tipo, éste abriría la posibilidad de una quimioprevención similar al uso de estatinas para reducir el riesgo cardiovascular. Esto se debe a un estado
- 40 epigenético en el tejido normal que aumenta el riesgo de cáncer que, en teoría, podría ser invertido, reduciendo el riesgo de tumores malignos, incluso antes de que surjan neoplasias.

COMPENDIO DE LA INVENCION

- 45 La presente invención se refiere a genes LOI y a sus productos génicos en tejidos pre-malignos, en que se pueden utilizar métodos de inhibición esos productos génicos de LOI para prevenir el desarrollo de tumores en sujetos en riesgo de desarrollar cáncer. La presente invención se refiere también a métodos de identificar un riesgo incrementado en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer en un sujeto, incluyendo métodos de evaluar la eficacia de un régimen quimioterapéutico para ese sujeto. Además, la presente invención se refiere a métodos para identificar agentes anti-neoplásicos.

- 50 En una realización, se describe un método para prevenir el desarrollo de tumores en un sujeto que incluye la administrar un inhibidor de la activación de la vía de señales por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2), en el que el sujeto expresa de forma aberrante IGF2 debido a la pérdida de impronta.

En un aspecto, el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (CRC), en comparación con un sujeto que no tiene la LOI en IGF2. En otro aspecto, el inhibidor se selecciona del grupo consistente en una tirfostina, una pirrolo[2,3-d]-pirimidina, un anticuerpo monoclonal, y una combinación de los mismos. En un aspecto relacionado, la pirrolo[2,3-d]-pirimidina es NVP-AEW541.

5 En otro aspecto, el método para prevenir el desarrollo de tumores incluye, además, la administración de un agente quimioterapéutico, incluyendo, pero no limitado a aclacinomicinas, actinomicinas, adriamicinas, ancitabinas, antramycin, azacitidinas, azaserinas, 6-azauridinas, bisantrenos, bleomicinas, cactinomicinas, carmofurs, carmustinas, carubicinas, carzinofilinas, cromomicinas, cisplatinos, cladribinas, citarabinas, dactinomicinas, daunorubicinas, denopterinas, 6-diazo-5-oxo-L-norleucinas, doxifluridinas, doxorubicinas, edatrexatos, emitefurs, 10 enocitabinas, feprirubicinas, fludarabinas, fluorouracilos, gemcitabinas, idarubicinas, loxuridinas, menogariles, 6-mercaptopurinas, metotrexatos, mitramicinas, mitomicinas, ácidos micofenólicos, nogalamycin, olivomicinas, peplomycin, pirarubicinas, piritreximas, plicamicinas, porfiromycin, pteropterinas, puromycin, ácidos retinoicos, estreptonigrinas, estreptozocinas, tagafurs, tamoxifenos, tiamiprin, tioguaninas, triamcinolonas, trimetrexatos, tubercidina, vinblastinas, vincristinas, zinostatinas y zorubicinas.

15 En un aspecto, el inhibidor previene la formación de focos de criptas aberrantes (ACF - Aberrant Crypt Foci).

En otra realización, se describe un método de identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal en un sujeto, que incluye poner en contacto una célula progenitora en una muestra de un sujeto con el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) y determinar la sensibilidad de la célula al IGF2 según se determina midiendo un cambio en una vía de señales asociada con la replicación del ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo 20 celular, la apoptosis y la proliferación celular, o midiendo un cambio en la expresión génica, los niveles de proteínas, la modificación de proteínas o cinética de la modificación de proteínas, en donde un aumento de la sensibilidad de las células progenitoras a IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal.

En un aspecto, el método incluye determinar los cambios en la expresión génica entre células progenitoras LOI positivas (LOI (+)) y LOI negativas (LOI (-)), en que las células progenitoras están asociados con el cáncer colorrectal, identificar genes que se sobre-expresan en las células progenitoras LOI (+), poner en contacto células LOI (+) y LOI (-) con un agente mutagénico, poner en contacto las células con un ligando que se expresa de forma aberrante debido a la pérdida de impronta (LOI) del gen que codifica el ligando en presencia y ausencia de un 25 agente de ensayo. En otro aspecto, la vía de señales es IRS-1/PI3K/AKT o GRB2/Ras/ERK. En un aspecto relacionado, el método incluye determinar la cinética de modificación de una AKT o ERK. En un aspecto adicional relacionado, la modificación de AKT o ERK es la fosforilación.

En otro aspecto, la medición de los cambios en la expresión génica, los niveles de proteínas, la modificación de proteínas o la cinética de la modificación de proteínas puede llevarse a cabo mediante el control de esos cambios en los genes según se recoge en las Tablas 3 y 5-7. En un aspecto relacionado, los genes tal como se exponen en las 35 Tablas 3 y 5-7 se pueden utilizar como un diagnóstico para determinar el riesgo. En otro aspecto, el método, según se describe, se puede utilizar en unión con métodos para el diagnóstico de cánceres, que incluyen pero no se limitan a la detección de antígenos/marcadores específicos para tumores, biopsia, cistoscopia, rayos X, escaneos por tomografías computarizadas, frotis de PAP, detección proteínas séricas y similares.

En un aspecto relacionado, el método de identificar un riesgo incrementado incluye poner en contacto la célula con IGF2 en presencia de un inhibidor del receptor de IGF1, en que una disminución adicional en la vía de activación de 40 señales en presencia del inhibidor se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal.

En un aspecto, el inhibidor es NVP-AEW541. En otro aspecto, la vía de señales es IRS-1/PI3K/AKT o GRB2/Ras/ERK. En un aspecto relacionado, la vía de señales se mide a través de la vía de activación de Akt/PKB.

En una realización, se describe un método para identificar un agente anti-neoplásico que incluye determinar cambios en la expresión génica entre células progenitoras LOI positivas (LOI (+)) y LOI negativas (LOI (-)), en que las células 45 progenitoras están asociadas con un trastorno neoplásico, identificar genes que son sobre-expresados en las células progenitoras LOI (+), poner en contacto células LOI + y LOI - con un agente mutagénico, poner en contacto con las células progenitoras LOI (+) con un ligando que es expresado de forma aberrante debido a la pérdida de impronta (LOI) del gen que codifica el ligando en presencia y ausencia de un agente de ensayo; en que el ligando está asociado con el trastorno neoplásico, y determinar la sensibilidad de las células LOI (+) y LOI (-) con el ligando en 50 presencia y ausencia del agente de ensayo, en que la sensibilidad se mide determinando cambios en una vía de señales asociada con la replicación de ADN, el metabolismo de ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular, en que una disminución en la sensibilidad de las células LOI (+) para el ligando es inversamente proporcional a la actividad anti-neoplásica del agente.

En un aspecto, el ligando es IGF2. En otro aspecto, el trastorno neoplásico es el cáncer. En un aspecto relacionado, el trastorno neoplásico es cáncer colorrectal (CRC).

En otro aspecto, el agente reduce la sensibilidad de la transducción de señales inducida por el ligando a través de un receptor afín para el ligando. En un aspecto, el agente mutagénico es un agente químico o físico.

- 5 En un aspecto, las células están contenidas en un chip de microfluidos. En otro aspecto, las células están contenidas en un animal no humano.

En otra realización, se describe un método para evaluar la eficacia de un régimen quimioterapéutico que incluye periódicamente aislar una célula progenitora en una muestra de un sujeto que recibe un agente quimioterapéutico, poner en contacto la célula progenitora en la muestra con el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 2 (IGF2) y determinar la sensibilidad de la célula progenitora a IGF2, en que la sensibilidad se mide mediante la determinación de cambios en una vía de señales asociada con la replicación del ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular, en que una reducción de la célula progenitora para formar focos de criptas aberrantes (ACF) se correlaciona con la eficacia del régimen.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 La Figura 1 es un histograma que ilustra la validación de la expresión alterada de genes identificados por el análisis por microarrays de criptas intestinales de ratones LOI (+) y LOI (-). El análisis fue por PCR cuantitativa en tiempo real de captura por láser de 10.000 criptas microdisseccionadas de 12 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-). La expresión se normalizó a β -actina, y se muestra el nivel de expresión en muestras LOI (+) (caja gris) con relación a muestras LOI (-) (cuadro negro). Las barras indican el error típico. *Rpa2*, 1,38 veces ($P = 0,03$); *Card11*, 1,44 veces ($P = 0,04$); *Ccdc5*, 1,39 veces ($P = 0,03$); *Cdc6*, 1,55 veces ($P = 0,003$); *Mcm5*, 1,47 veces ($P = 0,007$); *Mcm3*, 1,49 veces ($P = 0,002$); *Skp2*, 1,37 veces ($P = 0,02$); *Chaf1a*, 1,61 veces ($P = 0,009$); *Lig1*, 1,54 veces ($P = 0,008$); *Gmnn*, 1,33 veces ($P = 0,1$); *Rfc3*, 1,31 veces ($P = 0,04$); *Ccne1*, 1,38 veces ($P = 0,04$). También se examinó la expresión de *Msi1* y *p21/Cdkn1a*.

20

- 25 La Figura 2 es un histograma que muestra los niveles de expresión génica en las criptas intestinales microdisseccionadas. La PCR en tiempo real cuantitativa se realizó en criptas intestinales microdisseccionadas de captura por láser de 12 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-). La expresión se normalizó a β -actina, y se muestra el nivel de expresión en muestras LOI (+) (en gris) con relación a muestras LOI (-) (en negro). Las barras indican el error típico. (A) Los genes supra-regulados en las categorías de anotación GO del ranking superior (replicación del ADN por genes del ciclo celular que figuran en la Tabla S 1 3). (B) La inhibición del receptor por NVP-AEW541 tenía un efecto diferencial sobre la expresión de genes relacionada con la proliferación en criptas LOI (+). El análisis fue mediante PCR en tiempo real cuantitativa de criptas microdisseccionadas de captura por láser de cuatro ratones LOI (+) y cuatro ratones LOI (-) tratados con NVP-AEW541 durante 3 semanas. Ratones LOI (+) (barras grises) y LOI (-) (barras negras normalizadas a 1,0).

30

- 35 La Figura 3 muestra datos del histograma que demuestra la inducción de la expresión de genes *Cdc6* y *Mcm5* por parte de la proteína IGF2 exógena, y la inhibición por parte de NVP-AEW541. Células ES de ratón se cultivaron en medio definido y se trataron con 800 ng/ml de proteína *Igf2* de ratón. La expresión de genes se analizó mediante RT-PCR en tiempo real y se normalizó a β -actina. Se muestra el nivel de expresión sin (cajas negras) y con (cajas grises) el inhibidor de IGF1R NVP-AEW541 3 μ M (una pirrolo-2,3d-pirimidina), normalizada a tiempo 0. Las barras indican el error típico.

35

- 40 La Figura 4 es una fotomicrografía que muestra el tamaño de las colonias de células ES LOI (-) y LOI (+) cultivadas en células de capa de alimentación. En cada caso 1000 células ES se sembraron en placas de 3,5 cm, y el tamaño de 15-30 colonias se midió por fotomicroscopía los días 1 a 6. Se muestran colonias representativas el día 6. La barra representa 100 μ m.

40

- 45 La Figura 5 es un gráfico que muestra la tasa de crecimiento de colonias de células ES de LOI (-) y LOI (+) cultivadas en células de capa de alimentación. Para cada uno de los tipos de células se realizaron cuatro experimentos utilizando 4 líneas de células ES LOI (-) y LOI (+) independientes [cajas negras, LOI (-); cajas grises, LOI (+)]. Los tamaños de 15-30 colonias de células ES se midieron en cada caso los días 1 a 6. Las barras indican el error típico.

45

- 50 La Figura 6 es un gráfico que muestra la tasa de crecimiento de células ES LOI (-) y LOI (+). En cada uno de los tipos de célula se realizaron cuatro experimentos, cultivando células ES no diferenciadas sobre placas revestidas de gelatina sin células de la capa de alimentación, utilizando medio definido de Complete Clonal Grade (calidad clonal completa) (Chemicon) sin suero o IGF2. El crecimiento celular se determinó contando las células de 3 pocillos cada uno los días 1 a 6, para cuatro líneas celulares ES LOI (-) y LOI (+) independientes. El tiempo de duplicación de

50

células ES LOI (+) fue $9,6 \pm 0,1$ horas (media $\pm$ error típico), un 26% más rápido que la células ES LOI (-) ($12,1 \pm 0,5$ horas, $P = 0,01$). Las barras indican el error típico.

La Figura 7 es una gráfica que demuestra la inhibición de focos de criptas aberrantes (ACF) inducida por azoximetano (AOM) por parte de NVP-AEW541. La formación de ACF en el colon se indujo por inyección intraperitoneal AOM, y el tratamiento con NVP-AEW541 fue por sonda gástrica. Cada uno de los ACF se formó de 1-4 criptas aberrantes, y se midieron el número de ACF (nº de ACF), el número total de criptas aberrantes (nº de AC) y el número medio de criptas aberrantes por ACF.

La figura 8 muestra una análisis de una sola célula de activación de Akt por parte de IGF2 en fibroblastos embrionarios de ratón LOI (+) y LOI (-). (A) La activación de Akt/PKB fue sometida a ensayo por inmunocitoquímica de células individuales con un anticuerpo contra Akt fosforilada (Ser 473), en un chip de PDMS de 2 capas monolítico sellado con un cubreobjetos de vidrio, con suministro de medios definido controlado por un sistema multiplexado de válvulas. Células MEF LOI (+) y LOI (-) vivas fueron estimuladas dentro de los chips de microfluídicos con dosis variables de IGF2, con mediciones en múltiples instantes a cada una de las concentraciones de IGF2. El eje Y muestra la relación de fluorescencia nuclear a de fondo. Para cada uno de los tipos de células, la concentración de IGF2 y el instante se obtuvieron al menos 200 mediciones celulares individuales mediante imagen digital y análisis. (B) Inhibición de la activación de Akt por parte de NVP-AEW541. Las células se sometieron a ensayo como en (A) a los 60 min después de la co-incubación con 400 ng/ml de IGF2 y NVP-AEW541 3 μ M y se compararon con el control no estimulado. Cada una de las barras se basa en mediciones de > 400 células. El asterisco indica una diferencia estadística frente al control LOI (+) (test t , $p < 0,001$) (C) Análisis de células individuales de la activación de ERK por IGF2 en células MEF LOI (+) y LOI (-). La activación de ERK se sometió a ensayo por inmunocitoquímica individual dentro de chips microfluídicos utilizando un anticuerpo contra Erk2 fosforilado de Upstate (Charlottesville, VA). Células LOI (+) (en gris) y células LOI (-) (en negro) fueron expuestas a 400 ng/ml de IGF2 durante los tiempos indicados. El eje y muestra la relación de fluorescencia nuclear a de fondo normalizada para el nivel máximo alcanzado en las células LOI (+). Las barras de error representan SD. Barras de error estándar están completamente subsumidas por los símbolos en esta escala. (D) Niveles de expresión de genes en fibroblastos embrionarios de ratón. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en células MEF LOI (+) y LOI (-), con la expresión normalizada para la transferencia de la expresión del receptor. Se muestra el nivel de expresión en muestras LOI (+) (en negro) en relación con muestras LOI (-) (en gris). Las barras indican el error típico.

La Figura 9 es una transferencia Western que muestra el efecto de NVP-AEW541 en la señalización de IGF2. La confirmación de que NVP-AEW541 inhibe la señalización de IGF-2 en el receptor de IGF1 se hizo de forma idéntica a la realizada para IGF1³¹. Células NIH 3T3 se hicieron pasar cada 3 días y se mantuvieron con DMEM con bajo contenido en glucosa más CBS al 10% en 5% de CO₂. El día antes de la transfección, las células se tripsinizaron y se sembraron en platos Mattek con la parte inferior de vidrio recubierta con PLL. Las células típicamente alcanzaron aproximadamente el 70% de confluencia el día siguiente, cuando fueron transfectadas con el plásmido eGFP-Akt-PH con lípidos Eugene siguiendo las instrucciones del fabricante. 8 horas después de la transfección, las células se privaron de comida en CBS al 0,2% en DMEM con bajo contenido en glucosa (sin antibióticos) durante al menos 12 horas. Se realizaron transferencias Western con los anticuerpos mostrados, y concentraciones variables de NVP-AEW541, con o sin IGF2.

La Figura 10 es un histograma que muestra la inducción de la expresión del gen *Msi1* por parte de la proteína IGF2 exógena, y la inhibición por parte de NVP-AEW541. Células ES de ratón se cultivaron en medio definido y se trataron con 800 ng/ml de proteína 1gf2 de ratón. La expresión de genes se analizó mediante RT-PCR en tiempo real y se normalizó a β -actina. Se muestra el nivel de expresión sin (cajas negras) y con (cajas rosas) del inhibidor R de IGF1R NVP-AEW541 3 μ M, normalizada a tiempo 0. Las barras indican el error típico.

La Figura 11 muestra histogramas para los niveles de expresión de genes en criptas intestinales microdisseccionadas. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en criptas microdisseccionadas de captura por láser de 12 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-). La expresión se normalizó a β -actina y se muestra el nivel de expresión en muestras LOI (+) (en gris) en relación con muestras LOI (-) (en negro). Las barras indican el error típico.

La Figura 12 es una fotografía que muestra la histología del colon en ratones LOI (+) tratados con AOM. A la izquierda, un foco representativo de criptas aberrantes muestra características hiperproliferativas que incluyen una multiplicidad de criptas, una ampliación y una elevación sobre mucosa circundante. A la derecha hay una cripta císticamente dilatada revestida por células alargadas con núcleos atípicos y que contienen restos necróticos, que recuerda a los adenomas sésiles aserrados que se encuentran en el colon humano.

La Figura 13 es una fotografía que muestra la histología del colon en ratones LOI (+) tratados con AOM. En comparación con la mucosa normal del colon mostrado en el panel A que contiene criptas de tamaño y orientación uniformes, el foco representativo de criptas aberrantes mostrado en el panel B demuestra características hiperproliferativas que incluyen una multiplicidad de criptas, una ampliación y una elevación sobre mucosa

circundante. En los paneles C y D se muestran dos ejemplos diferentes de criptas císticamente dilatadas revestidas por células alargadas con núcleos atípicos y que contiene restos necróticos (indicado por asteriscos).

La Figura 14 son histogramas que demuestran la inhibición de focos de criptas aberrantes (ACF) inducida por azoximetano (AOM) por parte de NVP-AEW541. (A) La formación de ACF en el colon fue inducida por inyección i. p. de AOM, y el tratamiento con NVP-AEW541 fue por lavado gástrico. Cada uno de los ACF se formó de una de cuatro criptas aberrantes, y se midieron el número de ACF (# de ACF), el número total de criptas aberrantes (# de AC) y el número medio de criptas aberrantes por ACF. Ratones LOI (+) AOM (barras gris oscuro), ratones LOI (-) OMA (barras negras), ratones NVP LOI (+) AOM (barras gris claro), ratones NVP LOI (-) OMA (barras grises). (B) El número de ACF y el número total de criptas aberrantes (AC) fueron corregidos por superficie específica de colon (cm^2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Antes de describir las presentes composiciones y métodos, se debe entender que la invención no está limitada a las metodologías, protocolos, líneas celulares, ensayos y reactivos particulares descritos, ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en esta memoria pretende describir realizaciones particulares de la presente invención, y de ningún modo pretenden limitar el alcance de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Cabe señalar que, tal como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un ligando" incluye una pluralidad de tales ligandos, una referencia a una "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismos conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, biología celular, genética, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., Gennaro, A.R., comp. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co ; Colowick, S. et al., comps., Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, comps., 1986, Blackwell Scientific Publications); Maniatis, T. et al., comps. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al., comps. (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4ª edición, John Wiley & Sons; Ream et al., comps.

(1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham comps., 1997, editorial Springer).

La impronta genómica es un parental de silenciamiento génico específico para el origen que es de origen epigenético, es decir, no implica la secuencia de ADN en sí, sino la metilación y probablemente otras modificaciones hereditarias durante la división celular (Feinberg, A.P., en The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, et al., comps. (McGraw-Hill, Nueva York, 2002)). La pérdida de impronta (LOI) de IGF2 se descubrió por primera vez en tumores embrionarios de la infancia tales como el tumor de Wilms (WT), pero es una de las alteraciones más comunes en cáncer, incluyendo el de ovario, pulmón, hígado y colon (Feinberg, A.P., en The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, et al., comps. (McGraw-Hill, Nueva York, 2002)). La consecuencia de la LOI se entiende mejor en el WT. Aquí sirve como un portero en aproximadamente la mitad de los tumores, especialmente los que se producen con un brote relativamente tardío, y conduce a una expresión incrementada de IGF2 (Ravenel, J.D., et al., J Natl. Cancer Inst. 93, 1698-1703 (2001)), un importante factor de crecimiento autocrino en una amplia diversidad de cánceres, incluido el CRC (Lahm, H., et al, Br J. Cancer 65, 341-346 (1992); M.C. Gelato y J. Vassalotti, J. Clin. Endocrinol. Metab. 71, 1168-1174 (1990); El-Badry, O.M., et al., Cell Growth Diff. 1, 325-331 (1990); Yee, D., et al., Cancer Res. 48, 6691-6696 (1988); Lamonerie, T., et al., Int. J. Cancer 61, 587-592 (1995); y Pommier, G. J., et al., Cancer Res. 52, 3182-3188 (1992)).

Alteraciones epigenéticas en los cánceres humanos incluyen hipometilación del ADN global, hipometilación génica e hipermetilación del promotor, y pérdida de impronta (LOI) del gen del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo II (IGF-2).

La presente invención describe que la LOI aumenta la expresión de genes específicos para la proliferación en tejidos específicos, que incluyen, pero no se limitan a criptas intestinales. Por ejemplo, esto se puede demostrar mediante la microarray de LCM y PCR cuantitativa en tiempo real, y por la estimulación in vitro con IGF2 y su inhibición por bloqueo de IGF1R. Además, la presente invención demuestra que células LOI (+) progenitoras proliferan más rápidamente in vitro, según se mide por el tamaño de las colonias y por el crecimiento en medios definidos. Además de ello, Por otra parte, el bloqueo de IGF1R también reduce los números de focos de criptas aberrantes en sujetos LOI (+) expuestos a AOM por debajo del de los sujetos LOI (-) tratados con AOM, lo que sugiere que las células LOI (+) son inherentemente más sensibles a la señalización de IGF2, lo cual puede ser confirmado in vitro utilizando un chip microfluídico (véanse los Ejemplos).

Aunque no se está ligado por la teoría, se ha explotado la abolición de focos de criptas aberrantes inducidos por AOM por un inhibidor del receptor de señales de IGF2 para desarrollar una estrategia quimiopreventiva para sujetos que tienen trastornos neoplásicos, incluyendo, pero no limitado a, cáncer colorrectal (CRC) en sujetos con LOI. Este enfoque puede tener un impacto significativo para la salud pública, ya que el 5-10% de la población muestra esta alteración epigenética (Cui et al, (2003) Science 299:1752-1755; Woodson et al., J Natl Cancer Inst (2004) 96:407-410), y puede incluir el uso de otros compuestos tal como se describe más adelante.

La presente invención representa un enfoque fundamentalmente diferente para la reducción de la mortalidad por cáncer, en comparación con el rastreo en cuanto a la presencia de tumores tempranos. Por ejemplo, en la prevención de enfermedades cardiovasculares, se ha producido un desplazamiento en el énfasis hacia una reducción del riesgo mediado farmacológicamente, incluso (y preferiblemente) en los sujetos sin enfermedad órgano terminal aparente en absoluto (Cannon et al., N Engl J Med (2004) 350: 1495-1504). En una realización, se describe un método para prevenir el desarrollo de tumores en un sujeto, que incluye la administración de un inhibidor de la activación de la vía de señales por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2), en el que el sujeto expresa de forma aberrante IGF2 debido a la pérdida de impronta. En un aspecto, el inhibidor incluye, pero no se limita a una tirfostina, una pirrolo[2,3-d]-pirimidina, un anticuerpo monoclonal y una combinación de los mismos. En un aspecto relacionado, la pirrolo[2,3-d]-pirimidina es NVP-AEW541.

En un aspecto, el inhibidor puede ser combinado con agentes quimioterapéuticos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a aclacinomicinas, actinomicinas, adriamicinas, ancitabinas, antramicinas, azacitidinas, azaserinas, 6-azauridinas, bisantrenos, bleomicinas, cactinomicinas, carmofurs, carmustinas, carubicinas, carzinofilinas, cromomicinas, cisplatino, cladribinas, citarabinas, dactinomicinas, daunorubicinas, denopterinas, 6-diazo-5-oxo-L-norleucinas, doxifluridinas, doxorubicinas, edatrexatos, emitefurs, enocitabinas, fepirubicinas, fludarabinas, fluorouracilos, gemcitabinas, idarubicinas, loxuridinas, menogariles, 6-mercaptopurinas, metotrexatos, mitramicinas, mitomicinas, ácidos micofenólicos, nogalamicinas, olivomicinas, peplomicinas, pirarubicinas, piritreximas, plicamicinas, porfiromicinas, pteropterinas, puromicinas, ácidos retinoicos, estreptonigrinas, estreptozocinas, tagafurs, tamoxifenos, tiamiprinas, tioguaninas, triamcinolonas, trimetrexatos, tubercidina, vinblastinas, vincristinas, zinostatinas y zorubicinas.

En un aspecto, el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (CCR), en comparación con un sujeto que no tiene una LOI en IGF2. Así, la presente invención proporciona un método de rastrear la población en general en cuanto a una LOI, y proporcionar la intervención farmacológica que puede reducir los de alto riesgo a la media o incluso un menor riesgo de cáncer de colon.

En otra realización, se describe un método de identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal en un sujeto, que incluye poner en contacto una célula progenitora en una muestra de un sujeto con factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) y determinar la sensibilidad de la célula a IGF2 tal como se determina mediante la medición de un cambio en una vía de señales asociada con la replicación del ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular o midiendo los cambios en la expresión génica, los niveles de proteína, la modificación de proteínas o la cinética de la modificación de proteínas, en que un incremento en la sensibilidad de las células progenitoras a IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal. En un aspecto, el método incluye determinar los cambios de expresión génica entre células progenitoras LOI positivas (LOI (+)) y LOI negativas (LOI (-)), en que las células progenitoras están asociadas con el cáncer colorrectal, identificar genes que se sobre-expresan en el las células progenitoras LOI (+), poner en contacto células LOI (+) y LOI (-) con un agente mutagénico, poner en contacto las células con un ligando que se expresa de forma aberrante debido a la pérdida de impronta (LOI) del gen que codifica el ligando en presencia y ausencia de un agente de ensayo; en donde el ligando está asociado con el cáncer colorrectal, y determinar la sensibilidad de las células LOI (+) y LOI (-) con el ligando en presencia y ausencia del agente de ensayo. En otro aspecto, la vía de señales es IRS-1/PI3K/AKT o GRB2/Ras/ERK. En un aspecto relacionado, el método incluye determinar la cinética de modificación de una AKT o ERK. En un aspecto adicional relacionado, la modificación de AKT o ERK es la fosforilación.

En otro aspecto, medir cambios en la expresión génica, niveles de proteína, la modificación de proteínas o la cinética de la modificación de proteínas puede llevarse a cabo vigilando este tipo de cambios en los genes según se recogen

en las Tablas 3 y 5-7. En un aspecto relacionado, los genes, según se enumeran en las Tablas 3 y 5-7 se pueden utilizar como un diagnóstico para determinar el riesgo en unión con métodos tal como se describen para los cánceres que incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de piel, incluidos métodos como se describen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. 7.264.928; 7.063.944; 6.890.514; 6.696.262; 6.720.189; 6.645.770; 6.410.335; 6.383.817; 6.282.305; 5.773.215. Por ejemplo, estos métodos pueden incluir, pero no se limitan a la detección de antígenos/marcadores específicos para tumores, biopsia, cistoscopia, rayos X, CTs, frotis de PAP, detección de proteínas del suero, y similares.

En otra realización, se describe un método para evaluar la eficacia de un régimen quimioterapéutico que incluye el aislamiento periódico de una célula progenitora en una muestra de un sujeto que recibe un agente quimioterapéutico, la puesta en contacto de la célula progenitora en la muestra con el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) y la determinación de la sensibilidad de la célula progenitora a IGF2, en donde la sensibilidad se mide determinando cambios en una vía de señales asociada con la replicación del ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular, en el que una reducción de la célula progenitora para formar focos de criptas aberrantes (ACF) se correlaciona con la eficacia del régimen.

La presente invención también proporciona datos para un "modelo progenitor epigenético", lo que demuestra que existe un cambio policlonal en los números y los estados de células progenitoras que surge antes de la mutación genética, y aumenta el riesgo de cáncer cuando se produce una mutación estocásticamente (Feinberg et al, Nat Rev Genet (2006) 7: 21-33). Por lo tanto, la LOI y el riesgo de cáncer se ha confirmado en un segundo modelo animal, y aunque no pretender estar ligado por teoría alguna, se ha ofrecido un mecanismo plausible para esta expansión de células progenitoras, a saber, una sensibilidad incrementada a IGF2 en células LOI (+), lo que conduce a una proliferación incrementada de células progenitoras. La presente invención demuestra que la LOI es un paradigma para otros cambios epigenéticos en células aparentemente normales de sujetos en riesgo de cáncer, e incluye otros genes expresados de forma aberrante debido a la LOI, la metilación del ADN o las diferencias de la cromatina que distinguen a las células no tumorales de pacientes con cáncer o sujetos en situación de riesgo de cáncer, de sus cohortes no cancerosas.

La presente invención también demuestra la ausencia de cualquier reducción de ACF por parte del inhibidor de IGF2 en ratones LOI (-), y la presencia de una reducción por el inhibidor de los números de ACF en ratones LOI (+) por debajo de la observada en ratones LOI (-). Aunque no se está ligado por la teoría, este resultado sugiere que células con LOI tienen una sensibilidad mejorada a dosis bajas de IGF2, que se confirma mediante el estudio de la señalización de Akt/PKB aguas abajo en un nuevo sistema de chip microfluídico (véanse los Ejemplos). Este análisis in vitro mostró una marcada potenciación de la señalización de IGF2 aguas abajo en células con LOI.

Una vez más, no estando ligado por la teoría, la sensibilidad incrementada a IGF2 a baja dosis podría ayudar a explicar la relación entre la señalización mediada por el receptor y el crecimiento celular. Basándose en los resultados descritos en esta memoria, las células proliferantes pueden ser más sensibles a un ligando a baja densidad, con un IGF2 acumulado relativamente bajo. A medida que aumenta la densidad celular, la estimulación autocrina y paracrina aumenta progresivamente la concentración intersticial local de IGF2, provocando un efecto disminuido sobre la proliferación celular, similar al observado en los experimentos in vitro (véanse los Ejemplos), y proporcionando una comprobación importante en el control del crecimiento a medida que el tejido alcanza un tamaño crítico. En una realización, la diferencia en la sensibilidad de células LOI (+) se utiliza para favorecer una relación terapéutica incrementada de inhibidores de IGF2 para la quimioprevención, ya que los sujetos (o células) con una impronta normal serían relativamente refractarios al fármaco. En un aspecto relacionado, para el control del riesgo de cáncer, los sujetos con mayor riesgo podrían reducirse a una categoría de riesgo aún más baja que la línea de base a través de la intervención específica, tal como se describe en esta memoria.

Tal como se utiliza en esta memoria, cuando se mide la hipometilación, "el grado de LOI" significa el porcentaje de metilación en comparación con una DMR totalmente metilada. Tal como se utiliza en esta memoria, cuando se compara la expresión de diferentes polimorfismos, "el grado de LOI" significa la expresión total (tal como se mide por la expresión o transcripción real) atribuible al alelo que normalmente se impronta. El grado de LOI se puede calcular por la relación de alelo, es decir, el alelo más abundante dividido por el alelo menos abundante. El grado de LOI se puede determinar por cualquier método que permita la determinación de las expresiones relativas de los dos alelos. Por ejemplo, un grado de LOI de 100% refleja una LOI completa (expresión igual de ambos alelos), mientras que un grado de LOI de 0% refleja ninguna LOI (expresión de sólo un alelo). Cualquier método de medir la expresión relativa de los dos alelos se considera incluido en la presente invención.

Métodos para detectar la pérdida de impronta son métodos típicamente cuantitativos para analizar el estado de la impronta. La presencia o ausencia de una LOI puede ser detectada mediante el examen de cualquier condición, estado o fenómeno que provoque la LOI o es el resultado de la LOI. Tales condiciones, estados y fenómenos incluyen, pero no se limitan a:

1. Causas de LOI, tales como el estado o condición de la maquinaria celular para la metilación del ADN, el estado de la región de control de la impronta en el cromosoma 11, la presencia de modificadores de trans-actuación de la impronta, el grado o la presencia de la desacetilación de histonas;

5 2. Estado del ADN genómico asociado a los genes o gen para el que se está evaluando la LOI tal como el grado de metilación del ADN;

3. Efectos de la LOI, tales como:

a. Transcripción relativa de los dos alelos de los genes o gen para el que se está evaluando la LOI;

10 b. Efectos post-transcripcionales asociados con la expresión diferencial de los dos alelos de los genes o gen para el que se está evaluando la LOI;

c. Traslación relativa de los dos alelos de los genes o gen para el que se está evaluando la LOI;

d. Efectos post-traducción asociadas con la expresión diferencial de los dos alelos de los genes o gen para el que se está evaluando la LOI;

15 e. Otros efectos aguas abajo de la LOI tales como la expresión de genes alterada medida al nivel de ARN, al nivel de corte y empalme o al nivel de proteína o al nivel de la post-traducción (es decir, medir una o más de estas propiedades de una manifestación impronta de un gen en diversas macromoléculas); cambios en la función que podrían implicar, por ejemplo, el ciclo celular, la transducción de señales, los canales de iones, el potencial de membrana, la división celular, u otros (es decir, miden las consecuencias biológicas de un gen improntado específico que está normalmente o no normalmente improntado (por ejemplo, intervalo QT del corazón). Otro grupo de cambios macromoleculares incluyen procesos asociados con la LOI tales como la acetilación de histonas, la desacetilación de histonas o el corte y empalme de ARN.

25 El grado de LOI se puede medir para el gen IGF2 cuando se rastrea la presencia de cáncer colorrectal, u otros tipos de cáncer, p. ej., el grado de LOI se mide para el gen IGF2 cuando se rastrea la presencia de cáncer de estómago, cáncer de esófago o leucemia.

30 Puede emplearse una plataforma de detección lineal para cuantificar la LOI. Una plataforma de detección lineal es una plataforma de detección que permite la cuantificación, ya que la cantidad de diana presente y la señal detectada están linealmente relacionadas. En este sentido, se puede utilizar un PhosphorImager (modelo 4458I, fabricado por Molecular Dynamics), que detecta las emisiones radiactivas directamente de un gel. Otros sistemas de detección lineales incluyen autorradiografía cuidadosamente valorada seguido por análisis de imagen, análisis de detección de emisión beta (Betascan). Otra plataforma de detección lineal es un secuenciador de ADN automatizado tal como el analizador ABI 377. Otra plataforma de detección lineal es un sistema basado en matriz con el software apropiado. Otro es SNUPE.

35 Además de medir el grado de impronta cuando está presente un polimorfismo improntado en un gen, es posible evaluar el grado de LOI en un gen particular, incluso cuando un polimorfismo improntado no está presente en ese gen. Por ejemplo, la impronta puede ser evaluada por el grado de metilación de islas CpG en o cerca de un gen improntado (p. ej., Barletta, Cancer Research, op. cit). Además, la impronta puede ser evaluada por los cambios en la asincronía de temporización de replicación del ADN, por ejemplo, White L.M., Rogan P.K., Nicholls R.D., Wu B.L., Korf B. Knoll J H, Allele-specific replication of 15q-11q 13 loci: a diagnostic test for detection of uniparental disomy. American Journal of Human Genetics. 59:423-30, 1996.

40 Por otra parte, determinadas técnicas se utilizan más convenientemente cuando existe un polimorfismo en los dos alelos del gen o genes para los que se está midiendo la presencia o ausencia de la LOI. Por ejemplo, RT-PCR, seguida por electroforesis en gel para distinguir polimorfismos de longitud, o RT-PCR seguida por digestión con enzimas de restricción, o por secuenciación de ADN automatizada, o por análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), o electroforesis en gel de gradiente desnaturante, etc.; o, métodos basados completamente en ADN que explotan, por ejemplo, la metilación del ADN, que no requieren la etapa RT, para convertir el ARN en ADNc antes de la PCR.

50 Una vez que se ha medido el grado de LOI tal como el nivel de hipometilación para el gen o genes en cuestión, el riesgo de tener cáncer se evalúa a continuación, comparando el grado de LOI para ese gen o genes a una relación conocida entre el grado de LOI y la probabilidad de la presencia del tipo particular de cáncer u otra enfermedad. La relación entre el grado de la LOI y la probabilidad de la presencia de un tipo particular de cáncer se puede

determinar para cualquier combinación de un gen o genes normalmente improntados y un tipo particular de cáncer mediante determinación.

5 Cuando se mide el grado de LOI tal como el grado de hipometilación de IGF2, el grado medido de la LOI se compara con una relación conocida entre el grado de LOI y la probabilidad de contraer el tipo particular de cáncer. La relación entre el grado de LOI y la probabilidad de contraer un tipo particular de cáncer puede ser determinada por un experto ordinario en la técnica para cualquier combinación de un gen o genes normalmente impresa y un tipo particular de cáncer mediante la determinación del grado de LOI en un número estadísticamente significativo de muestras de tejido obtenidas de pacientes con cáncer, y determinar el grado de LOI en un número estadísticamente significativo de muestras de tejido obtenidas de pacientes sin cáncer, y luego calcular un odds ratio como una función del grado de LOI.

10 También debe entenderse que la medición del grado de LOI puede llevarse a cabo comparando el grado de LOI contra uno o más valores de umbral predeterminados, de tal manera que, si el grado de LOI está por debajo de un valor umbral dado, que se puede manifestar en un patrón de metilación regular, entonces el sujeto es asignado a una población de bajo riesgo de tener cáncer, contraer cáncer y/o tener defectos de reparación de un error de replicación. Alternativamente, la técnica analítica puede no estar diseñada para producir un valor numérico explícito para el grado de LOI, sino, en su lugar, para producir sólo un primer tipo de señal cuando el grado de LOI está por debajo de un valor umbral y/o un segundo tipo de señal cuando el grado de LOI está por debajo de un valor umbral. También es posible llevar a cabo los presentes métodos por medio de un ensayo en el que el grado de LOI se señala por medio de un espectro no numérico tal como una gama de colores encontrados con papel de tornasol.

15 Aunque se han observado muchas mutaciones genéticas convencionales en el cáncer humano, la mayoría no se producen a alta frecuencia en la población general. Determinadas realizaciones de la presente invención se basan en el hallazgo de una asociación entre la pérdida de impronta (LOI) del gen IGF2 y el historial familiar de cáncer colorrectal (CRC) y entre la LOI del gen IGF2 y el historial personal presente o pasado de neoplasia colorrectal. Por consiguiente, los métodos de la presente invención analizan los marcadores moleculares comunes de riesgo de cáncer para identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer en un sujeto.

20 Determinadas realizaciones de la presente invención se basan en el hallazgo de que la pérdida de impronta del gen IGF2 se asocia con cánceres tales como cáncer colorrectal, y que la pérdida de impronta del gen IGF2 se correlaciona con la hipometilación tanto del gen IGF2 como del gen H 19.

25 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer en un sujeto.

Un método de la presente invención también puede utilizarse para inferir un riesgo de cáncer de un sujeto.

30 Tal como se ilustra en la sección de Ejemplos, la presente invención proporciona, en determinadas realizaciones, un método de identificación un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal en un sujeto, que incluye poner en contacto una célula progenitora LOI (+) en una muestra de un sujeto con un factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) y determinar la sensibilidad de la célula a IGF2 según se determina mediante la medición de un cambio en una vía de señales asociada con la replicación del ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular, en el que un aumento en la sensibilidad de la célula progenitora LOI (+) a IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal.

35 La pérdida de impronta, una alteración epigenética que afecta al gen del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF2), se encuentra en la mucosa del colon normal de aproximadamente 30% de pacientes de cáncer colorrectal (CRC), en comparación con 10% de aquellos sin neoplasia colorrectal (Cui, H., et al., Nat. Med. 4, 1276-1280 (1998)). Por lo tanto, la LOI se produce a una tasa relativamente alta en pacientes con CRC y en pacientes sin neoplasia colorrectal.

40 En el estudio proporcionado en el Ejemplo 1, 11 de 123 (9,0%) de los pacientes sin historial familiar de CRC mostraron una LOI en linfocitos, en comparación con 13 de 49 (27%) con un historial familiar positivo (relación de probabilidades ajustada 4,41, 95% CI 1,62-12,0, $p = 0,004$). De manera similar, 7 de 106 (6,6%) pacientes sin neoplasia de colon pasada o presente mostraron una LOI, en comparación con 12 de 56 (21%) pacientes con adenomas, y 5 de 9 (56%) de pacientes con CRC (relación de probabilidades ajustada 4,10 [95% CI 1,30-12,8, $p = 0,016$] y 34,4 [95% CI 6,10-194, $p < 0,001$], respectivamente). Estos datos apoyan la utilidad y eficacia de los métodos de la presente invención en la identificación de un riesgo incrementado de desarrollar cáncer.

45 Un método de acuerdo con la presente invención se puede realizar durante la atención clínica de rutina, por ejemplo como parte de un chequeo regular en general, en un sujeto que tiene o no tiene neoplasia aparente o sospechosa tal como cáncer. Por lo tanto, la presente invención, en determinadas realizaciones, proporciona un método de rastreo

para la población general. Los métodos de la presente invención se pueden realizar en una edad más temprana que los presentes ensayos de rastreo de cáncer, por ejemplo en los casos en los el método se puede realizar en un sujeto menor de 65, 55, 50, 40, 35, 30, 25, o 20 años de edad.

Si se encuentra que la muestra biológica del sujeto en cuestión exhibe una LOI, por ejemplo como resultado de poner en contacto una célula progenitora en una muestra de un sujeto con un gen que se expresa de forma aberrante debido a una LOI y determinar la sensibilidad de la célula a genes LOI (+) tal como se determina midiendo un cambio en una vía de señales asociada con la replicación de ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular, en que un aumento en la sensibilidad de las células progenitoras a IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer, entonces ese sujeto se identifica por tener una probabilidad incrementada de tener cáncer. En estas realizaciones, pueden llevarse a cabo pruebas de diagnóstico adicionales para investigar la posibilidad de que esté presente cáncer en el sujeto. Ejemplos de tales pruebas de diagnóstico adicionales incluyen, pero no se limitan a radiografía de tórax, determinación del nivel de antígeno carcinoembrionario (CEA) o de antígeno específico para la próstata (PSA), examen colorrectal, examen endoscópico, MRI, exploración CAT, u otra formación de imágenes tales como la exploración con galio, y la formación de imágenes con bario. Además de ello, el método de la invención puede ser coincidente con la sigmoidoscopia/colonoscopia rutinaria del sujeto. El método podría implicar el uso de un tubo muy delgado, o un examen digital para obtener una muestra colorrectal.

El método de la presente invención, especialmente cuando se utiliza para detectar una LOI local, se puede repetir a intervalos regulares. Aunque no se desea estar limitado a una teoría particular, los métodos dirigidos a la detección de LOI local mediante el análisis de una muestra de sangre para una LOI, típicamente identifican mutaciones de la línea germinal. Por lo tanto, típicamente es suficiente un ensayo. Sin embargo, los métodos utilizados para detectar una LOI local, se puede aislar una tercera muestra, por ejemplo de tejido colorrectal, por ejemplo al menos 2 meses después del aislamiento de la segunda muestra. Por ejemplo, la tercera muestra se puede aislar a aproximadamente 1 año después de haber aislado la segunda muestra. De hecho, el método puede repetirse anualmente, por ejemplo en un examen físico anual rutinario. Utilizando estas pruebas regulares, se utiliza un método de la presente invención para el rastreo de un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal mediante un método que incluye poner en contacto una célula progenitora LOI (+) en una muestra de un sujeto con el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) y determinar la sensibilidad de la célula a IGF2 según se determina mediante la medición de un cambio en una vía de señales asociada con la replicación de ADN, el metabolismo de ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular, en que un aumento en la sensibilidad de las células progenitoras LOI (+) a IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal.

En el futuro se pueden realizar pruebas de diagnóstico adicionales, incluso si no está presente cáncer en el momento en el que se detecta la LOI. Por ejemplo, si la LOI se detecta en una muestra biológica de un sujeto e indica un riesgo incrementado de contraer cáncer, se pueden programar para ese sujeto radiografías de tórax periódicas (p. ej., cada 1 a 12 meses), exámenes colorrectales, examen endoscópico, MRI, exploración CAT, otras formaciones de imágenes tales como la exploración con galio y/o la formación de imágenes con bario. Por lo tanto, en estas realizaciones, la LOI se utiliza como un ensayo de rastreo para identificar sujetos para los cuales se justifica un control más frecuente.

De acuerdo con la presente invención, la muestra biológica o tejido se puede extraer de cualquier tejido que sea susceptible al cáncer. Por ejemplo, el tejido puede obtenerse mediante cirugía, biopsia, torunda, heces, u otro método de recogida. La muestra biológica para los métodos de la presente invención puede ser, por ejemplo, una muestra de tejido colorrectal, o en determinadas realizaciones, puede ser una muestra de sangre, o una fracción de una muestra de sangre tal como una fracción de un linfocito de sangre periférica (PBL). Métodos para aislar PBL de sangre entera son bien conocidos en la técnica. Además, es posible utilizar una muestra de sangre y enriquecer la pequeña cantidad de células circulantes de un tejido de interés, p. ej., colon, mama, etc., utilizando un método conocido en la técnica.

Cuando el método de la presente invención proporciona un método para identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal, se puede aislar una muestra biológica del colon. Una muestra de tejido de este tipo puede obtenerse por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, o mediante el uso de una torunda o una biopsia. En el caso de cánceres de estómago y de esófago, la muestra de tejido puede obtenerse mediante biopsia endoscópica o aspiración, o muestra de heces o una muestra de saliva. En el caso de leucemia, la muestra de tejido es típicamente una muestra de sangre.

Tal como se describe anteriormente, la muestra biológica puede ser una muestra de sangre. La muestra de sangre se puede obtener utilizando métodos conocidos en la técnica tales como un pinchazo en el dedo o flebotomía. Adecuadamente, la muestra de sangre es de aproximadamente 0,1 a 20 ml o, alternativamente, de aproximadamente 1 a 15 ml, siendo el volumen de sangre aproximadamente de 10 ml.

- Por consiguiente, en una realización, el riesgo de cáncer identificado es para el cáncer colorrectal, y la muestra biológica es una muestra de tejido obtenida a partir del colon, sangre o una muestra de heces. En otra realización, el riesgo de cáncer identificado es para el cáncer de estómago o cáncer de esófago, y el tejido se puede obtener por biopsia endoscópica o aspiración, o muestra de heces o una muestra de saliva. En otra realización, el riesgo de
- 5 cáncer identificado es el cáncer de esófago, y el tejido se obtiene mediante biopsia endoscópica, aspiración o una muestra oral o saliva. En otra realización, el riesgo de cáncer identificado es leucemia/linfoma y la muestra de tejido es sangre.
- En la presente invención, el sujeto es típicamente un ser humano, pero también puede ser cualquier organismo mamífero, que incluye, pero no se limita a un perro, gato, conejo, vaca, pájaro, rata, caballo, cerdo o mono.
- 10 Tal como se mencionó anteriormente, para determinadas realizaciones de la presente invención, el método se realiza como parte de un chequeo regular. Por lo tanto, para estos métodos el sujeto no ha sido diagnosticado de cáncer, y típicamente para estas presentes realizaciones no se sabe que un sujeto tenga un trastorno hiperproliferativo tal como una neoplasia colorrectal.
- Los métodos de la presente invención identifican un riesgo de desarrollar cáncer para un sujeto. Un cáncer puede
- 15 incluir, pero no se limita a cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de estómago, leucemia/linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer endocrino, cáncer urinario, cáncer de páncreas, otro cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de cabeza, cáncer de cuello y adenomas. En un aspecto, el cáncer es cáncer colorrectal.
- Un trastorno hiperproliferativo incluye, pero no se limita a neoplasias localizadas en lo siguiente: abdomen, hueso,
- 20 mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenal, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, torácico y urogenital. Típicamente, tal como se utiliza en esta memoria, el trastorno hiperproliferativo es un cáncer. En determinados aspectos, el trastorno hiperproliferativo es cáncer colorrectal.
- El método puede incluir, además, el análisis de una segunda muestra biológica del sujeto en un tejido diana para la
- 25 pérdida de la impronta del gen IGF2, en donde una pérdida de la impronta en la segunda muestra es indicativa de un riesgo incrementado de desarrollar cáncer en el tejido diana. En determinadas realizaciones, la segunda muestra biológica no es una muestra de sangre. Por ejemplo, la primera muestra biológica puede ser una muestra de sangre y la segunda muestra biológica se puede aislar de tejido colorrectal.
- En otra realización, la presente invención proporciona un método para la gestión de la salud de un sujeto. El método
- 30 incluye realizar el método para identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer discutido anteriormente y la realización de un método tradicional de detección de cáncer. Por ejemplo, se puede realizar un método tradicional de detección de cáncer si el método para identificar el riesgo de cáncer indica que el sujeto está en un riesgo incrementado de desarrollar cáncer. Se conocen muchos métodos tradicionales de detección de cáncer y se pueden
- 35 incluir en este aspecto de la invención. El método tradicional de detección de cáncer puede incluir, por ejemplo, uno o más de radiografía de tórax, determinación del nivel de antígeno carcinoembrionario (CEA), examen colorrectal, examen endoscópico, MRI, exploración CAT, u otra formación de imágenes tales como la exploración con galio y la formación de imágenes con bario y sigmoidoscopia/colonoscopia, un examen de los senos, o un ensayo de antígeno específico para la próstata (PSA).
- En otra realización, la presente invención proporciona un método para pronosticar el riesgo de cáncer de un sujeto.
- 40 El método incluye poner en contacto una célula progenitora LOI (+) en una muestra de un sujeto con el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) y determinar la sensibilidad de la célula a IGF2 según se determina mediante la medición de un cambio en una vía de señales asociada con la replicación del ADN, el metabolismo del ADN, el ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular; en donde un aumento en la sensibilidad de las células progenitoras LOI (+) a IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar la predisposición al cáncer colorrectal
- 45 de un sujeto. El método incluye poner en contacto la célula con IGF2 en presencia de un inhibidor del receptor de IGF1, en el que una disminución adicional en la vía de activación de las señales en presencia del inhibidor se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal. En este aspecto de la invención, la primera muestra biológica es típicamente una muestra colorrectal.
- Al detectar la presencia o ausencia de una LOI al confiar en alguna de estas condiciones, estados o fenómenos, es
- 50 posible utilizar un cierto número de diferentes técnicas analíticas específicas. En particular, es posible utilizar cualquiera de los métodos para la determinación del patrón de impronta conocido en la técnica. Se reconoce que los métodos pueden variar en función del gen a analizar.

Condiciones, estados y fenómenos que pueden provocar una LOI y que pueden ser examinados para evaluar la presencia o ausencia de una LOI incluyen el estado o condición de la maquinaria celular para la metilación del ADN, el estado de la región de control de la impronta en el cromosoma 11, la presencia de modificadores de la impronta trans-actantes, el grado o la presencia de desacetilación de histonas o la desacetilación de histonas, el centro de control de la impronta, factores moduladores de la transacción, cambios en la cromatina provocados por proteínas similares a Polycomb, proteínas similares a Trithorax, homólogos humanos de otras proteínas que afectan a la cromatina en otras especies tales como las proteínas Su(var) en *Drosophila*, las proteínas SIR en levaduras, silenciamiento de tipo apareamiento en levaduras o genes de tipo XIST en mamíferos.

También es posible detectar una LOI examinando el ADN asociado con el gen o genes para el o los que se está evaluando la presencia o ausencia de LOI. Por la expresión "el ADN asociado con el gen o genes para el o los que se está evaluando la presencia o ausencia de LOI" se quiere dar a entender el gen, el ADN próximo al gen o el ADN a cierta distancia del gen (tal como alejado una megabase o más, p. ej., cambios de metilación pueden estar tan lejos, ya que actúan sobre la cromatina a través de largas distancias). Típicamente, para la presente invención la LOI se identifica o analiza o detecta mediante la detección de la hipometilación de una DMR del gen IGF2 y/o de una DMR del gen H 19, tal como se describe en esta memoria.

El grado de metilación en el ADN, asociado con el gen o los genes para el o los que se está evaluando la presencia o ausencia de una LOI, se puede medir o identificar utilizando un cierto número de técnicas analíticas.

Se conocen en la técnica numerosos métodos para analizar el estado de metilación de un gen y se pueden utilizar en los métodos de la presente invención para identificar una hipometilación o hipermetilación del gen IGF2. Por ejemplo, el análisis de metilación se puede realizar mediante la secuenciación genómica de bisulfito. Por consiguiente, el ADN genómico desnaturalizado puede ser tratado con disolución de bisulfito recién preparada 55°C. en la oscuridad durante la noche, seguido de purificación en columna y tratamiento con NaOH. El tratamiento con bisulfito modifica el ADN, convirtiendo citosinas no metiladas, pero no metiladas, en uracilo.

Se reconocerá que se pueden diseñar cebadores dependiendo del sitio unido por el cebador y la dirección de extensión de un cebador. Las regiones amplificadas y/o analizadas de otro modo utilizando pares de cebadores se pueden identificar fácilmente por un experto en la técnica utilizando herramientas de comparación de secuencias y/o analizando fragmentos de nucleótidos que se replican utilizando los cebadores. Por lo tanto, se entenderá que la identificación de los sitios de unión para estos cebadores utilizando métodos computacionales tendrá en cuenta que los cebadores pueden unirse preferiblemente a un polinucleótido cuya secuencia es modificada por tratamiento con bisulfito.

El tratamiento con bisulfito puede llevarse a cabo utilizando el kit de CpG Genome DNA Modification (Intergen, Purchase, N.Y.). Para la secuenciación de clones individuales, los productos de PCR se pueden subclonar en un vector de clonación TA (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se puede seleccionar para la secuenciación una serie de clones, tal como 10-15 clones.

Los productos de la PCR pueden purificarse usando el kit de extracción de gel QIAEX II (Qiagen) y se secuenció directamente con un secuenciador de ADN ABI Prism 377 utilizando el BIGDYE™. Kit de Secuenciación del Ciclo Terminator siguiendo el protocolo del fabricante (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

La metilación alterada puede ser identificada por la identificación de una diferencia detectable en la metilación. Por ejemplo, la hipometilación se puede determinar identificando si después de un tratamiento con bisulfito está presente uracilo o una citosina en residuos específicos. Si uracilo está presente después de tratamiento con bisulfito, a continuación, el residuo es no metilado. La hipometilación está presente cuando hay una disminución medible en la metilación, o una disminución medible en la metilación de residuos correspondientes a las posiciones metiladas dentro de los polinucleótidos analizó utilizando cebadores seleccionados.

En una realización alternativa, una reacción de amplificación puede ser precedida por un tratamiento con bisulfito, y los cebadores se pueden hibridar selectivamente a secuencias diana de una manera que es dependiente de tratamiento con bisulfito. Por ejemplo, un cebador puede unirse selectivamente a una secuencia diana sólo cuando una o más bases de la secuencia diana se altera mediante tratamiento con bisulfito, siendo de ese modo específico para una secuencia diana metilada.

En la técnica se conocen otros métodos para determinar el estado de metilación de un gen, tal como el gen IGF2, que incluyen, pero no se limitan a análisis de metilación basado en la matriz y análisis de transferencia Southern.

Métodos que utilizan una reacción de amplificación, por ejemplo los métodos anteriores para la detección de la hipometilación de la DMR del IGF2 pueden utilizar un proceso de amplificación de detección en tiempo real. Por ejemplo, el método puede utilizar la tecnología de baliza molecular (Tyagi S., et al., Nature Biotechnology, 14:303

(1996)) o la tecnología TAQMAN™ (Holland, P.M., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276 (1991)). También MethylLight (Trinh B.N., Long T I, Laird P W. DNA methylation analysis by MethylLight technology, Methods 25(4):456-62 (2001), MethylHeavy (Epigenomics, Berlín, Alemania) o SNUPE (extensión del cebador de un solo nucleótido) (véase, p. ej., Watson D., et al, Genet Res. 75(3):269-74 (2000)) se puede utilizar en los métodos de la presente invención relacionada con la identificación de la metilación alterada de IGF2.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "hibridación selectiva" o "hibridar selectivamente" se refiere a la hibridación en condiciones fisiológicas moderadamente rigurosas o altamente rigurosas que puede distinguir secuencias de nucleótidos relacionadas de secuencias de nucleótidos no relacionadas.

Tal como se conoce en la técnica, en reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones utilizadas para conseguir un nivel particular de rigurosidad variará dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se estén hibridando. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, el contenido de GC:AT relativo) y el tipo de ácido nucleico, es decir, si el oligonucleótido o la secuencia de ácido nucleico diana es ADN o ARN, se puede considerar en la selección de condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro. Métodos para seleccionar las condiciones de rigurosidad apropiadas pueden ser determinados empíricamente o de forma estimada utilizando diversas fórmulas, y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra, 1989).

Un ejemplo de condiciones de rigurosidad progresivamente más altas es como sigue: 2 X SSC/SDS al 0,1% a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2 X SSC/SDS al 0,1% a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad); 0,2 X SSC/SDS al 0,1% a aproximadamente 42°C (condiciones de rigurosidad moderada); y 0,1 X SSC a aproximadamente 68°C (condiciones de alta rigurosidad). El lavado puede llevarse a cabo utilizando sólo una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de alta rigurosidad, o se puede utilizar cada una de las condiciones, por ejemplo durante 10 a 15 minutos cada una, en el orden enumerado anteriormente, repitiendo cualquiera o todos los pasos que se indican.

El grado de metilación en el ADN asociado con el gen o los genes para el que se evalúan la presencia o ausencia de LOI, se puede medir por hibridación fluorescente in situ (FISH) por medio de sondas que identifican y diferencian entre ADNs genómicos, asociados con el gen para el que se evaluó la presencia o ausencia de LOI, que exhiben diferentes grados de metilación del ADN. FISH se describe en Human chromosomes: principles and techniques (Compiladores, Ram S. Verma, Arvind Babu Verma, Ram S.) 2ª ed, Nueva York: McGraw-Hill, 1995, y de Capoa A., Di Leandro M., Grappelli C, Menéndez F., Poggesi I., Giancotti P., Marotta, M.R., Spano A., Rocchi M., Archidiacono N., Niveleau A. Computer-assisted analysis of methylation status of individual interphase nuclei in human cultured cells. Cytometry. 31:85-92, 1998. En este caso, la muestra biológica será típicamente cualquiera que contenga suficientes células o núcleos enteros para llevar a cabo un cultivo a corto plazo. Habitualmente, la muestra será una muestra de tejido que contiene 10 a 10.000 o, por ejemplo, 100 a 10.000 células somáticas enteras.

Adicionalmente, tal como se mencionó anteriormente, se pueden realizar análisis MethylLight, MethylHeavy de metilación basado en la matriz, mediante el uso de ADN tratado con bisulfito que se amplifica a continuación por PCR, frente a microarrays de secuencias diana de oligonucleótidos con las diversas formas que corresponde a ADN no metilado y metilado.

Tal como se mencionó anteriormente, métodos para la detección de una LOI pueden identificar patrones de metilación alterados. Sin embargo, se conocen otros métodos para detectar una LOI. Por ejemplo, determinados métodos para detectar una LOI identifican la expresión génica específica para alelos y dependen de la transcripción diferencial de los dos alelos. Para estos métodos, el ARN se transcribe de forma inversa con transcriptasa inversa, y luego se realiza la PCR con cebadores de PCR que abarcan un sitio dentro de un exón, en que ese sitio es polimórfico (es decir, normalmente variable en la población) y este análisis se realiza en un individuo que es heterocigoto (es decir, informativo) para el polimorfismo. Se puede utilizar un cierto número de esquemas de detección para determinar si se expresa uno o ambos alelos. Véase también Rainier et al. (1993) Nature 362:747-749; que enseña la evaluación de la expresión específica para alelos de IGF2 por transcripción inversa de ARN y amplificación de ADNc mediante PCR utilizando nuevos cebadores que permiten una sola ronda en lugar de una PCR anidada; Matsuoka et al. (1996) Proc. Natl. Acad Sci USA 93:3026-3030 que enseña la identificación de un polimorfismo transcrito en p57^{K1P2}; Thompson et al. (1996) Cancer Research 56:5723-5727, que enseña la determinación de los niveles de ARNm por RPA y análisis RT-PCR de la expresión específica para los alelos de p57^{K1P2}; y Lee et al. (1997) Nature Genet. 15:181-185, que enseña el análisis RT-PCR SSCP de dos sitios polimórficos. En este caso, la muestra biológica será cualquiera que contenga suficiente ARN para permitir la amplificación y subsiguiente transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa. Típicamente, la muestra biológica será una muestra de tejido que contiene de 1 a 10.000.000, 1.000 a 10.000.000 o 1.000.000 a 10.000.000 células somáticas.

La LOI también puede ser detectada por la dependencia de otros efectos aguas abajo específicos para alelos. Por ejemplo, dependiendo de la vía metabólica en la que se encuentra el producto del gen improntado; la diferencia será de 2 veces frente a 1 vez (o algún número entremedias) del producto y, por lo tanto, la función o una variación en la función específica para uno de los alelos. Por ejemplo, para IGF2 una señalización mitogénica incrementada en el receptor de IGF1, una ocupación incrementada del receptor de IGF1, una actividad incrementada en el receptor catabólico de IGF2, una apoptosis disminuida debido a la dosis de IGF2; para KvLQT1, un cambio en la longitud del intervalo QT en función de la cantidad y la isoforma de la proteína, o cambio en el potencial eléctrico, o cambio en la actividad cuando el ARN se extrae y se introduce en oocitos de Xenopus.

La expresión "molécula de ácido nucleico" se utiliza ampliamente en esta memoria para dar a entender una secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están enlazados entre sí por un enlace fosfodiéster. Como tal, la expresión "molécula de ácido nucleico" está destinada a incluir ADN y ARN, que pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena, así como híbridos de ADN/ARN. Además, la expresión "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza en esta memoria, incluye moléculas de ácido nucleico que se producen de forma natural, que se pueden aislar de una célula, por ejemplo, el gen IGF2, así como moléculas sintéticas, que se puede preparar, por ejemplo, por métodos de síntesis química o mediante métodos enzimáticos tales como mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, en diversas realizaciones, pueden contener análogos de nucleótidos o un enlace en la cadena principal distinto de un enlace fosfodiéster.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también se utilizan en esta memoria para referirse a moléculas de ácido nucleico. Aunque mediante el uso de estos términos no se pretende una distinción específica entre sí o de "molécula de ácido nucleico", el término "polinucleótido" se utiliza generalmente con referencia a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, o una parte de péptido de la misma, mientras que el término "oligonucleótido" se utiliza generalmente con referencia a una secuencia de nucleótidos útil como una sonda, un cebador de PCR, una molécula antisentido o similares. Por supuesto, se reconocerá que un "oligonucleótido" también puede codificar un péptido. Como tal, los diferentes términos se utilizan principalmente para la conveniencia de la discusión.

Un polinucleótido u oligonucleótido que comprende nucleótidos que se producen de forma natural y enlaces fosfodiéster se pueden sintetizar químicamente o se pueden producir utilizando métodos de ADN recombinante, utilizando un polinucleótido adecuado como un molde. En comparación, un polinucleótido que comprende análogos de nucleótidos o enlaces covalentes distintos de los enlaces fosfodiéster se sintetizarán, en general, químicamente, aunque una enzima tal como T7 polimerasa puede incorporar determinados tipos de análogos de nucleótidos en un polinucleótido y, por lo tanto, se puede utilizar para producir de forma recombinante un polinucleótido de este tipo a partir de un molde adecuado.

En otro aspecto, la presente invención incluye kits que son útiles para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Los componentes contenidos en el kit dependen de un cierto número de factores, que incluyen: la condición, estado o fenómeno que se basa en detectar una LOI o medir el grado de LOI, la técnica analítica particular utilizada para detectar una LOI o medir el grado de la LOI, y el gen o los genes para los que se están detectando una LOI o se están midiendo el grado de una LOI.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

EJEMPLOS

40 Materiales y Métodos

Ratones y genotipado.

Ratones con antecedentes C57BL/6J que portan una delección en el gen H19 (3 kb) y 10 kb de la región aguas arriba incluyen la región diferencialmente metilada (DMR) que regulan el silenciamiento de IGF2 se obtuvieron de S. Tilghman (Universidad de Princeton) y se mantuvieron criando hembra de tipo salvaje C57B/6J y machos H19 +/-.

45 Los ratones con expresión IGF2 bialélica y compañeros de camada de control se aislaron mediante el cruce de ratones H19 +/- hembras con ratones machos de tipo salvaje. Los ratones fueron genotipados mediante PCR que identifica un producto de 847 pb para el alelo de tipo salvaje y un producto de 1.000 pb para el alelo mutante, utilizando los siguientes cebadores: H19-F, TCC CCT CGC CTA GTC TGG AAG CA (SEQ ID NO: 1); Mutante-F, GAA CTG TTC GCC AGG CTC AAG (SEQ ID NO: 2); Común-R, ACA GCA GAC AGC AAG GGG AGG GT (SEQ ID NO: 3).

50

Dado que se sabe que la variación de cepa está asociada con el progreso de las lesiones, los controles de compañeros de la camada fueron tratados con y sin una LOI, en que las madres eran heterocigotas para una delección de la región diferencialmente metilada (DMR) H19; la herencia de un alelo materno que carece de la DMR

conduce a la activación de un alelo normalmente silencioso de *Igf2* [LOI (+)], mientras que la herencia de un alelo materno de tipo salvaje conduce a una impronta normal [LOI (-)].

Análisis de microarrays.

En una evaluación piloto inicial, el ARN total fue extraído de intestino recién congelado y de espesor total utilizando el kit RNeasy, evaluado mediante un bioanalizador (Agilent), y 2.7 µg de ARN total se marcó y se hibridó a un microarray de ratón 44k de National Institute on Aging (NIA) (Versión 2.0, fabricado por Agilent, nº 12463). Inicialmente se compararon dos conjuntos de 6 muestras, tres LOI (+) de machos con tres LOI (-) de hembras, y un análisis separado de tres LOI (+) de hembras y tres LOI (-) de machos, confirmando la sensibilidad de la comparación por la detección de diferencias en función del género conocidos, incluyendo Xist, Eif2s3y y Ddx3y. El análisis estadístico se realizó utilizando el software de análisis del array NIA (Sharove et al., Bioinformatic (2005) 21-2548-2549). Se analizaron los genes que muestran cambios consistentes y estadísticamente significativos ($P \leq 0,05$) en ambos conjuntos en cuanto al enriquecimiento en categorías de Ontogenia de Genes utilizando el Índice de Genes de Ratón de NIA (Ver. MM5) * Sharov et al, Genome Res (2005) 15:748-754). Esto se puede encontrar en la página web del Índice de Genes de Ratón de NIA organizado por los Institutos Nacionales de Salud, Bethesda Maryland. Para la validación, se recogieron de manera similar 14 muestras de ARN LOI (-) y 14 muestras de ARN LOI (+) y se utilizaron para la RT-PCR en tiempo real.

Para detectar el cambio en la expresión génica en células progenitoras intestinales de una manera más definitiva, se realizó la microdissección de captura por láser (LCM) para aislar células de las criptas intestinales. Los portaobjetos se trataron previamente con RNazap (Ambion), se enjuagaron con agua tratada con DEPC, se secaron y se irradiaron por UV, a continuación, los intestinos congelados fueron embebidos en OCT, se seccionaron a 10 µm y se fijaron con etanol al 70% en los portaobjetos. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina (Sigma), se deshidrataron y se utilizaron para la LCM en el espacio de una semana. 5.000-13.000 criptas intestinales fueron disecadas mediante LCM de cada uno de tres ratones LOI (+) y LOI (-), y se recogieron 2-6 µg de ARN utilizando el kit RNeasy (Qiagen). Se utilizaron 1,7 µg de ARN total de cada una de las muestras para el marcaje, y la expresión génica se analizó con un microarray de ratón 44k de NIA (Ver 2.1, fabricado por Agilent, nº 014117). Los genes fueron examinados en cuanto al enriquecimiento estadísticamente significativo en las categorías de Ontogenia de Genes.

Para la validación, la LCM se realizó en 12 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-) adicionales, aislando aproximadamente 800 criptas que proporcionan más de 300 ng de ARN total de cada uno. Las muestras de ARN fueron transcritas inversamente utilizando SUPERSRIPT II (Invitrogen), y se cuantificaron utilizando Reactivos de Núcleo PCR SYBR Green y un Sistema de Detección de la Secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems), y normalizado a β-actina. Los cebadores y las temperaturas de reasociación se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores para RT-PCR en tiempo real.

Genes	Cebadores (directo; inverso; temperatura de reasociación; longitud del producto)
Igf2	cat cgt gga aga gtg ctg ct (SEQ ID NO: 4); ggg tat ctg ggg aag tcg t (SEQ ID NO: 5); 62 °C; 132 pb
Axina 2	aac aca gaa gac agc tcc tca (SEQ ID NO: 6); gtc tga atc gat ggt aaa cct g (SEQ ID NO: 7); 59 °C; 166 pb
Tiam1	cac ttc aag gag cag ctc agc (SEQ ID NO: 8); gct cag tcg atc ctc tcc ac (SEQ ID NO: 9); 59°C; 190 pb
Rpa2	atg gat gtt cgt cag tgg gtt (SEQ ID NO: 10); cca gag gaa tga tct taa agg c (SEQ ID NO: 11); 60°C; 145 pb

ES 2 543 015 T3

	Card11	gaa gac gag gtg ctc aat gc (SEQ ID NO: 12); cct ttg tcc ctt ggt gtg aa (SEQ ID NO: 13); 60°C; 90 pb
	Ccdc5	ggg aca tca gcc tgg taa tag a (SEQ ID NO: 14); ctt aga cag att ggc agg tga a (SEQ ID NO: 15); 60°C; 122 pb
5	Cdc6	tgt gga gtc gga tgt cag ga (SEQ ID NO: 16); ggg ata tgt gag caa gac caa (SEQ ID NO: 17); 60°C; 107 pb
	Mcm5	cca ggt cat gct caa gtc aga (SEQ ID NO: 18); gaa tgg aga tac gag tag cct t (SEQ ID NO: 19); 60°C; 140 pb
10	Mcm3	cgc aga gag act act tgg act tc (SEQ ID NO: 20); agc cga tac tgg ttg tca ctg (SEQ ID NO: 21); 60°C; 97 pb
	Skp2	agt caa ggg caa agg gag tg (SEQ ID NO: 22); gag gca cag aca gga aaa gat (SEQ ID NO: 23); 60°C; 136 pb
	Chaf1a	tcc cag tga aga ggt taa tac aag (SEQ ID NO: 24); gat gtg tct tcc tca act ttc tc (SEQ ID NO: 25); 60°C; 85 pb
15	Lig1	cgg aca ttt gag aag att gcg g (SEQ ID NO: 26); aga tag aga aca ggg agc aag tc (SEQ ID NO: 27); 60°C; 119 pb
	Gmnn	tga aaa taa gga tgt tgg aga cc (SEQ ID NO: 28); gcc act tct ttc caa tac tga g (SEQ ID NO: 29); 60°C; 90 pb
20	Rfc3	cca cct tga agt taa tcc cag t (SEQ ID NO: 30); tgt cca cct ctg tca ata ata cc (SEQ ID NO: 31); 60°C; 143 pb
	Ccne1	agt tct tct gga ttg gct gat g (SEQ ID NO: 32); gta acg atc aaa gaa gtc ctg tg (SEQ ID NO: 33); 60°C; 91 pb
	Msil	tgc tgg gta ttg gga tgc t (SEQ ID NO: 34); tcg ggg aac tgg tag gtg ta (SEQ ID NO: 35); 60°C; 103 pb
25	p21	aca gcg ata tcc aga cat tca ga (SEQ ID NO: 36); cga aga gac aac ggc aca ct (SEQ ID NO: 37); 60°C; 99 pb
	β-actina	atac cac cat gta ccc agg ca (SEQ ID NO: 38); gga gga gca atg atc ttg at (SEQ ID NO: 39); 60°C; 93 pb

30 Establecimiento de Células Madre Embrionarias (ES) de ratón Células y Fibroblastos Embrionarios de Ratón

Se realizó un apareamiento temporizado entre ratones mutantes H19 hembras y ratones de tipo salvaje machos después de la inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada, dos días más tarde seguido de 5 UI de gonadotropina coriónica humana. El día embrionario 13,5 se aislaron embriones, se digirieron con tripsina, se sembraron en placas de cultivo celular de 10 cm y se separaron dos veces en 1: 3-1: 4 antes de ser congelados. ADN genómico fue extraído para el genotipado de *H19* (identificando así el estado LOI). Para las células ES, el apareamiento temporizado se realizó entre ratones mutantes *H19* hembras de 4 semanas de edad y ratones de tipo salvaje machos de 8-10 semanas de edad. El día embrionario 3,5, los úteros fueron enjuagados y los embriones se recogieron y se cultivaron según se describe por Cowan et al., ES Cell Targeting Core Laboratory, 2006). Las excrecencias de masa celular interna se aspiraron y se sembraron. Ocho clones se ampliaron con éxito en platos de 3,5 cm. Para los ensayos del tamaño de las colonias ES, células ES y células de la capa de alimentación se tripsinizaron y se sembraron en placas revestidas de gelatina durante 30 minutos para dejar que se fijaran las células de la capa de alimentación, y el sobrenadante se aspiró y se sometió a este proceso una vez más. La población de ES predominantemente no adherida se contó, y 1.000 células se sembraron en una capa de alimentación en una placa de 6 pocillos el día 0, midiendo los tamaños de 15-30 colonias ES elegidas al azar os días 1 a 6. Los ensayos de la tasa de crecimiento ES se realizaron en medio Complete Clonal Grade ESGRO (Chemicon). Después de recoger predominantemente la población ES no adherida como anteriormente, las células

se dividieron a una densidad 1:4 dos veces más en medio completo ESGRO para eliminar cualquier célula de la capa alimentadora. 200.000 células ES se sembraron luego en una placa de 6 pocillos revestida de gelatina sin una capa de alimentación el día 0, y el número de células se determinó los días 1, 2, 3 y 4. El análisis se realizó por triplicado, y ciego para el genotipo.

- 5 Para la estimulación de IGF2, se aislaron las células ES de tipo salvaje según se describe anteriormente y se cultivaron en medio basal completo ESGRO con 800 ng/ml de proteína recombinante Igf2 de ratón (StemCell Technologies), con o sin NVP-AEW541 3 μ M (Novartis). Las células se lavaron con PBS dos veces y el ARN se extrajo utilizando el Kit RNeasy (QIAGEN) en 0 h, 3 h, 6 h, 10 h y 24 h. La expresión génica se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real según se describe anteriormente.

10 Administración in vivo de azoximetano y NVP-AEW541.

- Controles de compañeros de camada de 7 semanas de edad LOI (+) y LOI (-) fueron tratados con AOM a razón de 10 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal una vez por semana durante tres semanas, y fueron sacrificados 5 semanas después de la primera dosis de AOM. Todo el colon fue reseccionado de los ratones después de laparotomía, enjuagado con PBS, llenado de formalina tamponada al 10% (Sigma) durante un minuto, se abrió longitudinalmente, se fijó en un plano entre papel de filtro en formalina a 4°C durante la noche, se aclararon con PBS y se tiñeron con azul de metileno al 0,2% en solución salina. El número de ACF por colon y el número de criptas aberrantes por ACF se obtuvo bajo un microscopio óptico según se describió previamente Bird, Cancer Lett (1987) 37:147-151. NVP-AEW541 (50 mg/kg) se administró por sonda oral, comenzando 1 semana antes del tratamiento con AOM, y NVP-AEW541 se administró 7 días/semana, dos veces al día durante 5 días de la semana y una vez al día durante 2 días del fin de semana, durante 6 semanas hasta el sacrificio.

Ensayos en la Cámara Microfluídica.

- El dispositivo de automatización de la inmunotinción consiste en un chip de PDMS de 2 capas monolítico sellado con un cubreobjetos de vidrio, fabricado utilizando técnicas descritas previamente (Unger et al, Science 288 (2000) 288:113-116). Válvulas de multiplexación fueron accionados por tuberías de presión conectadas a las válvulas de solenoide fuera del dispositivo. La arquitectura del chip, el rendimiento y la validación están descritos todos en un manuscrito separado presentado para su publicación. El sustrato de vidrio de la cámara de cultivo celular se revistió mediante la introducción de gelatina al 0,1% (Sigma) en el dispositivo durante al menos 30 minutos, a continuación se introdujeron las células y se dejó que se fijaran durante 3 horas. IGF2 (StemCell Technologies) disuelto en medio celular se introdujo en cada una de las cámaras en diferentes momentos, de manera que coincidió el final de todos los periodos de estimulación. Para finalizar el experimento, se introdujo PBS (Invitrogen) enfriado con hielo en todas las cámaras, seguido inmediatamente por paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Systems) durante 20 minutos. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (Sigma) durante 5 min y se bloquearon con suero de cabra al 10% (Sigma), con lavados de PBS entremedias. Las células se incubaron en la relación 1:100 de anticuerpo primario anti-fosfo-Akt (Ser 473, Upstate) en disolución de bloqueo durante 1 hora, se lavaron en PBS, después se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con Alexa 488 1:200 (Invitrogen), Hoechst 33258 1:500 (Sigma), más faloidina Rojo Texas 1:40 (Invitrogen) en disolución de bloqueo durante 1 hora. Finalmente, las células se lavaron y se mantuvieron en PBS para evitar el secado durante la formación de imágenes. La formación de imágenes se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss invertido motorizado, equipado con una cámara Cascade 512B CCD. El uso de los programas de MATLAB personalizados (Mathworks), las imágenes fueron corregidas por Hatfield, cosidas y cuantificados. Brevemente, se utilizó la imagen de Hoechst para determinar la región nuclear para cada una de las células y la intensidad media de tinción en esta región se comparó con el fondo. Para cada uno de los tipos de célula e instantes, se analizaron 200-300 células de esta manera para asegurar la significancia estadística.

- Puesto que tanto el IGF2 endógeno como el IGF2 utilizado en los experimentos MEF son susceptibles a la inactivación basada en la proteína de unión a IGF2 (IBP), la dosis de una variante de IGF2 IBP-resistente se determinó produciendo niveles similares de activación de Akt. Se encontró que este nivel era aproximadamente 50 ng/ml (6,5 nM; la activación de Akt es equivalente a la obtenida en aproximadamente 600 ng/ml de IGF1 sensible a IBP), comparable a los kD previamente estimados de IGF1R para IGF2 (1-10 nM), lo que indica que no se alcanzó la saturación del receptor. Estos resultados sugieren que los experimentos se llevaron a cabo en un régimen de sub-saturación, incluido el caso cuando la dosis de IGF2 sensible a IBP se aumentó hasta 1600 ng/ml.

- Teniendo en cuenta que el efecto de la LOI de IGF2 es sólo un cambio doble en la expresión génica y de proteínas (Sakatani et al., Science 307 (2005) 307:1976-1978) se diseñó un enfoque para detectar con suficiente poder estadístico cambios de modestos a moderados en la expresión génica aguas abajo. Los experimentos preliminares se realizaron primero comparando la expresión génica en el intestino de espesor total derivado de 6 compañeros de camada LOI (+) y 6 compañeros de camada LOI (-), mediante la extracción de ARN y la hibridación a un microarray de ratón 44K de oligo 60-meros que representan 23.933 genes (Carter et al., Genome Biol (2005) 6:R61). Se encontraron 508 genes con una expresión incrementada y 147 genes con una expresión disminuida en el intestino

de ratones LOI (+). Las anotaciones de la Ontología de Genes (GO) mostró que entre los genes sobre-expresados en el intestino de ratones LOI (+), hubo una sobre-representación en la expresión intestinal en ratones LOI (+) de genes que muestran una expresión incrementada implicados en la replicación del ADN ($P < 10^{-10}$), ciclo celular ($P < 10^{-7}$), y categorías de la biosíntesis del colesterol y el metabolismo (en cada caso $p < 10^{-12}$), y de genes que muestran una expresión disminuida implicados en el metabolismo de hidratos de carbono, glucosa y monosacáridos (en cada caso $P < 10^{-15}$) (Tabla 2).

Tabla 2. Genes con diferencias significativas en la expresión en ratones LOI (+) encontrados por el análisis de microarrays de criptas microdisseccionadas de captura por láser.

10	Supra-regulado en LOI					
	Categoría de anotación GO	Genes supra-regulados en categoría	Genes supra- regulados anotados GO	Genes anotados GO totales en categoría	Genes anotados GO totales	Valor P
15						
	Biosíntesis de colesterol	5	312	17	12933	10^{-12}
	Metabolismo de colesterol	8	312	41	12933	10^{-12}
	Metabolismo de esteroles	8	312	44	12933	10^{-11}
20	Biosíntesis de esteroles	5	312	19	12933	10^{-11}
	Replicación de ADN y ciclo del cromosoma	13	312	103	12933	10^{-11}
	Replicación de ADN	11	312	83	12933	10^{-10}
	Metabolismo de ARN	20	312	252	12933	10^{-8}
25	Ciclo celular	32	312	527	12933	10^{-7}
	Metabolismo de esteroides	10	312	92	12933	10^{-7}
	Unión de ARN	23	312	354	12933	10^{-6}
	Proliferación celular	36	312	692	12933	10^{-6}
	Desarrollo muscular	9	312	92	12933	10^{-5}
30	Actividad del factor de corte y empalme de pre-ARNm	5	312	35	12933	10^{-5}
	Biosíntesis de esteroides	6	312	49	12933	10^{-5}
	Mitosis	8	312	82	12933	10^{-5}
	Unión de ácidos nucleicos	81	312	2185	12933	10^{-5}

ES 2 543 015 T3

	Fase M del ciclo	8	312	83	12933	10 ⁻⁵
	cellular mitótico					
	Metabolismo de	79	312	2142	12933	10 ⁻⁴
	nucleósidos, nucleótidos					
5	y ácidos nucleicos					
	Metabolismo	157	312	5100	12933	10 ⁻⁴
	Ciclo celular mitotic	10	312	129	12933	10 ⁻⁴
	Procesamiento de ARN	13	312	196	12933	10 ⁻⁴
	Contracción muscular	6	312	60	12933	10 ⁻⁴
10	División nuclear	9	312	115	12933	10 ⁻⁴
	Crecimiento celular y/o	102	312	3061	12933	10 ⁻⁴
	mantenimiento					
	Constituyente estructural	8	312	98	12933	10 ⁻⁴
	del citoesqueleto					
15						
	Sub-regulado en LOI					
	Categoría de anotación GO	Genes	Genes supra-	Genes	Genes	Valor P
		supra-regulados	regulados	anotados GO	anotados	
20		en categoría	anotados GO	totales en	GO totales	
			totales	categoría		
	Metabolismo de glucosa	7	73	76	12933	10 ⁻¹⁵
	Derivación de energía por	8	73	112	12933	10 ⁻¹⁵
25	oxidación de compuestos					
	orgánicos					
	Vías de energía	8	73	115	12933	10 ⁻¹⁵
	Metabolismo de hexosa	7	73	94	12933	10 ⁻¹⁵
	(continúa)					
30						

Sub-regulado en LOI

	Categoría de anotación GO	Genes supra-regulados en categoría	Genes supra- regulados anotados GO totales	Genes anotados GO totales en categoría	Genes anotados GO totales	Valor P
5	Metabolismo de monosacáridos	7	73	95	12933	10^{-15}
10	Vías principales del metabolismo de hidratos de carbono	6	73	80	12933	10^{-15}
	Metabolismo de hidratos de carbono	10	73	271	12933	10^{-11}
15	Metabolismo del alcohol	7	73	162	12933	10^{-10}
	Metabolismo de lípidos	8	73	379	12933	10^{-4}

20 Una limitación de este análisis es que se basó en el intestino de espesor total, sin embargo el compartimiento de células progenitoras, es decir, criptas, está específicamente alterado histopatológicamente en LOI (Sakatani et al. (2005)). Por lo tanto la expresión génica específica para el compartimiento fue examinado microdisseccionando una media de 8.000 criptas de cada uno de 3 ratones LOI (+) y 3 ratones LOI (-), proporcionando > 2 µg de ARN de cada uno de los ratones, suficiente para un experimento de microarray independiente. Este análisis reveló un subconjunto más limitado de genes expresados diferencialmente en criptas LOI (+), con 283 genes con una expresión incrementada y 109 genes con una expresión disminuida (Tabla 3).

25

Tabla 3. Lista de Genes con Diferencia Significativa ($P < 0,01$) en el Análisis Microarrav de Criptas Microdisseccionadas de Captura por Láser (Supra-regulados en LOI(+)).

Caracterizado	Media (H19 ts LOI (+))	Media (H19 ts LOI (-))	Relación Log	Veces de cambio	P	FDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes ruido 'U'	Acc. RefSeq	Acc. GenBank	MGI
Z00054923-1	3.2334	2.99251	0.24089	1.74 1	0	0	0 4933412E14Rik	gen RIKEN cDNA 4933412E14	U010S08	NM_173778.2	AK03152 3	
Z00058818-1	3.1107	2.87631	0.23439	1.71 5	0	0	0 Eil3	Factor de alargamiento de Mus musculus ARN polimerasa II-tipo 3 (Eil3), ARNm	U023264	NM_145973	BC03418 1	
Z0005006-1	3.0028	2.81491	0.18789	1.54 1	0	0.0002	0 Fads1	ácido graso desaturasa 1	U019152	NM_146094.1	AB07297 6	
Z00034337-1	3.2028	3.00401	0.19879	1.58	0	0.0004	0 Utp14b, Acs13	UTP14, ribonucleoproteína nucleolar pequeña U3, homólogo B (levadura)	U000484	NM_001001	AK01208 8	MGI:19214 55
Z00025331-1	2.6919	2.51421	0.17769	1.50 5	0	0.0005	0 Agxt	alanina-glioxilato aminotransferasa	U000625	NM_016702	AF02773 0	MGI:13290 33
Z00042824-1	3.0136	2.85091	0.16269	1.45 4	0	0.0036	0 LOC328644	gen hipotético de Mus musculus soportado por AK045595 (LOC328644), ARNm	U016925	NM_198629	BC03205 5	
Z00001868-1	3.1896	3.0162	0.1734	1.49	0	0.0036	0 Skp2	proteína 2 asociada a quinasa fase S (p45)	U042092	NM_013787	AF08321 5	MGI:13516 63
Z00036538-1	3.4269	3.22431	0.20259	1.59 4	0	0.0046	0 Pcsk5	proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 5	U038896	XM_129214	AK03273 6	MGI:97515
Z00045684-1	3.7357	3.5183	0.2174	1.64 9	0	0.005	0 Card11	familia del dominio de reclutamiento de caspasa, miembro 11	U026896	NM_175362	AK00234 6	MGI:19169 78
Z00031491-1	2.6652	2.5094	0.1558	1.43 1	0	0.005	0 4833432E10Rik	gen RIKEN cDNA 4833432E10	U033757		AK01952 0	
Z00061761-1	2.8658	2.7094	0.1564	1.43 3	0	0.0075	0 4122402022Rik	gen RIKEN cDNA 4122402022	U016876	NM_029945	AK01946 6	
Z00037841-1	2.8932	2.6632	0.23	1.69 8	0	0.0077	0 1300015B04Rik	gen RIKEN cDNA 1300015B04	U019163	XM_129157	AK00501 0	
Z00046478-1	3.0371	2.8659	0.1712	1.48 3	0	0.0098	0 1110030E23Rik	gen RIKEN cDNA 1110030E23	U305624	NM_023546	BC00541 3	
Z00059432-1	2.6639	2.51711	0.14679	1.40 2	0	0.0132	0 Ssty2	transcrito específico para espermiogénesis en el Y2	U106390	NM_023546	AK00649 4	MGI:19172 59
Z00025935-1	3.2068	3.04591	0.16089	1.44 8	0	0.0132	0 H2-13	histocompatibilidad 2, región T locus 3	U121934	NM_008208	AK03360 2	MGI:95959
Z00041427-1	3.0198	2.80481	0.21499	1.64	0	0.0163	0 2810451E09Rik	gen RIKEN cDNA 2810451E09	U010411		BC05013 3	
Z00063107-1	2.8184	2.6746	0.1438	1.39 2	0	0.0192	0 BC049987	secuencia de cDNA BC049987	U091699		BC04278 9	
Z00000414-1	2.9182	2.7672	0.151	1.41	0	0.0203	0 Cdc6	homólogo del ciclo 6 de división celular	U013318	NM_011799	AJ00955	MGI:13451

1				5				0.0454	0	1.49	0.1732	3.3472	3.5204					0 Xylb	(S. cerevisiae)	homólogo de xiluloquinasa (H. influenzae)	U011136	XM_135223	AK180117	9	50
Z00054968-1				1.47	0	0.0463	0	0.0463	0	1.47	0.1692	3.51	3.6792					0 Ccne1		ciclina E1	U028449	NM_007633	AK089950	0	MGI:88316
Z00024521-1				1.86	0	0.0476	0	0.0476	0	1.86	0.2696	3.2012	3.4708					0 Es22		esterasa 22	U030102	NM_133600	BC019208	8	MGI:95432
Z00056317-1				1.51	0	0.0541	0	0.0541	0	1.51	0.17919	3.27661	3.4558					0 Tubgcp2		tubulina, proteína 2 asociada a complejo gamma	U029416	NM_133755	AK006233	3	AK00623
Z00036351-1				1.39	0	0.0658	0	0.0658	0	1.39	0.1434	3.0925	3.2359					0 Tiam1		invasión de linfoma de células T y metástasis 1	U037282	NM_009384	AK015851	1	AK01585
Z00016029-1				1.62	0	0.0663	0	0.0663	0	1.62	0.21109	3.12741	3.3385					0 Cyp51		citocromo P450, familia 51	U005278	NM_020010	AF166261	6	AF16626
Z00030278-1				1.51	0	0.0693	0	0.0693	0	1.51	0.1817	3.8853	4.067					0 Hook1		gancho homólogo 1 (Drosophila)	U094513	NM_030014	AF487913	2	MGI:1925213
Z00012265-1				1.54	0	0.0693	0	0.0693	0	1.54	0.18899	2.97191	3.1609					0 Acs11		acil-CoA-sintetasa miembro 1 de la familia de cadena larga	U042901	NM_007981	AK004897	2	MGI:102797
Z00023230-1				1.49	0	0.0693	0	0.0693	0	1.49	0.1748	3.4913	3.6661					0 Chfr18		CTF18, homólogo de factor 18 de fidelidad de transmisión del cromosoma (S. cerevisiae)	U1137329	NM_145409	AK052673	3	AK05267
Z00031573-1				1.51	0	0.0706	0	0.0706	0	1.51	0.18029	2.66801	2.8483					0 D630032B01Rik		gen RIKEN cDNA D630032B01	U014667		AK034200	0	
Z00067701-1				1.67	0	0.0804	0	0.0804	0	1.67	0.22279	3.84881	4.0716					0 Sqle		escualeno epoxidasa	U016276	NM_009270	AK177904	4	MGI:109296
Z00005706-1				1.60	0	0.0937	0	0.0937	0	1.60	0.2066	3.7556	3.9622					0 Dhcr7		7-deshidrocolesterol reductasa	U008998	NM_007856	AF057368	8	
Z00056193-1				1.42	0	0.0991	0	0.0991	0	1.42	0.153	3.442	3.595					0 Recql		similar a proteína RecQ	U028003	NM_023042	AB017104	4	MGI:103021
Z00024438-1				1.40	0	0.1097	0	0.1097	0	1.40	0.1478	3.3202	3.468					0 Api2		complejo de proteína adaptadora AP-1, subunidad gamma 2	U035570	NM_007455	AF068707	7	MGI:1328307
Z00057560-1				1.50	0	0.1121	0	0.1121	0	1.50	0.17849	3.78041	3.9589					0 Ccdc5		dominio helicoidal que contiene 5	U038586	NM_146089	AK076912	2	MGI:2385076
Z00064946-1				1.50	0	0.1121	0	0.1121	0	1.50	0.17649	2.94551	3.122					0		clon de cDNA de mab5b05.yl Soares_thymus_2NMitt Mus musculus IMAGE:3974360	U207713				
Z00030628-1				1.42	0	0.1194	0	0.1194	0	1.42	0.15479	3.45611	3.6109					0 Atr		relacionado con ataxia telangiectasia y rad3	U010868	XM_147046	AF236887	7	
Z00004187-1				1.38	0	0.1194	0	0.1194	0	1.38	0.14239	3.27891	3.4213					0 Mthfd11		similar a mientetrahidrofolato deshidrogenasa (NADP+	U043043	NM_172308	AK038579	2	MGI:1924836

Z00039591-1	3.3066	3.1517	0.1549	1.428	0.0001	0.1265	0		dependiente tipo 1					
Z00023555-1	3.0385	2.89841	0.14009	1.38	0.0001	0.1309	0 Camkk2		Intronic en U011136					
Z00028093-1	3.6434	3.4986	0.1448	1.395	0.0001	0.1325	0		proteína quinasa quinasa 2, beta dependiente de calcio/calmodulina	U026700	NM_145358	AF45338		
Z00048288-1	4.3701	4.15621	0.21389	1.636	0.0001	0.1442	0 Fdps		gen RIKEN cDNA 2810442121	U041127	NM_488587	AK01329		
Z00023083-1	3.3917	3.25831	0.13339	1.359	0.0002	0.1607	0 Cep2		farnesil difosfato sintetasa	U024268	NM_134469	AF30950	MGI:104888	
Z00015315-1	3.1639	3.03671	0.12719	1.34	0.0002	0.1655	0		proteína 2 centrosomal	U002712	NM_358344.2	AK03328	MGI:108084	
Z00036599-1	3.7987	3.6391	0.1596	1.444	0.0002	0.1801	0 Dhfr		Intronic en U010432					
Z00065590-1	3.3529	3.2205	0.1324	1.356	0.0002	0.1801	0		dihidrofolato reductasa	U043357	NM_010049.2	AK01846		
Z00049973-1	3.2054	3.0435	0.1619	1.451	0.0002	0.1861	0 Aqp4		clon mib34038 del banco de isletas pancreáticas de ratón BP760469 (C57BL/6)	U289533				
Z00032284-1	2.7959	2.67641	0.11949	1.316	0.0002	0.189	0		acuaporina 4	U038230	NM_009700.1	AF46916		
Z00058906-1	2.7194	2.58591	0.13349	1.359	0.0003	0.2048	0 Cxcl13		gen RIKEN cDNA 9030223M17	U029345		AK19759		
Z00039910-1	3.1177	2.9447	0.173	1.489	0.0003	0.2216	0		quimioquina (motivo C-X-C) ligando 13	U005820	NM_018866	AF03063	MGI:1888499	
Z00017899-1	3.5261	3.34581	0.18029	1.514	0.0003	0.2387	0		GTPasa, miembro 5 de la familia IMAP	U006828	NM_008376	AB12696	MGI:109368	
Z00009873-1	3.9996	3.83071	0.16889	1.475	0.0004	0.2387	0 Tipin		proteína interactuante independiente del tiempo	U010614	NM_025372	AK00345		
Z00022812-1	3.1271	3.00071	0.12639	1.337	0.0004	0.2387	0 Rgn		factor 1 de conjunto de cromatina, subunidad A (p150)	U018124	NM_013733	AJ13277	MGI:1351331	
Z00021858-1	3.4641	3.3326	0.1315	1.353	0.0004	0.2387	0 Gstm2		regucalcina	U019745	NM_009060	BC01271	MGI:108024	
Z00063291-1	3.5687	3.43	0.1387	1.376	0.0004	0.2387	0		glutathion-S-transferasa, mu 2	U024511	NM_008183	AK00284	MGI:958614	
Z00034074-1	4.2369	4.0658	0.1711	1.482	0.0003	0.2387	0		cDNA de XS0248 Sanger Institute Gene Trap Library pGT01xf Mus musculus	U232236		BC02380		
									Intronic en U032497					

Z00064826-1	3.5627	3.41801	0.14469	1.39 5	0.000 4	0.2387	0	Intronic en U137329					
Z00036331-1	3.0988	2.8995	0.1993	1.58 2	0.000 4	0.2407	0 Lss	lanosterol sintasa	U011679	NM_146006	AK01474 2	MGI:13361 55	
Z00002113-1	3.4768	3.34341	0.13339	1.35 9	0.000 4	0.2407	0	gen RIKEN cDNA 5730467H21	U026415	NM_175270	AK01996 6		
Z00039674-1	3.8528	3.66551	0.18729	1.53 9	0.000 4	0.2407	0 Ccdc5	dominio helicoidal que contiene 5	U038586	NM_146089	AK07691 2	MGI:23850 76	
Z00027757-1	2.8217	2.70851	0.11319	1.29 7	0.000 4	0.2416	0 Cels	ligando 5 de quimioquina (motivo C-C)	U033194	NM_013653	AF06594 4	MGI:98262	
Z00025217-1	3.7874	3.6329	0.1545	1.42 7	0.000 4	0.2461	0 Gstm1, Gstm3	glutatio S-transferasa, mu 1	U024510	NM_010358	BC00382 2	MGI:95860	
Z00017140-1	3.6109	3.4684	0.1425	1.38 8	0.000 5	0.2551	0 Sico4a1	familia de transportador de aniones org ánicos soporte soluto, miembro 4a1	U002955	NM_148933	AK03359 8	MGI:13518 66	
Z00011792-1	3.6164	3.44641	0.16999	1.47 9	0.000 4	0.2551	0	cDNA de Mus musculus, clon: Y2G0138J04, cadena: no especificada	U032917		AK02934 6		
Z00030949-1	2.6224	2.50421	0.11819	1.31 2	0.000 5	0.2566	0 Phf1, Kric5a, Kric	proteína 1 del dedo de PHD	U017715	NM_009343	AB01155 0	MGI:10959 6	
Z00012481-1	3.2295	3.07921	0.15029	1.41 3	0.000 5	0.2784	0 Hells	helicasa, linfoide específica	U043725	NM_008234	AF15521 0	MGI:10620 9	
Z00000572-1	3.939	3.7796	0.1594	1.44 3	0.000 6	0.2903	0 Hcfc1	factor C1 de células huésped	U039463	NM_008224	AJ62703 6	MGI:10594 2	
Z00050996-1	3.5225	3.3676	0.1549	1.42 8	0.000 6	0.3018	0 Nr1h3	receptor nuclear subfamilia 1, grupo 1, miembro 3	U022046		AK01226 4	MGI:13463 07	
Z00056657-1	4.1221	3.94051	0.18159	1.51 9	0.000 6	0.3018	0 Kpnbl	karioferina (importina) beta 1	U033336	NM_008379	AK07770 9	MGI:10753 2	
Z00002447-1	2.7774	2.6483	0.1291	1.34 6	0.000 6	0.3018	0 Pcdh21	protocadherina 21	U035424	NM_130878	AF42639 3	MGI:21577 82	
Z00062882-1	3.8845	3.7279	0.1566	1.43 4	0.000 6	0.3076	0	gen RIKEN cDNA 8430438L13Rik, 8430437P03Rik	U042912	NM_026636	AK00336 6		
Z00067400-1	2.7336	2.62171	0.11189	1.29 3	0.000 7	0.3114	0						
Z00059675-1	3.4371	3.28581	0.15129	1.41 6	0.000 7	0.3319	0		U056194				
Z00019258-1	3.428	3.27631	0.15169	1.41 8	0.000 7	0.3326	0 Rpa2	proteína de replicación A2	U004904	NM_011284	AK01153 0	MGI:13399 39	
Z00010627-1	3.316	3.19221	0.12379	1.32	0.000	0.3326	0 Mifl1ip	factor de leucemia mieloide 1	U009317	NM_027973	AK00647		

1				9	7	0.3326	0 Ttc7		proteína interactuante	dominio 7 de repetición de tetraico péptido	U018321	NM_028639	AK004107	MGI:192099
Z00000815-1	3.3002	3.17361	0.12659	1.338	0.000	0.3326	0 Ttc7		proteína 4 de unión a forma	canal de potasio activado por tensión, subfamilia relacionada con Isk, gen 3	U002103	NM_018828	AK012167	MGI:1860513
Z000035861-1	3.0981	2.9858	0.1123	1.295	0.000	0.3335	0 Fbnp4		proteína ribosomal L12	receptor 133 acoplado a proteína G	U008447	NM_020574	AF076532	MGI:1891124
Z000024246-1	4.3101	4.147	0.1631	1.455	0.000	0.3335	0 Kcne3		Intronic en U023392	gen RIKEN cDNA 9630044O09Rik	U093913	NM_009076	AK002973	
Z000064273-1	3.4067	3.27701	0.12969	1.348	0.000	0.3407	0 Rpl12		mitofusina 2	dominios 1 ricos en LIM y cisteína	U006227	XM_485685	AK041279	MGI:2443230
Z000026347-1	3.1056	2.9928	0.1128	1.296	0.000	0.341	0 Gpr133		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U007256	NM_144799	AK075847	MGI:1353635
Z000018506-1	3.924	3.77061	0.15339	1.423	0.000	0.3564	0		cdna de Mus musculus, clon: Y0G0107H23, cadena: no especificada	gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	U023541		AK009222	
Z000038722-1	2.9385	2.8286	0.1099	1.287	0.000	0.3623	0		familia 7 de soporte de soluto (transportador de aminoácidos catiónico, sistema y+), miembro 4	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U042213		AK014551	
Z000036329-1	3.4772	3.3526	0.1246	1.332	0.000	0.3719	0 Mfn2		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000049396-1	3.0982	2.92241	0.17579	1.498	0.001	0.3727	0 Lmcd1		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000014716-1	3.8405	3.6959	0.1446	1.395	0.001	0.3727	0		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000036621-1	2.7404	2.6376	0.1028	1.267	0.001	0.3727	0		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000062670-1	3.6261	3.4985	0.1276	1.341	0.001	0.3796	0 Slc7a4		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000023B94-1	3.9846	3.8282	0.1564	1.433	0.001	0.3797	0 Brf1		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000062561-1	2.7113	2.58971	0.12159	1.323	0.001	0.3797	0		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000066763-1	2.6113	2.50001	0.11129	1.292	0.001	0.3797	0		gen RIKEN cDNA 4930467M19Rik	homólogo BRF1, subunidad de factor IIB de iniciación de transcripción de ARN polimerasa III	U036847	NM_144852	AK030586	MGI:1919558
Z000034843-1	3.6621	3.53081	0.13129	1.352	0.001	0.3801	0 Rpa1		proteína de replicación A1 (Rpa1) de Mus musculus, ARNm	proteína de replicación A1 (Rpa1) de Mus musculus, ARNm	U033076	NM_026653	AK014298	MGI:1915525

Z00043376-1	3.6814	3.5143	0.1671	1.46	0.001	0.3801	0 A vpi1	1 inducido por arginina-vasopresina	U039048	NM_027106	AK00924	MGI:19167
Z00006465-1	3.911	3.76651	0.14449	1.39	0.001	0.3808	0 Rdbp	proteína de unión a ARN RD (Rdbp) de Mus musculus, ARNm	U017872	NM_138580.1	AK01166	MGI:10274
Z00003096-1	4.0883	3.9331	0.1552	1.42	0.001	0.3808	0 Hnpu	ribonucleoproteína nuclear U heterogénea	U022128	NM_016805	AF07399	MGI:18581
Z0000B7941-1	3.374	3.2548	0.1192	1.31	0.001	0.3808	0					
Z00001219-1	3.4929	3.3157	0.1772	1.50	0.001	0.3834	0 Sgle	escualeno epoxidasa	U016276	NM_009270	AK17790	MGI:10929
Z00020602-1	3.3776	3.2519	0.1257	1.33	0.001	0.3834	0 Sec1511	SEC15-tipo 1 (S. cerevisiae)	U019415	NM_175353	AK07645	MGI:13516
Z00024047-1	2.8009	2.5887	0.2122	1.63	0.001	0.3834	0 Apoc3	apolipoproteína C-III	U030812	NM_023114	AK00290	
Z00062387-1	2.9495	2.8299	0.1196	1.31	0.001	0.3834	0	ADNc de timo de neonato de 16 días de Mus musculus, banco enriquecido de longitud completa	U031734		BC05710	
Z00039366-1	3.7831	3.6129	0.1702	1.47	0.001	0.3834	0 BC002236	secuencia de ADNc BC002236	U032530	NM_024475	AK04395	
Z00034898-1	3.3575	3.17891	0.17859	1.50	0.001	0.3834	0 Tef19	factor de transcripción 19	U037751	NM_025674	AK00423	
Z00002153-1	3.2493	3.11301	0.13629	1.36	0.001	0.3866	0 G430022H21R1	gen RIKEN cDNA G430022H21	U024610	NM_201638	AK08316	MGI:24429
Z00025366-1	3.7562	3.6189	0.1373	1.37	0.001	0.3878	0	ADNc de Mus musculus de hígado de ratón u156b02.x1	U275872			
Z00023298-1	2.6591	2.5147	0.1444	1.39	0.001	0.3889	0 Hengn	Sugano, clon IMAGE-1886379 hemogen	U025033	NM_053149	AF26924	MGI:21369
Z00070449-1	2.9073	2.797	0.1103	1.28	0.001	0.3889	0 Recql	tipo proteína RecQ	U028003	NM_023042	AB01710	MGI:10302
Z00006863-1	3.8254	3.6683	0.1571	1.43	0.001	0.3926	0 1500001M20R1k	gen RIKEN cDNA 1500001M20	U027747		AK00510	
Z00036075-1	3.1455	3.0336	0.1119	1.29	0.001	0.3926	0	Intronic en U008963				
Z00054675-1	2.8435	2.6398	0.2037	1.59	0.001	0.4076	0 AW146020	secuencia AW146020 (AW146020) expresada en Mus musculus, ARNm	U007062	NM_177884.2	AK03836	
Z00050086-1	3.3613	3.2424	0.1189	1.31	0.001	0.4286	0	gen RIKEN cDNA	U041187	XM_128172	AK00801	

1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Z00038315-1	3.206	3.0963	0.1097	1.287	0.0025	0.6264	0	1700011J10Rik	(ASF/SF2) (Sfrs1), ARNm	U001915	NM_183265.1	AK005870	
Z00020771-1	3.2682	3.1468	0.1214	1.322	0.0026	0.6264	0	1110054H05Rik	gen RIKEN cDNA 1700011J10 gen RIKEN cDNA 1110054H05	U013686	XM_126489.6	AK004247	
Z00031187-1	3.65	3.53051	0.11949	1.316	0.0026	0.6303	0	Xabl	proteína de unión 1 a XPA	U005445	NM_133756.2	AK010393	
Z00034358-1	3.0739	2.97001	0.10389	1.27	0.0027	0.6413	0	Cdc7	ciclo 7 de división celular (S. cerevisiae)	U005923	NM_009863.1	ABO18574	MGI:1309511
Z00025292-1	3.1178	2.86541	0.25239	1.788	0.0027	0.6414	1	Ghr1	grellina	U027740	NM_021488.3	AB035701	MGI:1930008
Z00066131-1	2.7464	2.64151	0.10489	1.273	0.0028	0.6526	0						
Z00025383-1	3.3237	3.0869	0.2368	1.725	0.0028	0.6533	0	Prss12	proteasa, serina, 12	U003815	NM_008939.1	AK186311	MGI:1100881
Z00036054-1	3.5299	3.3617	0.1682	1.472	0.0028	0.6575	0	Wdr36	neurotripsina (motopsina)	U043655	NM_144863.2	AK040339	MGI:1917819
Z00054215-1	3.3503	3.22221	0.12809	1.343	0.0029	0.6588	0	Xrcc5	dominio de repetición 36 de WD reparación defectuosa complementaria de reparación por rayos X en células de hámster chino 5	U000424	NM_009533.1	AF166486	MGI:104517
Z00061979-1	3.71	3.5885	0.1215	1.322	0.0029	0.6588	0	D2erid217c	segmento de ADN, Chr 2, ERATO, Doi 217, expresado	U022401		AK004380	
Z00025074-1	2.6688	2.57161	0.09719	1.25	0.003	0.6907	0	Nmb	neuromedina B	U028773	NM_026523.1	AK011929	
Z00013829-1	3.6609	3.5399	0.121	1.321	0.0031	0.6926	0	2310057G13Rik	gen RIKEN cDNA 2310057G13	U011383	XM_125542.3	AK178913	
Z00056422-1	3.6702	3.54721	0.12299	1.327	0.0031	0.6926	0	Tmem45b	proteína de membrana 45b	U030649	NM_144936.1	AK079262	
Z00034070-1	4.1723	4.02891	0.14339	1.391	0.0031	0.6926	0	Mmps18b	proteína mitocondrial ribosomal S18B	U037761	NM_025878.1	AB049954	
Z00045608-1	3.8746	3.74481	0.12979	1.348	0.0033	0.7043	0	Mmps10	proteína mitocondrial ribosomal S10	U018057	NM_183086.1	AK004151	MGI:1928139
Z00017027-1	2.8913	2.7571	0.1342	1.362	0.0033	0.7043	0	Dlat	dihidrolipoamida S-acetiltransferasa (componente E2 de complejo piruvato deshidrogenasa)	U030844	NM_145614.2	AK032124	MGI:2385311
Z00015249-1	3.1099	2.9461	0.1638	1.458	0.0032	0.7043	0			U078163			
Z00026870-1	3.3999	3.288	0.1119	1.29	0.003	0.7044	0	M13	metalionina 3	U009655	NM_013603	AK04982	MGI:97173

1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Z00021203-1	3.1712	3.03901	0.13219	1.355	0.0043	0.7925	0 Arf2	factor 2 de ADP-ribosilación	U013426	NM_007477.2	AK031259	
Z00041812-1	3.8477	3.6906	0.1571	1.435	0.0042	0.7925	0 Tmed1	dominio emp24 de transmembrana que contiene 1	U030583	NM_010744.1	AK212382	MGI:106201
Z00009656-1	3.2553	3.1506	0.1047	1.272	0.0043	0.7925	0 Fancd2	anemia de Fanconi, grupo de complementación D2	U042764	XM_132796.5	AK019136	MGI:2448480
Z00028025-1	4.5614	4.39981	0.16159	1.45	0.0042	0.7925	0 Trp53i5	proteína 5 inducible por Trp53	U099396	NM_178381.2	AK017334	MGI:1918595
Z00029849-1	4.1635	4.02	0.1435	1.391	0.0043	0.7926	0	ADNc de pulmón de neonato día 0 de Mus musculus, banco enriquecido de longitud completa RIKEN	U032598		AK083953	
Z00044031-1	3.2313	3.1115	0.1198	1.317	0.0043	0.7926	0	mab84f09.x1 NCI CGAP BC3 Mus musculus cDNA clon IMAGE:3977224	U106279		BC029762	
Z00006758-1	3.7	3.584	0.116	1.306	0.0044	0.7934	0 Dgat1	diacilglicerol O-aciltransferasa 1	U036345	NM_010046.2	AB057816	MGI:1333825
Z00008585-1	3.8229	3.7005	0.1224	1.325	0.0046	0.8062	0 BC034507	secuencia de ADNc BC034507	U005268	XM_131888.5	AK037413	
Z00054734-1	3.1809	3.04341	0.13749	1.372	0.0045	0.8062	0 Lig1	ligasa 1, ADN, ATP-dependiente	U007688	NM_010715.1	AK053906	MGI:101789
Z00034668-1	4.0857	3.95231	0.13339	1.359	0.0046	0.8062	0 Mcm3	deficiente 3 de mantenimiento de minicromosoma (S. cerevisiae)	U021161	NM_008563.1	AK088142	MGI:101845
Z00052909-1	2.9509	2.85761	0.09329	1.239	0.0047	0.8062	0 Pold3	polimerasa (ADN-dingida), delta 3, subunidad accesoria	U028908	NM_133692.1	AF294329	MGI:1915217
Z00005912-1	4.2487	4.1112	0.1375	1.372	0.0047	0.8062	0	gen RIKEN cDNA 2410015N17Rik	U029285	NM_023203.1	AF110764	
Z00010767-1	3.3725	3.25451	0.11799	1.312	0.0047	0.8062	0	gen RIKEN cDNA 9430038I01Rik	U029396	XM_133909.4	AK020460	
Z00025886-1	2.9947	2.87721	0.11749	1.31	0.0046	0.8062	0	gen RIKEN cDNA 2410016F19Rik	U031711	NM_026113.2	AK005261	
Z00055727-1	3.3595	3.2546	0.1049	1.273	0.0046	0.8062	0 Tfb2m	factor de transcripción B2, mitocondrial	U033926	NM_008249.1	AK090106	MGI:107937
Z00012324-1	3.073	2.95581	0.11719	1.309	0.0047	0.8062	0 Otd1	homólogo del gen del síndrome oral-facial-digital 1 (humano)	U039862	NM_177429.2	AJ278702	MGI:1350328
Z00035961-1	3.5861	3.4703	0.1158	1.305	0.0045	0.8062	0 Haghl	tipo hidroxilación hidrolasa	U141598	NM_026897.1	AK005274	
Z00000601-1	3.2668	3.11261	0.15419	1.426	0.0057	0.8199	0 Ppp1r7	proteína fosfatasa 1, subunidad 7 reguladora (inhibidor)	U000629	NM_023200.1	AF222867	MGI:1913635
Z00012235	3.0422	2.93391	0.10829	1.28	0.005	0.8199	0 Hars2	histidil ARNt-sintetasa 2	U002575	NM_025314	AK00224	

[illegible]

Z00035093	3.4952	3.3844	0.1108	1.29	0.005	0.8199	0 BC024806	secuencia de ADNc BC024806	U030664	NM_172291	AK05423	
Z00016086	2.9733	2.87971	0.09359	1.24	0.005	0.8199	0 Armc8	8 que contiene repetición de armadillo	U031235	NM_028768	AK00479	MGI:19213
Z00013119	3.5511	3.41331	0.13779	1.37	0.005	0.8199	0 Agpat3	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 3	U031971	NM_053014	AK00896	MGI:13361
Z00032879	2.9742	2.88	0.0942	1.24	0.005	0.8199	0	gen RIKEN cDNA 2810408A11	U032989	NM_027419	AK0130	
Z00044364	3.8689	3.7457	0.1232	1.32	0.005	0.8199	0 2810408A11Rik	gen RIKEN cDNA 2810014L12	U033135	NM_133706	AK00749	MGI:19163
Z00034081	2.7054	2.58571	0.11969	1.31	0.005	0.8199	0 1810014L12Rik	gen RIKEN cDNA 4932411E22 (4932411E22Rik) de Mus musculus, ARNm	U033257	NM_172534	AK04451	
Z00062676	2.993	2.88541	0.10759	1.28	0.005	0.8199	0	gen RIKEN cDNA 1700119H24	U037000		AK08873	
Z00036994	3.6092	3.5012	0.108	1.28	0.005	0.8199	0 1700119H24Rik	gen RIKEN cDNA 2610528E23	U037131	NM_025599	AK00319	
Z00004916	3.5801	3.46831	0.11179	1.29	0.005	0.8199	0 2610528E23Rik	una proteína de anclaje a quinasas 8 (PRKA)	U037662	NM_019774	AB02892	MGI:19284
Z00035365	3.3726	3.27191	0.10069	1.26	0.005	0.8199	0 Vars2l	tipo vaili-ARNit-sintetasa 2	U037753	NM_175137	AK00448	
Z00062745	3.1665	3.02661	0.13989	1.38	0.005	0.8199	0 5133400G04Rik	gen RIKEN cDNA 5133400G04	U038324	NM_027733	AK01634	
Z00046876	2.6762	2.55711	0.11909	1.31	0.005	0.8199	0 6230425F05Rik	gen RIKEN cDNA 6230425F05	U038522	NM_129027	AK03587	
Z00034930	3.4046	3.29961	0.10499	1.27	0.005	0.8199	0 Xirc1	reparación defectuosa en la complementación de reparación por rayos X en células de hamster chino 1	U106963	NM_009532	AK04661	MGI:99137
Z00026942	4.016	3.83911	0.17689	1.50	0.005	0.8199	0 A1875142	secuencia A1875142 expresada	U228381		AK04765	
Z00068617	3.1088	2.9495	0.1593	1.44	0.005	0.8199	0					
Z00008345	2.8323	2.7409	0.0914	1.23	0.005	0.825	0 Ddb2	proteína 2 de unión a ADN específica para lesiones	U023020	NM_028119.2	AK01175	MGI:13553
Z00030400	3.0703	2.95861	0.11169	1.29	0.006	0.8288	0 Ssx2ip	sarcoma sinovial, proteína interactiva 2 de punto de rotura X	U003960	NM_138744	AF53296	MGI:21391
Z00030422	4.3936	4.2511	0.1425	1.38	0.005	0.8288	0 Sumo3, Ube2g2	supresor SMT-de mitosis 3 homólogo 3 (levadura)	U011088	NM_019803	AF06384	MGI:13362

Z00055105-1	3.9072	3.7822	0.125	1.33	0.006	0.8288	0 Spag5	antígeno 5 asociado a esperma	U013016	NM_017407.1	AF420307	MGI:1927470
Z00031620-1	3.7034	3.57361	0.12979	1.34	0.005	0.8288	0	gen RIKEN cDNA 1810043H04	U013650		AK007756	
Z00009362-1	4.2892	4.1547	0.1345	1.36	0.006	0.8288	0	gen RIKEN cDNA 2900070E19	U014335	NM_028419.1	AK009158	
Z00006523-1	3.2753	3.1601	0.1152	1.30	0.006	0.8288	0 Uhrf1	tipo ubiquitina, que contiene dominios de dedo PHD y RING, 1	U018130	NM_010931.2	AF274046	MGI:1338889
Z00018156-1	3.601	3.40161	0.19939	1.58	0.006	0.8288	0 Pmp2	proteína de membrana peroxisomal 2	U026555	NM_008993.1	AF309644	MGI:107487
Z00046302-1	4.2686	4.1341	0.1345	1.36	0.005	0.8288	0 Polr2l	polimerasa (ARN) 11 (ADN dirigido) / polipéptido L	U029463		AK011021	
Z00022916-1	2.9684	2.87291	0.09549	1.24	0.006	0.8288	0 Mycbp	proteína asociada a Mycbp	U033282	NM_170671.1	AK029929	MGI:2388726
Z00060795-1	2.6638	2.5717	0.0921	1.23	0.006	0.8288	0 Ssty1	transcrito específico para espermiogénesis en el Y 1	U219803	NM_009220.1		MGI:1314663
Z00067140-1	3.1998	3.1002	0.0996	1.25	0.005	0.8288	0					
Z00006346-1	3.2085	3.1119	0.0966	1.24	0.006	0.8332	0 D630041K24R1	gen RIKEN cDNA D630041K24	U014215	XM_126935.5	AB093278	
Z00061896-1	2.8311	2.6843	0.1468	1.40	0.006	0.8332	0 Smpx	proteína del músculo pequeña, enlazada a X	U020356	NM_025357.1	AF364070	MGI:1913356
Z00056796-1	3.7835	3.64611	0.13739	1.37	0.006	0.8332	0 Cenph	autoantígeno centrómero H	U060580	NM_021886.1	AB017634	MGI:1349448
Z00014472-1	3.5589	3.45391	0.10499	1.27	0.006	0.8415	0 Tpx2	TPX2, homólogo de proteína asociado a microtúbulo (Xenopus laevis)	U002656	NM_028109.2	AK011311	MGI:1919369
Z00026674-1	2.9675	2.86931	0.09819	1.25	0.006	0.8415	0 Itgh1	integrina beta 1 (receptor beta de fibronectina)	U200362		AK014611	MGI:96610
Z00017774-1	3.8265	3.67781	0.14869	1.40	0.006	0.8447	0 Ssrp1	proteína 1 de reconocimiento específica para la estructura	U002003	NM_182990.1	AK178307	MGI:107912
Z00058967-1	4.1707	4.0382	0.1325	1.35	0.006	0.8467	0 Gfml	factor 1 de elongación de G	U003306	NM_138591.1	AF315511	MGI:107339
Z00029299-1	2.6519	2.562	0.0899	1.22	0.006	0.8467	0	ADN de cerebro de neonato de 10 días de Mus musculus, banco enriquecido de longitud completa	U022258		AK215348	
Z00015583-1	3.0201	2.92781	0.09229	1.23	0.006	0.8467	0 Mmab	RIKEN acclina metilmalónica (deficiencia en cobalamina) homólogo tipo B (humano)	U026602	NM_029956.2	AK020286	MGI:1924947

Z00040915-1	3.486	3.378	0.108	1.28	0.006	0.8467	0 Zhtb12	12 que contiene dedo de zinc y dominio BTB	U053340	NM_198886	BC02044	MGI:88133
Z00024007-1	4.5472	4.395	0.1522	1.41	0.006	0.8527	0 Ctr	fibrosis quística homólogo regulador de la conductancia de transmembrana	U006570	NM_021050	AK03362	MGI:88388
Z00016149-1	3.6473	3.52911	0.11819	1.31	0.006	0.8527	0 0610007P22Rik	gen RIKEN cDNA 0610007P22	U017669	NM_026676	AK00230	
Z00001466-1	3.9786	3.8496	0.129	1.34	0.006	0.8527	0 Cox10	homólogo COX10 de Mus musculus; proteína conjunta de citocromo c oxidasa, heme A	U032918	NM_178379	AKO103	
Z00064343-1	2.7387	2.6265	0.1122	1.29	0.006	0.8527	0 9130214H05Rik	gen RIKEN cDNA 9130214H05	U034615	NM_177016	AK03366	
Z00066240-1	2.8409	2.71181	0.12909	1.34	0.006	0.8527	0	ADNc AGENCOURT_13691858 NIH_MGC_176 de Mus musculus clon IMAGE: 30305047	U122083			
Z00041567-1	2.7385	2.6531	0.0854	1.21	0.006	0.8601	0	ARNm de Mus musculus similar a lipotransferasa (ADNc clon MGC:28431)	U000177		AK04800	
Z00030222-1	4.2966	4.16431	0.13229	1.35	0.006	0.8601	0 2810008D09Rik	gen RIKEN cDNA 2810008D09	U013585		AKO126	
Z00015622-1	3.3636	3.20881	0.15479	1.42	0.007	0.8608	0 Cldn15	claudina 15	U006313	NM_021719	AF12442	
Z00019446-1	4.0246	3.9016	0.123	1.32	0.007	0.8608	0 Dcm2	dinactina 2	U012144	NM_027151	AK00974	MGI:10773
Z00055509-1	3.388	3.28841	0.09959	1.25	0.007	0.8608	0 Rbm27	proteína 27 motivo de unión a ARN	U018671	XM_128924	AK03373	
Z00018230-1	3.4949	3.38921	0.10569	1.27	0.007	0.8608	0 Emd	eroerina	U019953	NM_007927	AK18003	
Z00043470-1	3.2806	3.178	0.1026	1.26	0.006	0.8608	0 1700041B20Rik	gen RIKEN cDNA 1700041B20	U023313	XM_485065	AK00666	
Z00009971-1	3.9108	3.7891	0.1217	1.32	0.006	0.8608	0 3300001M20Rik	gen RIKEN cDNA 3300001M20	U023397	NM_175113	AK01435	
Z00049063-1	3.0756	2.9427	0.1329	1.35	0.007	0.8608	0 Usp43	proteasa 43 (Usp43) específica para ubiquitina de Mus musculus. ARNm	U032938	NM_173754	AK04733	
Z00038967-1	3.6826	3.5721	0.1105	1.28	0.007	0.8608	0 Hrb	proteína de unión a HIV-1 Rev	U064149		AK02991	MGI:13337
Z00064813-1	3.0151	2.90391	0.11119	1.29	0.006	0.8608	0					54

Z00067946-1	3.6118	3.4147	0.1971	1.574	0.0072	0.865	0 LOC382611	PREDICHO: Mus musculus similar a farnesil pirofosfato sintasa (LOC382611)	U02263	XM 487220.1		
Z00011558-1	2.934	2.8418	0.0922	1.236	0.0074	0.8766	0 C130068N17Rik	gen RIKEN cDNA C130068N17	U001874	NM_177784.2	AK048518	
Z00040192-1	3.8862	3.7675	0.1187	1.314	0.0075	0.8856	0 1700021K19Rik	gen RIKEN cDNA 1700021K19	U036980	NM_172615.1	AK003056	
Z00018767-1	3.3881	3.26671	0.12139	1.322	0.0075	0.8874	0 Ore6l	Complejo de reconocimiento de origen, tipo subunidad 6 (S. cerevisiae)	U009596	NM_019716.1	AF139659	
Z00054981-1	3.2635	3.1637	0.0998	1.258	0.0076	0.8893	0 Nup43	nucleoporina 43	U011239	NM_145706.1	AK011422	MGI:1917162
Z00070308-1	4.0856	3.9603	0.1253	1.334	0.0076	0.8893	0 Wdhd1	repetición WD y caja HMG proteína 1 de unión a ADN	U035469	NM_172598.2	AK036390	MGI:2443514
Z00067534-1	2.7514	2.66431	0.08709	1.222	0.0076	0.8893	0					
Z00030442-1	3.5939	3.4869	0.107	1.279	0.0077	0.8946	0 Mrel1a	recombinación meiótica 11 homólogo A (S. cerevisiae)	U042950	NM_018736.2	AK041248	
Z00060187-1	3.3844	3.26071	0.12369	1.329	0.0079	0.8976	0 Ugt2b35	familia de UDP glucuronosil-transferasa, polipeptido B35	U005740	NM_172881.1	AK190580	
Z00053936-1	2.7484	2.661	0.0874	1.222	0.0078	0.8976	0 D330017J20Rik	gen RIKEN cDNA D33017J20	U006622	NM_177204.2	AK034933	
Z00030957-1	4.317	4.1879	0.1291	1.346	0.0079	0.8976	0 Higl	hipoxia inducida por gen 1	U031455	NM_019814.2	AF141312	
Z00002399-1	2.9216	2.8334	0.0882	1.225	0.0078	0.8976	0 Tfam	factor A de transcripción, mitocondrial	U031911	NM_009360.2	AK004857	MGI:107810
Z00024632-1	3.4796	3.37421	0.10539	1.274	0.0078	0.8976	0 Fignl1	fidgetina tipo 1	U032514	NM_021891.2	AF263914	
Z00006160-1	4.1696	4.0401	0.1295	1.347	0.0079	0.8976	0 Tk1	timidina quinasa 1	U033669	NM_009387.1	AK085188	MGI:9876300
Z00037647-1	3.2544	3.15581	0.09859	1.254	0.0079	0.8976	0 2810429005Rik	gen RIKEN cDNA 2810429005	U033761	NM_134046.3	AK013198	MGI:1923800
Z00058947-1	2.6414	2.55501	0.08639	1.222	0.0079	0.8976	0					
Z00056170-1	3.0098	2.75691	0.25289	1.79	0.0081	0.9057	1 Ghrl	grelina	U027740	NM_021488.3	AB035701	MGI:1930008
Z00034939-1	4.3894	4.2108	0.1786	1.508	0.0081	0.9057	0 Hmgcs1	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa 1	U040385	NM_145942.2	AK031297	
Z00054244-1	3.5841	3.44031	0.14379	1.392	0.0081	0.9057	0	Intronic en U000785				

Z00019388-1	2.858	2.6302	0.2278	1.689	0.0082	0.9104	1 Slc14a1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1	U038587	NM_028122	AF448798	MGI:1351654
Z00052877-1	3.8196	3.67971	0.13989	1.38	0.0083	0.9164	0 Cdk6	cyclin-dependent kinase 6	U066460		AK030810	MGI:1277162
Z00033350-1	2.7459	2.59341	0.15249	1.42	0.0083	0.917	0 Kcnj14	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14	U057287	XM_484830	BC022700	MGI:2384820
Z00026728-1	3.4368	3.3282	0.1086	1.284	0.0084	0.9186	0 Senn1	SUMO1/sentrin specific protease 1	U036610		AK053784	MGI:2445054
Z00036744-1	3.5965	3.46911	0.12739	1.34	0.0087	0.9218	0 Dna21	DNA2 DNA replication helicase 2-like (yeast)	U011588	NM_177372	AK028381	
Z00039468-1	3.5012	3.34351	0.15769	1.437	0.0087	0.9218	0	RIKEN cDNA 3110049J23 gene	U011590	NM_026085	AK007784	
Z00046109-1	3.0918	3.0025	0.0893	1.228	0.0085	0.9218	0 Dnahe8	dynamin, axonemal, heavy chain 8	U017788	NM_013811	AF117305	MGI:107714
Z00056072-1	2.9614	2.87421	0.08719	1.222	0.0087	0.9218	0 Glmn	glomulin, FKBP associated protein	U026517	NM_133248	AJ566083	MGI:2141180
Z00052174-1	2.8826	2.79571	0.08689	1.221	0.0087	0.9218	0	RIKEN cDNA D730045B01 gene	U027001		AK080901	
Z00008437-1	3.532	3.4227	0.1093	1.286	0.0085	0.9218	0	RIKEN cDNA 2310061C15 gene	U030300	NM_026844	AK002429	
Z00015584-1	3.5857	3.4794	0.1063	1.277	0.0086	0.9218	0 Mcm4	minichromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)	U036823	NM_008565	AK011743	MGI:103199
Z00039348-1	2.8706	2.78371	0.08689	1.221	0.0087	0.9218	0	RIKEN cDNA 9930105H17 gene	U092351	XM_486432	AK013372	
Z00026363-1	2.7126	2.6168	0.0958	1.246	0.0087	0.9218	0	RIKEN cDNA 9430081H08 gene	U180307		AK020500	
Z00060821-1	2.8587	2.75161	0.10709	1.279	0.0087	0.9218	0 LOC434835	PREDICTED: Mus musculus similar to Muc19 precursor (LOC434835), mRNA	U314471	XM_486754		
Z00061412-1	2.6258	2.5422	0.0836	1.212	0.0088	0.9262	0	RIKEN cDNA 4930488N15 gene	U009855		AK018507	
Z00061044-1	4.2853	4.1572	0.1281	1.343	0.0098	0.939	0	RIKEN cDNA 4930438O05 gene	U000533	NM_027507	AK010596	
Z00003407-1	4.1259	4.00561	0.12029	1.319	0.0098	0.9435	0 Mpl55	mitochondrial ribosomal protein L55	U012678	NM_026035	AK012143	
Z00060221-1	4.0941	3.972	0.1221	1.324	0.0094	0.9555	0 Slc37a4	solute carrier family 37 (glycerol-6-phosphate transporter), member 4	U010386	NM_008063	AF080469	MGI:1316650

Z00020853-1	2.6678	2.5597	0.1081	1.28	0.009	0.9555	0 Kns2	kinesina 2	U014435	NM_008450	AF05566	MGI:10797
Z00049890-1	3.1874	3.07261	0.11479	1.30	0.009	0.9555	0 Fgfr1op	compañero de oncogen Fgfr1	U017465	NM_201230	AK01611	
Z00063182-1	2.8777	2.79171	0.08599	1.21	0.009	0.9555	0 Impa2	inositol (mio)-1(o 4) mono fosfatasa 2	U018841	NM_053261	AF35373	
Z00037692-1	3.1476	3.055	0.0926	1.23	0.009	0.9555	0	gen RIKEN cDNA 9230117N10	U019359	NM_133775.1	AK02035	MGI:19243
Z00052913-1	2.6718	2.5837	0.0881	1.22	0.009	0.9555	0 Olfir1164	receptor olfatorio 1164	U022932	NM_146641		MGI:30309
Z00042118-1	2.5908	2.5022	0.0886	1.22	0.009	0.9555	0	gen RIKEN cDNA 1700003G18	U029158		AK00563	
Z00004448-1	3.0827	2.9953	0.0874	1.22	0.009	0.9555	0 Nme4	expresado en células 4 no metastásicas, proteína	U037575	NM_019731	AF15345	MGI:19311
Z00020799-1	3.5759	3.47141	0.10449	1.27	0.009	0.9555	0	gen RIKEN cDNA E430027O22	U074546	XM_129248.5	AK08884	
Z00036732-1	3.6964	3.59081	0.10559	1.27	0.009	0.9555	0	Intronic en U039164				
Z00070589-1	4.2903	4.16411	0.12619	1.33	0.009	0.9562	0 Elov16	miembro 6 de familia ELOVL, elongación de ácidos grasos de cadena larga (levaduras)	U003840	NM_130450.1	AB07203	MGI:21565
Z00057713-1	3.375	3.2417	0.1333	1.35	0.009	0.9589	0 Silbp	proteína de unión tallo-bucle	U026089	NM_009193	AK0168	
Z00033363-1	3.2643	3.13181	0.13249	1.35	0.009	0.9589	0	gen RIKEN cDNA 2210023G05	U057428	NM_197999.1	AK00877	
Z00042691-1	3.2118	3.1078	0.104	1.27	0.009	0.9629	0 Qpsl1	glutaminil-ARNt sintasa (hidrolizante de glutamina) tipo 1	U031744	XM_125586	AK01235	MGI:19238
Z00025490-1	3.1386	3.04361	0.09499	1.24	0.009	0.9648	0 Sic16a11	familia 16 de soporte de soluto (transportadores de ácidos monocarboxílicos), miembro 11	U012847	NM_153081	S36676	MGI:26637
Z00037730-1	3.0585	2.9478	0.1107	1.29	0.009	0.9649	0 BC004701	secuencia de ADN BC004701	U039585	NM_146235	AK02901	
Z00033504-1	2.7812	2.69561	0.08559	1.21	0.009	0.9649	0					
Z00009211-1	2.696	2.60111	0.09489	1.24	0.009	0.9655	0 Zfp592	proteína dedo de zinc 592	U008292	NM_178707	AK03336	
Z00025772-1	3.2363	3.1468	0.0895	1.22	0.009	0.9675	0 Vrk2	quinasa 2 relacionada con vacuna	U032588	NM_027260	AF51362	
Z00022883-1	2.8079	2.7236	0.0843	1.21	0.01	0.9727	0 Inpp5b	inositol polifosfato-5' fosfatasa de Mus musculus	U004789	NM_008385	AF04009	MGI:10325

Z00012014-1	2.6992	2.56701	0.13219	1.355	0.01	0.9727	0	1700022L09Rik	B (Inpp5b), ARNm	U023568	NM_025853.1	AK006246	
-------------	--------	---------	---------	-------	------	--------	---	---------------	------------------	---------	-------------	----------	--

Las anotaciones GO mostraron una representación excesiva de genes que muestran una expresión incrementada implicada con la replicación del ADN ($P < 10^{-15}$), el ciclo celular ($P < 10^{-9}$) y la proliferación celular ($P < 10^{-9}$) (Tablas 4, 5).

Tabla 4. Categorías de de anotación de Ontogenia de Genes (GO) con una expresión alterada en análisis de microarrays de criptas microdiseccionadas de captura por láser.

Supra-regulado en LOI					
5					
	Categoría de anotación GO	Genes supra-regulados en categoría	Genes supra- regulados anotados GO totales	Genes anotados GO totales en categoría	Valor P
10					
	Replicación de ADN y ciclo de cromosomas	15	168	103 12933	10 ⁻¹⁵
	Replicación de ADN	13	168	83 12933	10 ⁻¹⁵
	Metabolismo de ADN	24	168	373 12933	10 ⁻¹⁵
15	Replicación de ADN ADN-dependiente	5	168	31 12933	10 ⁻¹²
	Ciclo celular	23	168	527 12933	10 ⁻⁹
	Proliferación celular	27	168	692 12933	10 ⁻⁹
	División nuclear	8	168	115 12933	10 ⁻⁷
20	Fase M	8	168	124 12933	10 ⁻⁶
	Ciclo celular mitótico	8	168	129 12933	10 ⁻⁶
	Mitosis	6	168	82 12933	10 ⁻⁶
	Fase M de ciclo celular mitótico	6	168	83 12933	10 ⁻⁶
25	Reparación de ADN	7	168	122 12933	10 ⁻⁵
	Unión de ATP	28	168	1012 12933	10 ⁻⁵
	Unión de adenil-nucleótido	28	168	1028 12933	10 ⁻⁴
	Citoquinas	6	168	99 12933	10 ⁻⁴
30	Actividad de helicasa ATP-dependiente	5	168	73 12933	10 ⁻⁴

	Unión de nucleótido	32	168	1293	12933	10^{-4}
	purina					
	Metabolismo de ácido	11	168	281	12933	10^{-4}
	carboxílico					
5	Metabolismo de	11	168	281	12933	10^{-4}
	ácido orgánico					
	Unión de nucleótidos	32	168	1313	12933	10^{-4}
	Respuesta al estímulo	7	168	142	12933	10^{-4}
	de lesión de ADN					
10	Actividad de ATPasa	9	168	213	12933	10^{-4}
	Metabolismo	90	168	5100	12933	10^{-4}
	Respuesta a	7	168	147	12933	10^{-4}
	estímulo endógeno					

15 * La anotación GO fue analizada en <http://lgsun.ma.grc.nih.gov/geneindex4/upload.html> Se muestran categorías con > 5 genes identificados con $P < 10^{-4}$. Los genes sub-regulados no fueron enriquecidos en categoría alguna

Tabla 5. Genes implicados en las categorías de graduación superior (replicación de ADN/ciclo celular), supra-regulado en ratones LOI (+) ratones en análisis de microarrays de criptas microdisseccionadas de captura por láser.

20	Gen	Veces de cambio	Función
	Card 11	1,65	BCL10 fosforilado, induce actividad de NF-kB
	CcdcS	1,54	Regulador de la función del huso
25	Skp2	1,49	Oncogen requerido para la entrada en fase S
	Gmnn	1,49	Acumulado en S, G2 y M, inhibición de origen inapropiado, activado por CDT1
	Ccne1	1,48	Requerido para la activación de CDK2, dando lugar a la proliferación
30	Chaf1a	1,48	Monta el octámero de histona sobre el ADN en replicación durante la fase S

ES 2 543 015 T3

	Mcm5	1,47	Requerido para la replicación de ADN, interactuando con Cdc6 y Mcm2
	Rfc3	1,44	Implicado en la elongación eficiente de ADN
5	Rpa2	1,42	subunidad de 32 kD de proteína de replicación A
	Cdc6	1,42	Factor de licencia esencial para la replicación del ADN
	Mertk	1,39	Proto-oncogén expresado en los tejidos epiteliales y reproductores
10	Pitx2	1,38	Factor de transcripción requerido para la proliferación específica del tipo celular efectiva
	Cenph	1,37	Quinesina asociada a centrómero mitótico
15	LigI	1,37	ADN ligasa implicada en la unión de fragmentos de Okazaki
	Mcm 3	1,36	Requerido para el desenrollamiento de ADN durante la replicación del ADN
	Smc211	1,36	Requeridos para la condensación del cromosoma mitótico
20	Rpa1	1,35	Subunidad de proteína de replicación A requerida para la replicación del ADN

	Gen	Veces de cambio	Función
	Spag5	1,33	Ortólogo de astrina, localizado al husillo y requerido para la mitosis
5	Orc61	1,32	Une orígenes de replicación del ADN para la iniciación de la replicación del ADN
	Uhrf1	1,30	Requerido para la entrada en fase S, regula la expresión de Top2a.
10	Mre11a	1,28	Requerido para la reparación de rotura de la doble hélice y la proliferación celular
	Mcm4	1,28	Requerido para la replicación del ADN, interactúa con Mcm6 y Mcm7
	Cdc7	1,27	Requerido para la transición de G1-S y la iniciación de la replicación del ADN
15	Itgb1	1,25	Marcador de células progenitoras para la zona proliferativa de las criptas del colon
	Pold3	1,24	Subunidad de ADN polimerasa delta requerida para la replicación del ADN
	Kntc1	1,24	Puesto de control mitótico
20	Glmn	1,22	Inmunofilina, ligando natural de FKBP59 y FKBP 12
+ Se muestran los genes con el cambio > 1,20 veces			

25 No se observó enriquecimiento significativo en otras categorías. Con el fin de confirmar estos resultados mediante PCR cuantitativa en tiempo real, LCM se realizó en 15.000 criptas adicionales microdisecionadas de 12 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-) adicionales, proporcionando > 300 ng de ARN de cada una de las muestras. Si bien los cambios en la expresión génica fueron moderados (~ 1,5 veces) (Tablas 4 y 5, *supra*), el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de 14 genes confirmó diferencias estadísticamente significativas en 13 (P entre 0,003 y 0,04) y las otras eran sugerentes (P = 0,1) (Figura 1).

30 Los genes de graduación superior en este análisis incluían Cdc6, un factor esencial de licencia que conduce a la iniciación de la replicación del ADN y al inicio de la fase S (Dutta et al, Annu Rev Cell Dev Biol (1997). 13: 293-332; Coleman et al, Cell (1996) 87: 53-63), Mcm5 y Mcm3, ambos requeridos para la replicación del ADN en la fase S temprana (Chong et al, Nature (1995). 375:418-421; Madline et al, Nature (1995) 375: 421-424), Skp2, necesario para la entrada en fase S (Reed, Nat Rev Mol Cell Biol (2003) 4:855-864; Bashir et al, Nature (2004) 428:190-193), Ccdc5, un regulador de la función del huso (Einarson et al, Mol Cell Biol (2004). 24:3957-3971), Chaf1a, que ensambla el octámero de histona en ADN en replicación (Smith y Stillman, Cell (1989) 58:15-25), y Rpa2, una proteína de unión a ADN de cadena sencilla esencial para la replicación del ADN (Mass et al, Mol Cell Biol (1989). 18:6399-6407; Shao et al, EMBO J (1999) 18: 13971406) (Figura 1, Tablas 4, 5, *supra*). Estos resultados implican que la LOI provoca una alteración específica en la expresión génica asociada a la replicación en el epitelio intestinal.

No obstante, la expresión incrementada de algunos genes no asociados con la replicación del ADN se observó per se. Por ejemplo, *Card11* (Figura 1) es un gen anti-apoptótico que actúa a través de la fosforilación de BCL10 y la inducción de NF- κ B (Bunnell, Mol Interv (2002) 2:356-360). La expresión de *Msi1* también fue analizado mediante PCR en tiempo real, dado que el marcador de células progenitoras codificado *Musashi-1* mostró una inmunotinción incrementada en un estudio previo (Sakatani et al. (2005)). La expresión de *Msi1* también se incrementó significativamente ($P = 0,01$) (Figura 1), lo que confirma el resultado anterior y soporta un mecanismo pleiotrópico para IGF2 en LOI. Por último, varios genes mostraron una regulación a la baja en criptas LOI (+), incluyendo *p21* (Figura 1), un inhibidor del progreso del ciclo celular.

Ejemplo 1. Confirmación in vitro del efecto proliferativo de IGF2 LOI (+) en células progenitoras.

Seguía siendo teóricamente posible que la diferencia observada en la expresión génica simplemente refleja la sobre-representación de células progenitoras dentro de las criptas intestinales, en lugar de un cambio en la expresión génica celular per se. Para confirmar esto último, las células madre embrionarias (ES) de ratón se derivaron y se sembraron en medio definido Complete Clonal Grade ESGRO (Chemicon), que no contiene IGF2 y que permite el crecimiento de células ES no diferenciadas sin una capa de alimentación, que se realizó con o sin 800 ng/ml de proteína recombinante Igf2 de ratón (StemCell Technologies). De acuerdo con los experimentos de microarrays, Igf2 indujo un aumento del 50% y del 56% en la expresión génica *Cdc6* a las 3 y 6 horas, respectivamente, y del 40% y 25% a las 10 y 24 horas, respectivamente (Figura 3). Se observaron resultados similares para *Mcm5* (Figura 3). Para confirmar la especificidad de este efecto, estos experimentos se repitieron mediante el bloqueo de la señalización de IGF2 con NVP-AEW541, un pirrolo[2,3-d]pirimidina que inhibe específicamente IGF1R sobre el receptor de insulina relacionado, y también se confirmó que el fármaco bloquea IGF2 en IGF1R (Figura 9). NVP-AEW541 abolió completamente la expresión incrementada inducida por IGF2-de *Cdc6* en todos los momentos (Figura 3). Estos experimentos se repitieron para *Mcm5* y *Msi1*, con resultados similares (Figura 3, Figura 10), lo que confirma que Igf2 inducía la expresión génica relacionada con la proliferación, así como aumentaba la proliferación de las células progenitoras in vivo.

La idea de que células progenitoras LOI (+) proliferan más rápidamente que las células LOI (-) se ensayaron entonces derivando 4 líneas ES de cada uno de los dos embriones LOI (+) y LOI (-). Células ES LOI (+) mostraron un tamaño de la colonia aparentemente mayor por microscopía óptica que lo hacían las LOI (-) (Figura 4). Con el fin de cuantificar el tamaño de la colonia, 1.000 células ES se sembraron de cada una de las cuatro líneas de células alimentadoras LOI (+) y cuatro líneas de células alimentadoras LOI (-) y se midió el tamaño de 15-30 colonias de cada una, todos los días hasta el día 6. Células ES LOI (+) mostraron un aumento estadísticamente significativo en tamaño de las colonias frente a células ES LOI (-) tan pronto como el día 3 ($P = 0,001$), lo que aumentó en un incremento de 86% el día 6 ($P = 0,0009$) (Figura 5).

El crecimiento de células ES se midió entonces directamente como células indiferenciadas en medio definido Complete Clonal Grade ESGRO (Chemicon), de nuevo utilizando cuatro líneas ES LOI (+) y cuatro líneas ES LOI (-), con pocillos por triplicado en los días 0 a 4. Las células ES LOI (+) mostraron un aumento de la tasa de crecimiento del 26% ($P = 0,01$), con un aumento del 160% en el número de células frente a células ES LOI (-) hacia el día 4 ($P = 0,0003$). Por lo tanto, las células ES LOI (+) proliferan significativamente más rápidamente que células ES LOI (-), consistente con los datos de expresión, lo que sugiere que las células progenitoras intestinales con LOI también muestran una mayor proliferación (Figura 6).

Ejemplo 2. Inhibición específica de Focos de Cripta Aberrantes en Ratones LOI (+) mediante un inhibidor de Igf1R.

Debido a la variación de cepa conocida en el progreso de estas lesiones, compañeros de camada controles fueron tratados con y sin LOI, en que las madres eran heterocigotas para una delección de la región diferencialmente metilada (DMR) H19; la herencia de un alelo materno que carece de la DMR conduce a la activación del alelo normalmente silencioso de Igf2 [LOI (+)], mientras que la herencia de un alelo materno de tipo salvaje conduce a la impronta normal [LOI (-)]. Ocho ratones LOI (+) y 14 ratones LOI (-) recibieron AOM por vía intraperitoneal semanalmente durante 3 semanas, fueron sacrificados a las 5 semanas después de la primera dosis, y los ACF se puntuaron por el método de Bird (1987). El examen histológico de colonos de los ratones tratados con AOM confirmó la presencia de ACF, con características hiperproliferativas que incluyen una mitosis incrementada, una ampliación de las criptas y un desorden de criptas (Figura 12). Estos resultados son consistentes con los cambios específicos para la proliferación en la expresión génica descrita anteriormente. Un hallazgo interesante adicional en ratones LOI (+) tratados con AOM eran criptas císticamente dilatadas revestidas por células alargadas con núcleos atípicos y que contenían desechos necróticos, que eran una reminiscencia de adenomas sésiles aserrados (SSA) vistos en el colon humano (Figura 12). SSAs también muestran una dilatación de la cripta en asociación con atipia citológica y son actualmente de gran interés por su asociación reconocida recientemente con el cáncer colorrectal (Snover et al, Am J Clin Pathol (2005) 124:380- 391). Por lo tanto, será de interés para determinar si los SSAs se asocian con LOI en la población humana.

Ratones LOI (+) mostraron $19,8 \pm 2,2$ ACF por colon, en comparación con $12,4 \pm 0,9$ ACF por colon en ratones LOI (-), un aumento del 60% ($P = 0,002$). 9 ratones LOI (+) adicionales y 9 compañeros de camada de control LOI (-) fueron expuestos de manera similar a AOM, añadiendo un tratamiento con NVP-AEW541, un inhibidor de IGF1R, a una dosis de 50 mg/kg por sonda oral diaria durante 6 semanas (dos veces todos los días excepto los fines de semana todos los días). Ratones LOI (-) no mostraron diferencia alguna en la formación de ACF después del tratamiento con el fármaco NVP-AEW541 ($11,3 \pm 1,6$, N.S.). Sin embargo, los ratones LOI (+) mostraron una reducción notable en la formación ACF inducida por AOM después del tratamiento con NVP-AEW541 ($7,8 \pm 1,2$; $P = 0,0002$), significativamente menor incluso que la observada en ratones LOI (-) tratados con AOM ($P = 0,007$). Por lo tanto, la LOI de Igf2 aumenta la sensibilidad a AOM través de un mecanismo IGF1R-dependiente. Además, ratones LOI (+) son más sensibles a los efectos del bloqueo de IGF1R que lo son los ratones LOI (-), lo que sugiere una sensibilidad incrementada a la señalización de IGF2 en ratones LOI (+) (Figura 7).

Estos resultados, tomados juntos, sugieren una posible estrategia de quimioprevención en la que los pacientes con LOI son tratados con un fármaco diseñado para inhibir la señalización de IGF2, reduciendo así la proliferación incrementada de células progenitoras. Como prueba del experimento principal, se desarrolló un nuevo modelo animal de LOI utilizando el carcinógeno químico azoximetano (AOM) que, a diferencia del modelo Mln, es específico para el colon y la exposición se puede programar después del nacimiento. La cepa C57Bl/6 en la que se estableció el modelo de LOI desarrolla focos de criptas aberrantes (ACF), que son lesiones de la mucosa con diversos grados de multiplicidad de criptas, elevación y ampliación. Esta cepa es no tumoral, pero idealmente es adecuada para el estudio de las etapas tempranas del desarrollo del tumor, que es el objetivo presunto de LOI, así como la estrategia quimiopreventiva de los autores de la invención. ACFs se han utilizado como un modelo para tumores intestinales de roedores durante dos décadas (Schoonjans et al, Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102:2058-2062; Osawa et al, Gastroenterology (2003) 124:361-367). Ejemplo 3. LOI provoca una Potenciación a Largo Plazo de señalización Akt en respuesta a Igf2.

Para determinar si las células de ratones LOI (+) por sí mismas difieren en la sensibilidad de IGF2, se desarrolló un nuevo alto rendimiento de ensayo de transducción de señales en base a un dispositivo de automatización de inmunotinción que comprende cámaras microfluídicas que albergan múltiples células (Wang et al., en la 10ª Conferencia Internacional sobre Sistemas Miniaturizados de Química y Ciencias de la Vida (MicroTAS2006) (Tokio, Japón, 2006). Una ventaja del chip microfluídico es que todas las células pueden cultivarse simultáneamente en el mismo chip y bajo condiciones idénticas, con un exquisito control del medio celular a lo largo del tiempo del experimento y el subsiguiente análisis, lo que permite un número mucho mayor de mediciones de lo que sería posible por medios convencionales. El dispositivo se construyó dentro de un chip de PDMS de 2 capas monolítico sellado con un cubreobjetos de vidrio, con un suministro de medios definido controlado por un sistema multiplexado de válvulas. Se examinó Akt/PKB, un objetivo conocido y bien caracterizado de la activación de IGF2, y para este propósito se derivaron líneas de fibroblastos de embrión de ratón (MEF) de embriones LOI (+) y LOI (-). Las líneas MEF fueron escogidas frente a las células madre embrionarias en este análisis para facilitar el examen de células individuales en cámaras microfluídicas en lugar de en colonias densas. Células LOI (+) y LOI (-) vivas se estimularon dentro de los chips con dosis variables de IGF2, con las mediciones de Akt/PKB en múltiples momentos y la concentración de IGF2. Para cada tipo de célula, la concentración de IGF2, y el momento, se obtuvieron al menos 200 mediciones celulares individuales mediante formación de imágenes digitales y análisis, proporcionando una amplia información para la evaluación estadísticamente significativa tanto de la respuesta media como de la variabilidad célula-célula. Los resultados fueron consistentes con el análisis de la variación chip a chip, utilizándose dos chips para cada línea celular. Como lectura se utilizó la inmunotinción de la Akt fosforilada nuclear (Ser 473, Upstate). Estudios anteriores han revelado una importancia de Akt para la regulación del ciclo celular, con actividad sostenida implicado en la transición mediada por factor de crecimiento a través de G1 (Jones et al, Curr Biol (1999) 9:512-521).

IGF2 desencadenó una señal de activación de Akt transitoria (pico en 10 a 40 minutos, seguido de un retorno a la línea de base dentro de 90 min) en células LOI (-) (Figura 8A) en todas las concentraciones sometidas a ensayo (400, 800 y 1.600 ng/ml), equiparable a los niveles utilizados para apoyar las células madre hematopoyéticas de hígado fetal de ratón (500-1000 ng/ml) (Zhang y Lodish, Blood (2004) 103:2513-2521). En contraposición, cuando se someten a la concentración más baja (400 ng/ml) de Igf2, las células LOI (+) mostraron una activación de Akt marcadamente sostenida (> 120 minutos), que aumentó constantemente con el tiempo después de la estimulación (Figura 8A). A dosis más altas de IGF2, la señal de Akt en las células LOI se convirtió cada vez más transitoria y menos pronunciada. Estos resultados demuestran que las células LOI (+) tienen una sensibilidad mejorada a IGF2 en dosis más bajas, y podrían ayudar a explicar la mayor sensibilidad de ratones LOI (+) para la inhibición de IGF1R.

Ejemplo 4. El Incremento Relacionado con la LOI de la Expresión Génica Relacionada con la Proliferación es Diferencialmente Sensible a la inhibición de IGF1R.

Anteriormente se había demostrado que la LOI conduce a un aumento en el compartimiento de células progenitoras en células de las criptas de ratones Mln (Sakatani et al. (2005)), pero el mecanismo era desconocido. Por lo tanto, se buscó determinar qué cambios en la expresión génica se producen en células progenitoras epiteliales

- 5

gastrointestinales en ratones LOI. La expresión génica se mide en criptas microdisecionadas de captura por láser, comparando 8000 criptas de cada uno de 3 ratones LOI (+) y 3 ratones LOI (-) en microarrays. 283 genes mostraron una expresión incrementada y 109 genes mostraron una expresión disminuida (Tabla 3, *supra*). La anotación GO mostró una sobre-representación de genes que muestran una expresión incrementada implicada con la replicación de ADN ($P < 10^{-15}$), el metabolismo de ADN ($P < 10^{-15}$), el ciclo celular ($P < 10^{-9}$) y la proliferación celular ($P < 10^{-9}$) (Tablas 3 y 6), en consonancia con observaciones anteriores de células progenitoras incrementadas en ratones LOI (+) (Sakatani et al., (2005)).

Tabla 6. Lista de Genes con Diferencia Significativa ($P < 0.01$) en Análisis de Microarray de criptas Microdisseccionadas de Captura por Láser (Sub-regulación en cripta LOI(-)).

Caracterizado	Media (H19mt, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
Z00027742-1	3.5267	3.8485	-0.3218	2.097	0 0.0005	0 Grin2d	Receptor de glutamato, ionotrópico, NMDA2D (epsilon 4)	U028546	NM_008172.1	AK077611	MGI: 95823
Z00005302-1	3.12	3.35259	-0.23259	1.708	0 0.0015	0 Cdknla	Inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina (P21)	U017761	NM_007669.2	AB017817	MGI: 104556
Z00041932-1	2.7672	2.9276	-0.1604	1.446	0 0.0075	0 Ahnak	Nucleo-proteína de Mus musculus AHNAK (desmovokina)	U168837		AK003448	MGI: 1316648
Z00027819-1	3.106	3.254	-0.148	1.406	0 0.0306	0 Gm502	Modelo de gen 502, (NCBI)	U009440	XM_146397.2	BC010572	MGI: 2685348
Z00011777-1	2.9645	3.13359	-0.16909	1.476	0 0.0331	0 A630082 K20Ri k	Gen RIKEN cDNA A630082K20	U027200	XM_145254.4	AK035529	
Z00021589-1	3.2141	3.38699	-0.17289	1.488	0 0.0463	0 Map3k6	Proteína quinasa quinasa quinasa-6 activada por mitógeno	U004915	NM_016693.2	AB021861	MGI: 1855691
Z00039323-1	2.6312	2.76889	-0.13769	1.373	0 0.0664	0 A930008 A22Ri k	Gen RIKEN cDNA A930008A22	U030737	NM_172768.1	AK020827	
Z00013598-1	3.1007	3.2446	-0.143	9 1.392	0 0.0717	0 Skiip	Proteína inter-actuante SKI	U034214	NM_025507.1	AK009218	MGI: 1913604
Z00044310-1	3.0685	3.2893	-0.2208	1.662	0 0.0937	0 1700011 H14Ri k	Gen RIKEN cDNA 1700011H14	U035491	NM_025956.2	AK005866	
Z00035971-1	2.8825	3.0066	-0.1241	1.33	0.0001	0 Ckap4	Proteína asociada al citoesqueleto	U032075	XM_125808.5	AK030708	MGI: 2444926
					0.1121						

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
Z00064631-1	2.6715	2.79369	-0.12219	1.324	0.0001	0					
					0.1194						
Z00063868-1	2.5884	2.71369	-0.12529	1.334	0.0002	0 Herc5	Dominio hect de Mus musculus y RLD (Herc5), ARNm	U006930	NM_025992.1	AK007221	MGI: 1914388
					0.1607						
Z00005771-1	3.5523	3.7683	-0.216	1.644	0.0002	0 Klf6	Factor 6 tipo Kruppel	U014517	NM_011803.1	AF072403	MGI: 1346318
					0.1655						
Z00057298-1	2.6089	2.73129	-0.12239	1.325	0.0002	0 Al9876	secuencia Al987662 expresada	U041037	NM_178899.3	AK033728	
					0.1801	62					
Z00060167-1	3.8979	4.07059	-0.17269	1.488	0.0003	0 Chmp4	Proteína 4B modificador a de cromatina	U002691	NM_029362.2	AK008205	
					0.2387	b					
Z00055119-1	2.6125	2.7324	-0.1199	1.317	0.0003	0 9530033 F24Rik	Gen RIKEN cDNA 9530033F24 de Mus musculus (9530033F24Rik)	U013231	NM_201609.1	AK053008	
					0.2387						
Z00031167-1	2.6209	2.7358	-0.1149	1.302	0.0004	0 Xlr	Complejo (Xlr) regulado en linfocitos enlazado a X de Mus musculus	U047383	NM_011725.2	AK012549	
Z00059181-1	2.6076	2.76609	-0.15849	1.44	0.0005	0 AA536749	Secuencia AA536749 expresada de Mus musculus (AA536749)	U012687	NM_012027.1	AB093269	MGI: 1349438
Z00047700	2.9974	3.148	-	1.417	0.0005	0	Gen RIKEN	U03276	NM_1831	AK043538	

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
-1		89	0.15149			A83006N08Rik	cDNA A83006N08 de Mus musculus (A83006N08Rik)	2	73.1		
					0.2551						
Z00042720-1	3.1281	3.2515	-0.1234	1.328	0.0005	06430527G18Rik	Gen RIKEN cDNA 6430527G18	U034200	NM_145836.1	AF525300	
					0.2551						
Z00021452-1	4.1943	4.36869	-0.17439	1.494	0.0005	0 Gdpd1	Dominio de glicerofosfodiéster fosfodiésterasa que contiene 1	U933233	NM_025638.1	AK011487	
					0.2588						
Z00033810-1	3.137	3.302	-0.165	1.462	0.0006	0					
					0.2903						
Z00027804-1	2.7244	2.9361	-0.2117	1.628	0.0006	0 Gpr120	Receptor 120 acoplado a proteína G de Mus musculus (Gpr120)	U100866	NM_181748.1	AB115769	
Z00041224-1	3.2239	3.3967	-0.1728	1.488	0.0006	0 BC025076	Secuencia de ADNc BC025076	U104957		AK087807	
					0.3018						
Z00025480-1	2.5353	2.6646	-0.1293	1.346	0.0007 0.3319	0 Bmper	Regulador endotelial de unión a BMP	U010170	NM_028472.1	AF454954	MGI: 1920480
Z00004154-1	2.8682	2.9804	-0.1122	1.294	0.0008	0 Ssfa2	antígeno 2 específico para esperma	U001964	NM_080558.3	AB093303	MGI: 1917849
					0.3335						
Z00024307-1	2.8206	2.93119	-0.11059	1.29	0.0008	0 Ly6d	Complejo de linfocitos antígeno 6,	U036290	NM_010742.1	BC025135	MGI: 96881

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
							locus D				
					0.3457						
Z00040747-1	2.9132	3.0818	-0.1686	1.474	0.0009	0 B430201 A12Ri k	Gen RIKEN cDNA B430201A12	U024539	XM_283903.2	AK005412	
					0.349						
Z00040571-1	2.5402	2.64659	-0.10639	1.277	0.0009	0 Atp8bl	ATPasa, clase I, tipo 8B, miembro 1	U38499	NM_00101488.1	AF395823	MGI: 1859665
					0.3646						
Z00026784-1	2.974	3.08809	-0.11409	1.3	0.001	0 Naaladl 1	Dipeptidasa tipo 1 acídica alfa-enlazada N-acetilada	U085390	NM_00109546.1		
Z00042521-1	4.2784	4.50009	-0.22169	1.666	0.0011	0 1110006 O24Rik	Gen RIKEN cDNA 1110006O24	U026636	NM_021417.1	AB041800	
					0.3834						
Z00016189-1	2.6902	2.82019	-0.12999	1.348	0.0012	0 Thbs1	tromboespondina 1	U002275	NM_011580.2	AK080686	MGI: 98737
					0.3878						
Z00064702-1	2.6282	2.73519	-0.10699	1.279	0.0012	0					
					0.3878						
Z00023675-1	2.5968	2.70509	-0.10829	1.283	0.0013	0 Cd3g	Antígeno CD3, polipéptido gamma	U030789	NM_009850.1	BC027528	MGI: 88333
					0.3949						
Z00008387-1	3.3617	3.4825	-0.1208	1.32	0.0013	0 D16Ert d480e	Segmento de ADN, Chr 16, ERATO Doi 480, expresado	U017162	NM_144550.2	AK048789	
					0.405						

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
Z00058668-1	2.7168	2.841	-0.1242	1.331	0.0015	0 2410195 B05Rik	Gen RIKEN cDNA 2410195B05	U006185	NM_030241.1	AK008845	
					0.4327						
Z00029694-1	3.8014	4.0834	-0.282	1.914	0.0015	0 5730442 P18Rik	Gen RIKEN cDNA 5730442P18	U013415		AF215666	
Z00015708-1	2.9609	3.0809	-0.11919	1.315	0.0016	0 Elovl7	Miembro 7 de familia ELOVL, elongación de ácidos grasos de cadena larga (levadura)	U015234	NM_029001.2	AK018616	
					0.4486						
Z00027266-1	2.5555	2.6589	-0.1034	1.268	0.0017	0 4930535 E21Rik	Gen RIKEN cDNA 4930535E21	U030932	NM_029212.1	ABO48860	MGI: 1922464
					0.4579						
Z00032444-1	2.7836	2.8868	-0.1032	1.268	0.0019	0 Mylc2b	Cadena ligera de miosina, regulador B	U038037	NM_023402.1	AK002885	MGI: 107494
					0.5016						
Z00014295-1	3.141	3.25059	-0.10959	1.287	0.0019	0 Hsd12	Deshidrogenasa hidroxisteroide tipo 2	U004381	NM_024255.1	AJ293845	
					0.5061						
Z00024114-1	2.5759	2.7035	-0.1276	1.341	0.002	0 Cdx1	caudal tipo caja homeo 1	U038465	NM_009880.2	BC019986	MGI: 88360
					0.5224						
Z00009280-1	3.419	3.543	-0.124	1.33	0.0021	0 Nhsl1	NHS-tipo 1	U011305	NM_173390.2	AK043447	MGI: 106390
					0.5336						
Z00023930-1	2.835	2.9775	-0.142	1.388	0.0021	0 Gdf15	factor 15 de diferenci-	U029924	NM_011819.1	AF159571	MGI: 134604

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
			5				ación de crecimiento				7
Z00025459-1	2.8792	2.9792	-0.1	1.258	0.0027	0 Arid3a	Dominio 3A interactivo rico en AT (tipo Bright)	U011730	NM_007880.1	AK034824	MGI:13283.60
					0.6414						
Z00006544-1	3.4135	3.53379	-0.12029	1.319	0.0027	0 Npepps	Aminopeptidasa sensible a puromicina	U033337	NM_008942.1	BC009653	MGI:1101358
					0.6414						
Z00024111-1	3.3292	3.4378	-0.1086	1.284	0.0028	0 Syt10	sinaptotagmina 10	U105649	NM_018803.1	AK051232	
					0.6568						
Z00033010-1	2.7361	2.8298	-0.0937	1.24	0.0029	0 Efemp2	Factor de crecimiento epidermal que contiene proteína 2 de la matriz extracelular tipo fibulina	U051376	NM_021474.2	AF104223	MGI:1891209
					0.6608						
Z00056587-1	2.6828	2.7909	-0.1081	1.282	0.0032	0 1810003N24Rik	Gen RIKEN cDNA 1810003N24	U032536	NM_025443.1	AF349950	
					0.7043						
Z00057248-1	2.6492	2.7745	-0.1253	1.334	0.0033	0 Xlr	Complejo regulado en linfocitosX-(Xlr) enlazado de Mus musculus	U040096	NM_027510.1		
Z00023103-1	2.9645	3.08749	-0.12299	1.327	0.0033	0 Clic5	Canal 5 intracelular de cloruro	U043605	NM_172621.1	AK017800	
					0.7043						
Z00060328-1	3.1619	3.32199	-0.16009	1.445	0.0033	0 Bzwl	Dominios 1 de cremallera y W2 de leucina básicos	U000306	NM_025824.2	AK004784	

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
					0.7116						
Z00036150-1	3.1027	3.20829	-0.10559	1.275	0.0034	0 Fcgrt	Receptor Fc, IgG, transportador de cadena alfa	U028514	NM_010189.1	AK008167	MGI:103017
					0.7116						
Z00060861-1	2.5462	2.6452	-0.099	1.256	0.0034	0 1810047 C23Rik	Gen RIKEN cDNA 1810047C23	U009309	NM_138668.1	AK075795	
					0.7166						
Z00062597-1	2.7107	2.80359	-0.09289	1.238	0.0038	0 Fst	Foliostatina	U035199	NM_008046.1	AK079916	
					0.7706						
Z00068378-1	3.2094	3.3546	-0.1452	1.397	0.0039	0		U058896			
					0.7736						
Z00022408-1	3.4615	3.5743	-0.1128	1.296	0.0039	0 Cited2	Trans-activador interactuante ante Cbp/p300, con dominio carboxi-terminal rico en Glu/Asp, 2	U011296	NM_010828.1	AK177398	MGI:1306784
Z00022297-1	2.9252	3.0228	-0.0976	1.251	0.004	0 Rhoj	Familia de genes homólogos ras, miembro J	U014096	NM_023275.1	ABO60651	MGI:1931551
					0.7784						
Z00003251-1	2.7864	2.88129	-0.09489	1.244	0.0041	0	UI-M-FY0-ccp-j-21-0-UI.r1 NIH_BMAP_FY 0 Mus musculus cDNA clon IMAGE:6822742	U271068			
					0.7806						

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
Z00001120-1	2.7223	2.81329	-0.09099	1.233	0.0042	0 Thop 1	thimct oligopeptidasa 1	U011773	NM_022653.2	AF314187	MGI:1354165
					0.7925						
Z00015596-1	2.922	3.12919	-0.20719	1.611	0.0044	0 Oact 1	1 que contiene el dominio O-aciltransferasa (unido a membrana)	U014692	NM_153546.1	AK020281	
Z00055229-1	2.8801	3.00939	-0.12929	1.346	0.0044	0 LOC380843	PREDICHO : Mus musculus similar a proteína FLJ30829 hipotética	U014794	XM_354752.2		
					0.7972						
Z00061294-1	2.8519	2.94839	-0.09649	1.248	0.0044	0					
					0.8005						
Z00036109-1	2.5678	2.66	-0.0922	1.236	0.0046	0 Lamb1-1	Subunidad 1 de laminina B1	U013837	NM_008482.1	AK013952	MGI:96743
					0.8062						
Z00018830-1	2.8117	2.90509	-0.09339	1.239	0.0047	0 C1r	componente 1 del complemento o subcomponente r	U020779	NM_023143.1	AF148216	
					0.8062						
Z00016016-1	2.9404	3.06639	-0.12599	1.336	0.0047	0 Plec1	plectina 1	U036336	NM_011117.1	AF188006	MGI:1277961
					0.8062						
Z00058245-1	3.2352	3.3367	-0.1015	1.263	0.0048	0 LOC382906	PREDICHO : Mus musculus similar a Ac2-008 (LOC382906), ARNm	U056292	XM_356744.1		
Z00059003-1	2.6504	2.7513	-0.100	1.261	0.0056	0 Slit2	Homólogo 2 slit	U005564	NM_178804.2	AF074960	MGI:1315205

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
			9				(Drosophila)				
					0.8199						
Z00009502-1	2.5168	2.61079	-0.09399	1.241	0.0057	0 Hspb1	proteína 1 de choque térmico	U006295	NM_013560.1	AF047377	MGI:96240
					0.8199						
Z00034606-1	3.1133	3.22649	-0.11319	1.297	0.0055	0 Kdelr2	Receptor 2 de retención de proteínas del retículo endoplásmico KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)	U006405	NM_025841.1	AJ278133	
					0.8199						
Z00020266-1	3.3706	3.47999	-0.10939	1.286	0.005	0 Arfrp2	Proteína 2 relacionada con factor de ribosilación ADP	U015265	NM_172595.1	AK039965	
					0.8199						
Z00060766-1	2.6172	2.7079	-0.0907	1.232	0.0057	0 1300007B12Ri k	Gen RIKEN cDNA 1300007B12	U021785	NM_020588.1	AB041592	
					0.8199						
Z00038671-1	2.6457	2.73339	-0.08769	1.223	0.005	0 D5Bwg0834e	Segment de ADN, Chr 5, expresado Brigham & Women's Genetics 0834	U026739	NM_144819.1	AK028192	
Z00056132-1	3.3804	3.4904	-0.11	1.288	0.0057	0 Wasl	Tipo síndrome de Wiskott-Aldrich (humano)	U027087	NM_028459.1	AJ318416	MGI:1920428
					0.8199						
Z00024939-1	2.5325	2.65519	-0.12269	1.326	0.0049	0 Irf7	Factor regulador de interferón 7	U029451	NM_016850.1	AK002830	
					0.8199						

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
Z00015996-1	2.7647	2.8515	-0.0868	1.221	0.0052	0 Akap2, Palm2	Una proteína 2 de anclaje a quinasa (PRKA)	U042535	NM_009649.1	AF033274	MGI:1306795
					0.8199						
Z00068882-1	2.5079	2.6034	-0.0955	1.245	0.005	0 LOC432634	PREDICHO : Mus musculus LOC432634 (LOC432634), ARNm	U092058	NM_488625.1		
					0.8199						
Z00066890-1	2.6898	2.7805	-0.0907	1.232	0.0054	0	Clon de ADNc de cerebro de Mus musculus macho adulto enriquecido de longitud completa BY 122082 RIKEN L630004J03	U149831			
Z00055441-1	3.4335	3.5426	-0.1091	1.285	0.0061	0 Atp6v0c	ATPasa, transportador de H+, subunidad V0	U017709	NM_025272.2	AK007610	
					0.8288						
Z00005843-1	3.8481	4.03849	-0.19039	1.55	0.0061	0 Aphla	Homólogo defectuoso 1a de la faringe anterior (C. elegans)	U021958		AK178736	
					0.8288						
Z00043229-1	3.0792	3.19029	-0.11109	1.291	0.006	0 2600009E05Rik	Gen RIKEN cDNA 2600009E05	U023361	XM_485067.1	AK011170	
					0.8288						
Z00007361-1	2.5133	2.60639	-0.09309	1.239	0.0062	0 E130014J05Rik	Gen RIKEN cDNA E130014J05	U024673		AK033781	

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
					0.8288						
Z00035126-1	3.0869	3.188	-0.1011	1.262	0.0062	0 Wasl	Tipo síndrome Wiskott-Aldrich (humano)	U027087	NM_028459.1	AJ318416	
					0.8288						
Z00060705-1	2.8653	2.9904	-0.1251	1.333	0.0062	0 Cd2ap	Proteína asociada a CD2	U037819	NM_009847.2	AF077003	
					0.8288						
Z00067827-1	2.8661	2.9568	-0.0907	1.232	0.0062	0					
					0.8288						
Z00030081-1	2.9433	3.1123	-0.169	1.475	0.0062	0					
					0.8288						
Z00063055-1	2.9086	3.0162	-0.1076	1.281	0.0066	0	Clon de ADNc de Musculus	U009314		AB120968	
Z00023416-1	2.7264	2.8117	-0.0853	1.217	0.0068	0 Tnfrsf14	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 14 (mediador en la entrada de virus herpes)	U025864	NM_178931.2	AF515707	
					0.8527						
Z00021381-1	3.2692	3.38189	-0.11269	1.296	0.0068	0 Gyk	glicerol quinasa	U039513	NM_008194.2	AK008186	
					0.8601						
Z00022714-1	3.2862	3.3849	-0.0987	1.255	0.0071	0 Grcc3f	Racimo rico en genes, gen C3f	U007393	NM_145130.1	AK083687	
					0.8608						

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
Z00024151-1	2.68 91	2.790 4	- 0.101 3	1.262	0.007	0 Rasgrfl	Factor 1 liberador de nucleotidos de guanina específico para proteínas RAS	U01084 4	NM_0112 45.1	AF169826	
Z00011773-1	2.50 31	2.594 8	- 0.091 7	1.235	0.007	0 Adamts 2	Una tipo desintegrina y metalo-proteasa (tipo reprotisina) con tromboes-pondina tipo 1 motivo, 2	U01255 5		AK084657	
					0.8608						
Z00035615-1	3.06 93	3.158 69	- 0.089 39	1.228	0.0072	0 Cobl	cordón-bleu	U03251 8	NM_1724 96.2	AK028833	
					0.8608						
Z00066214-1	4.02 45	4.168	- 0.143 5	1.391	0.0072	0					
					0.8608						
Z00043624-1	2.55 83	2.708 6	- 0.150 3	1.413	0.0073	0 Chmp4b	Proteína 4B modifi-cadora de cromatina	U00269 1	NM-029362.2	AK008205	
					0.8667						
Z00040734-1	2.84 16	2.944 69	- 0.103 09	1.267	0.0073	0 4930432 B04Rik	Gen RIKEN cDNA 4930432B0 4	U00212 6	XM_1302 87.6	AK014169	
					0.8701						
Z00026828-1	3.52 52	3.783 5	- 0.258 3	1.812	0.0077	1 E030010 A14	Proteína hipotética de Mus musculus E030010A1 4 (E030010A 14), ARNm	U01931 4	NM_1831 60.1	AK086895	
					0.8976						
Z00055606-1	3.12 44	3.298 19	- 0.173	1.492	0.0078	0 Tsx	Gen enlazado a	U02009 9	NM_0094 40.1	AK018925	

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
			79				X específico para testículos				
					0.8976						
Z00008080-1	3.19 37	3.383 99	- 0.190 29	1.549	0.008	0 Prkcbp1	Proteína 1 de unión a proteína quinasa C	U02366 4	NM_0272 30.2	AB093284	
					0.8993						
Z00057842-1	2.77 6	3.220 9	- 0.444 9	2.785	0.008	1 Nptx2	Pentraxina 2 neuronal	U13088 3	NM_0167 89.2	AF049124	
					0.8993						
Z00025293-1	2.95 41	3.043	- 0.088 9	1.227	0.008	0 Gdf1, Las1	Factor 1 de diferenciación del crecimiento	U12772 2	NM_0081 07.2	AK053885	
					0.9032						
Z00030376-1	2.9933	3.104 39	- 0.111 09	1.291	0.0083	0 2700062 C07Rik	Gen RIKEN cDNA 2700062C07	U01848 2	NM_0265 29.2	AK011228	
					0.9164						
Z00049596-1	2.7014	2.842 6	- 0.141 2	1.384	0.0083	0 9130218 O11Rik	Gen RIKEN cDNA 913021801	U03636 9	NM_1778 20.2	BC038135	
					0.9164						
Z00054220-1	3.4174	3.521 9	- 0.103 79	1.269	0.0084	0 Dnajb10	Homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 10	U00047 0	NM_0202 66.1	AB028858	
					0.9186						
Z00016776-1	2.8349	2.921 09	- 0.086 19	1.219	0.0085	0 Ssb	Antígeno B del síndrome de Sjogren	U00187 5	NM_0092 78.1	AK017822	
					0.9218						
Z00026542-1	2.6124	2.703 29	- 0.090 89	1.232	0.0086	0 D130060 C09Rik	Gen RIKEN cDNA D130060C0	U00235 7	NM_1770 54.3	AK080364	

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
							9				
					0.9218						
Z00036665-1	3.5566	3.67839	-0.12179	1.323	0.0085	0 Atp2c1	ATPasa, secuestro de Ca++	U031277	NM_175025.2	AJ551270	
					0.9218						
Z00018373-1	3.6543	3.77009	-0.11579	1.305	0.0087	0 Smad4	Homólogo 4 de MAD (Drosophila)	U038549	NM_008540.2	AK004804	
					0.9218						
Z00019928-1	2.6567	2.7401	-0.0834	1.211	0.009	0 D330010C22Rik	Gen RIKEN cDNA 330010C22	U025841	XM_131865.5	AK052224	
					0.939						
Z00009274-1	3.0732	3.19439	-0.12119	1.321	0.0091	0 Sulf2	sulfatasa 2	U023667	XM_358343.2	AK008108	
					0.9435						
Z00032201-1	3.3134	3.45679	-0.14339	1.391	0.0095	0					
					0.9555						
Z00040312-1	2.8784	2.9664	-0.088	1.224	0.0093	0 Abi3	Familia de genes ABI, miembro 3	U033309	NM_025659.1	AK008928	
					0.9555						
Z00057502-1	2.9689	3.0567	-0.0878	1.224	0.0095	0 Znhit2	Dedo de zinc, dominio HIT que contiene 2	U038703	NM_013859.2	AF119498	
					0.9555						
Z00070092-1	2.6803	2.77349	-0.09319	1.239	0.0095	0					
					0.9555						
Z00006417-1	2.4712	2.55929	-0.088	1.224	0.0096	0 Hs3st3b	Sulfato de heparano	U032915	NM_018805.1	AF168992	

ES 2 543 015 T3

Caracterizado	Media (H19mut, LOI+)	Media (H19ts, LOI-)	Relación Log	Veces de Cambio	PPFDR	Símbolo ruidoso	Anotación	Índice de Genes Racimo 'U'	RefSeqAcc	AccGenBank	MGI
			09			1	(glucos- amina) 3-O- sulfotrans- ferasa 3B1 (Hs3sL3b1) de Mus musculus, ARNm				
					0.9593						
Z00006170-1	3.2905	3.39939	-0.10889	1.284	0.0097	0 Cpne3	copina III	U051430	NM_027769.1	AK017357	
					0.9593						
Z00024368-1	4.3807	4.93979	-0.55909	3.623	0.0099	1 Slc6a9	Familia 6 de soporte de solutos (transportador del neuro- transmisor, glicina), miembro 9	U004714	NM_008135.1	AK014572	
Z00036435-1	2.6826	2.7806	-0.098	1.253	0.0099	0 Pcdhal1 y otros	protocadherina alfa 11	U018601	NM_00103671.1	AB008178	
					0.9675						

Estos resultados fueron confirmados mediante análisis RT-PCR cuantitativa en tiempo real de 15.000 criptas adicionales microdisseccionadas de 12 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-) adicionales (Fig. 2A). La duplicación prevista de los niveles de ARNm de *Igf2* también se confirmó en ratones LOI (+) (Fig. 2A). Los genes de orden superior que muestran expresión alterada con LOI incluían: *Cdc6*, 1,55 veces ($P = 0,003$), un factor esencial de licencia que conduce a la iniciación de la replicación del ADN y el inicio de la fase S (Dutta (1997); Coleman (1996)); *Mcm5*, 1,47 veces ($P = 0,007$) y *Mcm3*, 1,49 veces ($P = 0,002$), ambos necesarios para la replicación de ADN en la fase S temprana (18, 19); *Chaf1a*, 1,61 veces ($P = 0,009$), que monta el octámero de histona sobre el ADN replicante (20); *Lig1*, 1,54 veces ($P = 0,008$), ADN ligasa implicada en formar parte de fragmentos de Okazaki durante la replicación del ADN (Tomkinson y Mackey, *Mutat Res* (1998) 407:1-9); y *Cone1* 1,38 veces ($P = 0,04$), que estimula la replicación del conjunto complejo mediante la cooperación con *Cdc6* (Coverley et al, *Nat Cell Biol* (1992) 4:523-528)) (Fig. 2A, Tabla 4, *supra*).

Tabla 7. Señalización de Genes diana de Wnt/b-catenina.

Característica ID	Intensidad - med.	Media (H19 ts)	Media (H19 mut)	Var (Factor)	Relación Log	Veces de cambio	VarCerr)	VarCerr) liso	MSE Final	t	P	F D R	orden	Símbolo de gen	Anotación	Índice de Genes Radimo 11	RefSeq Acc	AccGenBank	MG1
Z000070655-1	3.8407	3.8819	3.7995	0.0102	-0.08247	0.82706	0.01105	0.00297	0.0110	0.96	0.3364	1	8603	Atoh1	homólogo 1 atonal (Drosophila)	U00695	NM_007500.2	AK082354	MGM04654
Z000051133-1	3.5589	3.5405	3.5774	0.0020	0.03683	1.08851	0.00055	0.00232	0.0023	0.93	0.3491	1	9000	Axin1	axina 1	U01770	NM_009733.1	AF009011	
Z000025419-1	2.5	2.5	2.5	0	0	1	0.00174	0.00174	0.0017	0	1	1	3595	Axin2	axina 2	U01348	NM_015732.3	AF073788	MGM27086
Z000000758-1	3.7889	3.6935	3.8842	0.0545	0.19065	1.55112	0.01252	0.00285	0.0125	2.08	0.0370	1	1052	Birc5	IAP repet. baculoviral que contiene	U01360	NM_001012272.1	AB013813	MGM20351
Z000005043-1	3.8149	3.8284	3.8015	0.0010	-0.02087	0.94001	0.00068	0.00297	0.0029	0.60	0.5460	1	1533	Bmp2	proteína 4 morfogenética de huesos	U03545	NM_007354.1	BC013459	MG188180
Z000025624-1	2.6509	2.6477	2.654	0.0000	0.00636	1.01476	0.00081	0.00171	0.0017	0.18	0.8507	1	2797	Cxrb	receptor de colecistoquinina B	U00856	NM_007627.2	AF019371	MG199479
Z000054794-1	3.2751	3.298	3.2521	0.0031	-0.04597	0.89957	0.00022	0.00199	0.0019	1.26	0.2065	1	5049	Cxkb	receptor de colecistoquinina B	U00856	NM_007627.2	AF019371	MG199479
Z000034025-1	3.6261	3.6211	3.631	0.0001	0.00993	1.02313	0.00297	0.00254	0.0025	0.24	0.8091	1	2605	Cend1	ciclina D1	U06873	NM_007631.1	AK005352	MG188313
Z000018618-1	4.3576	4.3637	4.3515	0.0002	-0.01223	0.97223	0.01036	0.00432	0.0103	0.14	0.8828	1	2954	Cend2	ciclina D2	U20125		AK009602	MG188314
Z000007066-1	2.7941	2.7672	2.821	0.0043	0.05375	1.13174	0.00179	0.00156	0.0017	1.55	0.1198	1	2867	Cend3	ciclina D3	U01806	NM_007632.1	AK020317	
Z000056012-1	2.5799	2.6095	2.5503	0.0052	-0.05918	0.87262	0.00294	0.00151	0.0029	1.33	0.1813	1	4411	Cend3	ciclina D3	U01806	NM_007632.1	AK020317	
Z000063293-1	3.14	3.1377	3.1424	0.0000	0.00467	1.01082	0.0074	0.00208	0.0074	0.06	0.9470	1	3262	Cd44	antígeno CD44	U06945	NM_009851.1	AJ251594	MG188338

*

Z00005927-1	2.8612	2.8599	2.8625	0.0000	0.00263	0.00861	0.00166	0.0086	0.05	0.9724	1	3186	Cd44	antígeno CD44	L06945 2	NM_009 851.1	AJ25.5 94	MG1.8 8338
Z000049443-1	2.5145	2.5246	2.5044	0.0006	- 0.02019	0.00174	0.00174	0.0017	0.59	0.5535	1	1558	Cd44	antígeno CD44	L06945 2	NM_009 851.1	AJ25.5 94	MG1.8 8338
Z000070277-1	2.9262	2.9683	2.904	0.0062	- 0.06439	0.00035	0.00168	0.0016	1.92	0.0547	1	1452	Cldn 3	claudina 1	L03893 4	NM_016 674.2	AF0721 27	
Z00006481-1	2.5	2.5	2.5	0	0	0.00174	0.00174	0.0017	0	1	1	3669	Dkk1	homólogo 1 dickkopf (Xenopus laevis)	L03896 6	NM_010 051.2	AF0354 33	MG1.1 32904 0
Z00022486-1	2.5302	2.5361	2.5042	0.0015	- 0.03196	0.00174	0.00174	0.0017	0.93	0.3481	1	8965	Ecdn1	endotelina 1	L01476 7	NM_010 104.2	AB0816 57	MG1.9 5283
Z00025428-1	3.0797	3.0803	3.0792	0	- 0.00102	0.00607	0.00179	0.0060	0.01	0.9576	1	3464	Ecdn2	endotelina 2	L00474 7	NM_007 902.1	BC0370 42	MG1.9 5284
Z00023879-1	2.9723	2.9785	2.9661	0.0002	- 0.01245	0.00023	0.00167	0.0016	0.37	0.7092	1	2178	Edn3	endotelina 3	L00293 2	NM_007 903.2	AK0461 64	
Z00024437-1	2.5	2.5	2.5	0	0	0.00174	0.00174	0.0017	0	1	1	4018	Ephb 1	receptor B1 de Eph	L03125 1	NM0734 47.2	AK0339 66	MGM 09633 7
Z00016127-1	3.925	3.9215	3.9285	0.0000	0.00704	0.00222	0.0033	0.0033	0.15	0.8506	1	2942	Ephb 2	receptor B2 de Eph	L02567 1	NM_010 142.1	BC0430 88	MG1.9 9611
Z00036008-1	3.4324	3.4364	3.4284	0.0001	- 0.00799	0.00014	0.00238	0.0023	0.20	0.8408	1	2751	Ephb 2	receptor B3 de Eph	L02567 1	NM_010 142.1	BC0430 88	MG1.9 96.1
Z00023582-1	2.927	2.941	2.9129	0.0011	- 0.02813	0.00065	0.0017	0.0017	0.83	0.403	1	1059	Fg18	factor de crecimiento de fibroblastos 18 de Mus musculus (Fg18), ARNm	L03264 0	NM_008 005.1	AB0046 39	MG1.1 27798 0
Z00024414-1	2.5	2.5	2.5	0	0	0.00174	0.00174	0.0017	0	1	1	3824	Fg20	factor de crecimiento de fibroblastos 20	L02974 9	NM_030 610.1	AB0492 18	
Z00063460-1	3.0249	3.0409	3.009	0.0015	- 0.03191	0.00021	0.00185	0.0018	0.90	0.3635	1	9420	Fg20	factor de crecimiento de fibroblastos 20	L02974 9	NM_030 610.1	AB0492 18	

Z00059537-1	2.7353	2.7572	2.7134	0.00288	-	0.04381	0.90405	0.00211	0.0016	0.0021	1.16	0.2430	1	5966	Fos1	antígeno 1 tipo fos	L03872	NM_010235.1	BC052917	MG1:907179
Z00005762-1	3.0472	3.0891	3.0053	0.01052	-	0.08375	0.82461	0.00631	0.00173	0.0063	1.29	0.1964	1	4785	Fos1	antígeno 1 tipo fos	L03872	NM_010235.1	BC052917	MG1:907179
Z00011562-1	3.4221	3.4033	3.4408	0.0021	0.03745	0.03745	1.09006	0.00378	0.00214	0.0037	0.74	0.4555	1	12278	Id2	inhibidor de unión 2 a ADN	L03384	NM_010496.2	AK003222	MG1:96397
Z00035530-1	2.8214	2.8025	2.8404	0.00216	0.03793	0.03793	1.09126	0.00045	0.00165	0.0016	1.14	0.2519	1	6205	Jun	oncogen Jun	L02527	NM_010591.1	AK178729	MG1:96646
Z00005284-1	2.8397	2.852	2.8275	0.0009	-	0.02455	0.94503	0.00148	0.00166	0.0016	0.73	0.4609	1	12446	Lica	molécula de adhesión celular L1	L03946	NM_008478.2	A027046	MG1:96721
Z00005278-1	2.5	2.5	2.5	0	0	0	1	0.00174	0.00174	0.0017	0	1	1	37193	Letf	factor 1 de unión potenciador linfoides	L00385	NM_010703.2	AK018038	MG1:96770
Z00021747-1	3.6315	3.577	3.6861	0.01787	0.10916	0.10916	1.28576	0.00364	0.00252	0.0036	2.21	0.0268	1	830	Met	proto-oncogen met	L04272	NM_008591.1	M33424	MG1:96969
Z00006485-1	2.7883	2.7869	2.7896	0.0001	0.00268	0.00268	1.00618	0.00077	0.00187	0.0016	0.08	0.9360	1	32098	Met	proto-oncogen met	L04272	NM_008591.1	M33424	MG1:96969
Z00060212-1	4.6201	4.6625	4.5778	0.01076	-	0.08468	0.82285	0.01398	0.00504	0.0139	0.87	0.3802	1	9908	Mmp7	metaloproteínasa 7 de la matriz	L01002	NM_010810.1	AY622968	MG1:905189
Z00009098-1	3.1298	3.1561	3.1035	0.00416	-	0.05264	0.88585	0.01273	0.00193	0.0127	0.57	0.5676	1	16132	Myc	oncogen de mielocito-matosis	L01629	NM_010849.2	AF076523	MG1:97250
Z00056888-1	4.0212	4.0492	3.9933	0.00469	-	0.05594	0.87915	0.02324	0.00336	0.0232	0.44	0.6530	1	19412	Myc	oncogen de mielocito-matosis	L01629	NM_010849.2	AF076523	MG1:97250
Z00034803-1	3.5785	3.5774	3.5796	0.0001	0.00213	0.00213	1.00491	0.00103	0.00224	0.0022	0.05	0.9564	1	33077	Myeb	proteína de unión c-myc	L115310	NM_017475.1	AB015858	MGM891750
Z00040077-1	3.0751	3.0929	3.0573	0.00189	-	0.03552	0.92146	0.00198	0.00179	0.0019	0.97	0.3274	1	8339	C130	gen RIKEN 0760 cDNA OTR1 C130076007	L00391	NM176930.2	AJ543321	

Z00006732-1	3.4264	3.4535	3.3944	0.00616	-0.06407	0.86284	0.00657	0.00233	0.00657	0.968	0.33304	1	8492	Plaur	receptor de activador de plasminógeno uroquinasa	U007797	NM_011113.2	AK002580	MGL197612
Z000066290-1	3.8479	3.8443	3.8515	0.00008	0.00721	1.01674	0.00371	0.00309	0.00371	0.145	0.88481	1	29625	Ppard	receptor delta de activador proliferador de peroxisoma	U017743	NM_011145.2	AK007458	MGL1901884
Z00005267-1	2.6653	2.6694	2.6612	0.0001	-0.00811	0.98149	0.00133	0.00161	0.00161	0.248	0.80426	1	25835	Ppard	receptor delta de activador proliferador de peroxisoma	U017743	NM_011145.2	AK007458	MGL1901884
Z00025191-1	2.5	2.5	2.5	0	0	1	0.00174	0.00174	0.00174	0	1	1	36947	Sox9	caja Sry que contiene gen 9	U013510	NM_011448.2	AF421878	
Z00005146-1	3.4659	3.4756	3.4562	0.00057	-0.01943	0.95624	0.01797	0.00232	0.01797	0.178	0.85916	1	28374	Sox9	caja Sry que contiene gen 9	U013510	NM_011448.2	AF421878	
Z00031571-1	2.5874	2.5917	2.5832	0.00011	-0.00858	0.98045	0.00231	0.00157	0.00231	0.219	0.82689	1	26860	Tcf7	factor de transcripción 1	U026615	NM_009327.1	BC080698	MGL198504
Z00016230-1	3.5693	3.5754	3.5631	0.00023	-0.01231	0.97266	0.0076	0.00221	0.0076	0.173	0.86264	1	28553	Tcf4	factor de transcripción 4	U018867	NM_013685.1	AK014343	MGL198506
Z00016351-1	3.1642	3.0925	3.2359	0.03088	0.14347	1.39147	0.00990	0.00186	0.00186	4.071	0.00005	8	29	Tiam	invasión y metástasis 1 de linfoma de células T	U037282	NM_009384.1	AK015851	
Z00020448-1	3.1711	3.1944	3.1477	0.00327	-0.04671	0.89803	0.00653	0.00186	0.00186	1.326	0.18455	1	4505	Vegf	factor de crecimiento vascular endotelial A	U043884	NM_009505.2	AK031905	MGL1903178

*Entre 36 genes, solamente Tiam 1 mostró un valor de p inferior a 0.0001, y los otros 35 genes no mostraron una diferencia significativa entre la LOI (-) y LOI (+)

Cuatro ratones LOI (+) y cuatro ratones LOI (-) también fueron tratados con NVP-AEW541 para inhibir la señalización de IGF2, a una dosis de 50 mg/kg por sonda gástrica oral diaria durante 3 semanas (dos veces al día todos los días excepto los fines de semana). NVP-AEW541 es un inhibidor ATP-competitivo de IGF-IR que bloquea la señalización en el receptor de IGF1, que media en la señalización de IGF2 (García-Echeverría et al, Cancer Cell (2004) 5:231-239). También se confirmó que ese NVP-AEW541 bloquea IGF2 en IGF1R in vitro (Fig. 9). Curiosamente, NVP-AEW541 tenía un efecto drástico sobre la expresión de genes relacionados con la proliferación en criptas LOI (+), con una reducción a niveles incluso más bajos que los observados en criptas LOI (-) (5 de 6 genes estadísticamente significativos): *Cdc6*, 0,49 veces (P = 0,048); *Mcm5*, 0,48 veces (P = 0,007); *Mcm3*, 0,65 veces (P = 0,1); *Chaf1a*, 0,42 veces (P = 0,010); *Lig1*, 0,42 veces (P = 0,029); y *Ccne1*, 0,57 veces (P = 0,030) (Fig. 2B). Por lo tanto, se midió en cambios inducidos por la LOI en la expresión de genes relacionados con la proliferación, al menos en parte, a través de la propia señalización de IGF2. La disminución inducida por el fármaco en la expresión de genes relacionados con la proliferación no se produjo simplemente debido simplemente a los cambios en los números de células en proliferación de las criptas, porque había aproximadamente el mismo número de células en este tratamiento a corto plazo.

Estos resultados implican que la LOI provoca una alteración específica en la expresión génica asociada con la replicación en el epitelio intestinal. No obstante, se observó per se la expresión incrementada de algunos genes no asociados con la replicación del ADN. Por ejemplo, *Card11* (1,44 veces, P = 0,04; Figura 11) es un gen anti-apoptótico que actúa a través de la fosforilación de BCL10 y la inducción de NF-κB (Narayan et al, Mol Cell Biol (2006) 26:2327-2336). La expresión de *Msi1* también se analizó mediante PCR en tiempo real, ya que el marcador de células progenitoras codificadas *Musashi-1* mostró una inmunotinción incrementada en estudios previos. La expresión de *Msi1* también se incrementó significativamente (1,49 veces, P = 0,01, Fig. 11), apoyando un mecanismo pleiotrópico para IGF2 en LOI. Además, varios genes mostraron regulación a la baja en criptas LOI (+) (Tabla 2, *supra*), incluyendo *p21* (0,55 veces, P = 0,007, Fig. 11), un inhibidor del progreso del ciclo celular (Gartel et al., Proc Soc Exp Biol Med (1996) 213:138-149).

Ejemplo 5.

Sensibilidad Mejorada de la Red de Señalización de IGF2 en LOI.

Los experimentos in vivo descritos condujeron a la determinación de si células LOI (+) tienen una sensibilidad diferencial a IGF2 y el NVP-AEW541, en que se realizó un ensayo de transducción de señales de alto rendimiento basado en un dispositivo de automatización de inmunotinción que comprende cámaras microfluídicas que albergan múltiples células. Una ventaja del chip microfluídico es que todas las células pueden cultivarse simultáneamente en el mismo chip y bajo condiciones controladas internamente, con determinación precisa del micro-entorno de la célula durante el tiempo del experimento y el subsiguiente análisis, lo que permite un número mucho mayor de mediciones de lo que sería posible por medios convencionales. El dispositivo se construyó dentro de un chip de PDMS de 2 capas monolítico sellado con un cubreobjetos de vidrio, con un suministro de medios definidos controlado por un sistema multiplexado de válvulas. También se examinó la señalización de Akt/PKB y Erk2, dos vías de señalización canónicas activadas por IGF2, después de haber derivado para este propósito líneas de fibroblastos de embrión de ratón (MEF) de embriones LOI (+) y LOI (-). Células vivas LOI (+) y LOI (-) fueron estimuladas con dosis variables de IGF2, durante períodos de tiempo variables, se fijaron y procesaron para mediciones de Akt/PKB, con todas las etapas realizadas dentro del chip.

Para cada uno de los tipos de célula, concentración de IGF2, y momentos, al menos 200 mediciones celulares individuales se obtuvieron mediante formación de imágenes digitales y análisis, proporcionando una amplia información para la evaluación estadísticamente significativa tanto de la respuesta media como de la variabilidad célula-célula. Los resultados fueron consistentes en el análisis de la variación chip a chip, utilizándose dos chips para cada una de las líneas celulares. Como se leyó, los autores de la invención utilizaron la inmunotinción de la Akt fosforilada nuclear (Ser 473) debido a su actividad nuclear en la regulación de FOXO (Shao et al, EMBO J (1999) 18:1397-1406) y otras proteínas control del progreso del ciclo celular, así como posibles interacciones con modificadores de la modulación de histonas (García Echeverría et al, Cancer Cell (20040). 5:231-239).

IGF2 desencadenó una señal de activación de Akt transitoria (pico en 10 a 40 minutos, seguido de un retorno a la línea de base dentro de 90 min) en células LOI(-) (Fig. 8A) en todas las concentraciones ensayadas (400, 800 y 1600 ng/ml), comparable a los niveles utilizados para apoyar las células madre hematopoyéticas de hígado fetal de ratón (500-1000 ng/ml) (Zhang y Lodish (2004)). En contraposición, cuando se sometieron a la más baja concentración (400 ng/ml) de IGF2, las células LOI (+) mostraron una activación de Akt acusadamente sostenida (> 120 minutos), que aumentó de manera constante en el tiempo después de la estimulación (Fig. 8A). A dosis más altas de IGF2, la señal de Akt en células LOI(+) se convirtió progresivamente más transitoria y menos pronunciada (Fig. 8A). Además de ello, si NVP-AEW541 se añadió junto con IGF2, la activación de Akt se inhibió a los niveles de la línea base en células LOI(-) y significativamente por debajo de la línea base en células LOI (+) (Fig. 8B). Las diferencias de señalización en Erk2 entre LOI (-) y LOI (+), aunque estadísticamente significativas, eran muy pequeñas en

comparación con el efecto de LOI sobre la activación de Akt (Fig. 8C), lo que sugiere que Akt tiene un papel particularmente importante en la respuesta de IGF2 en estas células. Estos resultados demuestran que la respuesta de Akt en células LOI (+) ha mejorado la sensibilidad a IGF2 en dosis más bajas, así como la hipersensibilidad a la inhibición de IGF1R.

- 5 Un mecanismo potencial de esta hipersensibilidad podría basarse en la expresión diferencial de los componentes de la red de señalización subyacente, p. ej., el receptor de IGF1, que es el receptor de señalización primario para IGF2, o miembros de la familia de receptores de insulina sensibles a IGF2 (33). Se analizó la expresión de *Igf1r*, *Igf2r*, cuyo producto proteico es un sumidero para IGF2 e *Insr*, en MEFs que muestran la respuesta de señalización alterada. Sorprendentemente, se observó una duplicación de la expresión de *Igf1r* e *Insr* en células LOI (+) (Fig. 8D).
10 Aunque, las razones de la expresión alterada de *Igf1r* e *Insr* no son claras en este punto, este cambio en la expresión de estos receptores proporciona un modelo intrigante para alteraciones en la sensibilidad de señalización en LOI.

Ejemplo 6.

- 15 La LOI Incrementa la Formación de Lesiones Premalignas en el Modelo de AOM/LOI, que muestra una Sensibilidad Incrementada a la Inhibición de la Señalización de IGF2.

Basándose en estos resultados, era de interés determinar si la inhibición de señalización de IGF2 inhibiría la carcinogénesis vivo, o incluso mostraría un efecto quimioprotector mejorado. El tratamiento con NVP-AEW541 requiere una alimentación por sonda dos veces al día, y los ratones Min desarrollan lesiones durante un período de tiempo más largo de lo que era en la práctica para el uso de este fármaco. Además, una limitación del modelo Min es que no refleja la situación humana, en la que LOI se produce en células normales antes de que esté presente la mutación *Apc* (Cui et al, *Nat Med* (1998) 4:1276-1280). De acuerdo con ello, se utilizó el modelo de azoximetano (AOM) en el que se administra el carcinógeno después del nacimiento, y las lesiones premalignas, denominadas focos de criptas aberrantes (ACF), aparecen 5 semanas después de la primera dosis. Una ventaja adicional es que AOM es un modelo de cáncer de colon de roedores ampliamente estudiado (Bissahoyo et al, *Toxicol Sci* (2005) 88:340-345; Bird (1987)).

Ocho ratones LOI (+) y 14 ratones LOI (-) recibieron AOM por vía intraperitoneal semanalmente durante 3 semanas, se sacrificaron a las 5 semanas después de la primera dosis y los ACFs fueron anotados según se describe (Bird (1987)). El examen histológico de colonos de ratones tratados con AOM confirmó la presencia de ACFs, incluyendo características hiperproliferativas el aumento de la mitosis, la ampliación de las criptas y el desorden de las criptas (Fig. 14A, B). Ratones LOI (+) mostraron $19,8 \pm 2,2$ ACF por colon, en comparación con $12,4 \pm 0,9$ ACF por colon en ratones LOI (-), un aumento del 60% ($P = 0,002$; Fig. 14A).

9 ratones LOI (+) y 9 ratones LOI (-) adicionales, compañeros de camada de control a AOM, fueron expuestos de manera similar, añadiendo un tratamiento con NVP-AEW541 para inhibir la señalización de IGF2, a una dosis de 50 mg/kg por alimentación por sonda oral diaria durante 6 semanas (dos veces todos los días excepto diariamente los fines de semana), a partir de una semana antes de la administración de AOM. Ratones LOI (-) no mostraron diferencia alguna en la formación de ACF después del tratamiento con fármacos NVP-AEW541 ($11,3 \pm 1,6$, N.S.; Fig 14A). Sorprendentemente, ratones LOI (+) mostraron una reducción notable en la formación de ACF inducida por AOM después del tratamiento con NVP-AEW541 ($7,8 \pm 1,2$, $P = 0,0002$; Fig. 14A), significativamente inferior incluso que la observada en ratones LOI (-) tratados con AOM ($P = 0,007$).

Dado que la LOI también conduce a un aumento en el peso de nacimiento y, por lo tanto, potencialmente en el tamaño del colon, se normalizó el número de ACFs a superficie específica de colon. Se observó un aumento similar en ACFs en ratones LOI (+), 59% ($P = 0,004$), al igual que una disminución similar en ratones LOI (+) tratados con el inhibidor, 56% ($P = 0,0008$), pero no hubo disminución en ACFs con inhibidor en ratones LOI (-) (Fig. 14B). Por lo tanto, la LOI de *Igf2* aumentaba la sensibilidad a AOM a través de un mecanismo dependiente de IGF1R, y los ratones LOI (+) eran más sensibles a los efectos del bloqueo de IGF1R que los eran los ratones LOI (-).

Un hallazgo adicional intrigante en ratones LOI (+) tratados con AOM eran criptas dilatadas císticamente revestidas por células alargadas con núcleos atípicos y que contiene desechos necróticos, que eran una reminiscencia de adenomas sésiles aserrados (SSAs) vistos en el colon humano (SI Fig. 13C, D). Los SSAs también muestran una dilatación de las criptas en asociación con una atipia citológica y son actualmente de enorme interés por su asociación reconocida recientemente con el cáncer colorrectal (Sonver et al. (2005)).

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos anteriores, se entenderá que modificaciones y variaciones están abarcadas dentro del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, la invención está solamente limitada por las siguientes reivindicaciones.

Desde que se informó que IGF2 causaba la reubicación de β -catenina en el núcleo in vitro y la transcripción activada de genes diana del complejo β -catenina/TCF4 (Morali et al., *Oncogene* (2001) 20:4942-4950)), se determinó si la señalización de Wnt está activada en criptas intestinales LOI (+). Sin embargo, entre los 36 genes diana de la señalización Wnt/ β -catenina, solamente Tiam1, un activador de Rac GTPasa sensible a Wnt (Malliri et al, *J Biol Chem* (2006) 281:543-548), mostró un valor P menor que 0,0001, y los otros 35 genes no mostraron diferencias significativas entre criptas LOI (-) y LOI (+) (Tabla 7, *supra*). Además, no se detectó aumento significativo alguno en la RT-PCR en tiempo real de Tiam1 (1,16 veces, P = 0,5), ni era el gen diana *Axin2* bien conocido (Yan et al, *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98:14973-14978; Vogt et al, *Cell Cycle* (2005) 4: 908-913 29) (1,19 veces, P = 0,4) (Fig. 10). Por lo tanto, la activación de la señalización de Wnt no parece estar implicada en el aumento de células progenitoras en criptas LOI (+).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY FEINBERG, Andrew P. LEVCHENKO, Andre LONGO, Dan L. KO, Minoru S.H.

5 <120> ESTRATEGIA DE QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER BASADA EN LA PÉRDIDA DE LA IMPRONTA DE IGF2

<130> JHU3010-1WO

<150> US 60.873.830

<151> 08-12-2006

<160> 39

10 <170> PatentIn version 3.4

<210> 1

< 211> 23

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cebador

<400> 1

tcccctcgcc tagtctggaa gca 23

20 <210> 2

< 211> 21

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

25 <400> 2

gaactgttcg ccaggctcaa g 21

<210> 3

< 211> 23

< 212> ADN

30 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 3

acagcagaca gcaaggggag ggt 23

35 <210> 4

< 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4
 catcgtggaa gagtgctgct 20
 10 <210> 5
 < 211> 19
 <212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 5
 gggatatctgg ggaagtcgt 19
 20 <210> 6
 < 211> 21
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 25
 aacacagaag acagctctc a 21
 30 <210> 7
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 35 gtctgaatcg atggtaaacc tg 22
 <210> 8
 < 211> 21
 < 212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 8

 cacttcaagg agcagctcag c 21

 5 <210> 9
 < 211> 20
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9

 gctcagtcga tcctctccac 20

 15 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 10

 atggatgttc gtcagtggt t 21

 25 <210> 11
 < 211> 22
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 11

 ccagaggaat gatcttaaag gc 22

 35 <210> 12
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 12

 gaagacgagg tgctcaatgc 20

 40 <210> 13
 < 211> 20

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 13

cctttgtccc ttggtgtgaa 20

10 <210> 14
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

15 <400> 14

gggacatcag cctggttaata ga 22

20 <210> 15
< 211> 22
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 15

cttagacaga ttggcaggtg aa 22

25 <210> 16
< 211> 20
< 212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 16

tgtggagtcg gatgtcagga 20

35 <210> 17
< 211> 21
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17

gggatatgtg agcaagacca a 21

<210> 18
< 211> 21
< 212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18

ccaggtcatg ctcaagtcag a 21

10 <210> 19
< 211> 22
< 212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Cebador

<400> 19

gaatggagat acgagtagcc tt 22

20 <210> 20
< 211> 23
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 20

25 cgcagagaga ctacttgac ttc 23

<210> 21
< 211> 21
< 212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 21

agccgatact gggtgtcact g 21

35 <210> 22
< 211> 20
< 212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 22

agtcagggc aaaggagtg 20

<210> 23
< 211> 21
5 < 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 23

10 gaggcacaga caggaaaaga t 21

<210> 24
< 211> 24
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 24

tccagtgaa gaggttaata caag 24

20 <210> 25
< 211> 23
< 212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 25

gatgtgtctt cctcaacttt ctc 23

<210> 26
< 211> 22
< 212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 26

cggacatttg agaagattgc gg 22

35 <210> 27

< 211> 23
< 212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 27

 agatagagaa cagggagcaa gtc 23

 5 <210> 28
 < 211> 23
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 28

 tgaaaataag gatgttgag acc 23

 15 <210> 29
 < 211> 22
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 29

 gccacttctt tccaatactg ag 22

 <210> 30
 < 211> 22
 < 212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 30

 ccaccttgaa gttaatcca gt 22

 30 <210> 31
 < 211> 23
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador

 <400> 31

 tgtccacctc tgtcaataat acc 23

 <210> 32

< 211> 22
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 32

 agttcttctg gattggctga tg 22

 <210> 33
 < 211> 23
 10 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 33

 15 gtaacgatca aagaagtcct gtg 23

 <210> 34
 < 211> 19
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 34

 tgctgggtat tgggatgct 19

 <210> 35
 25 < 211> 20
 < 212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 35

 tcggggaact ggtaggtgta 20

 <210> 36
 < 211> 23
 < 212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 36

ES 2 543 015 T3

	acagcgatat ccagacattc aga	23
	<210> 37	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 37	
	cgaagagaca acggcacact	20
10	<210> 38	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 38	
	taccaccatg taccaggca	20
	<210> 39	
	< 211> 20	
20	< 212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 39	
25	ggaggagcaa tgatcttgat	20

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinar una estrategia de intervención farmacológica para un individuo, comprendiendo el método determinar un estado de pérdida de impronta (LOI) de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2).a partir de una muestra tomada del individuo; y
- 5 determinar una estrategia de intervención farmacológica para el individuo basada en el estado de LOI determinado, en el que el individuo tiene una LOI y, por lo tanto, tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, la estrategia de intervención comprende administrar al individuo un inhibidor de la activación de la vía de señales mediante IGF2 y, si el individuo no tiene una LOI, la estrategia de intervención no comprende administrar dicho inhibidor al individuo.
- 10 2. Un método de identificar un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal en un sujeto, que comprende:
 - a) poner en contacto una célula progenitora en una muestra de un sujeto con factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2);
 - b) determinar la sensibilidad de IGF2 de la célula progenitora midiendo un cambio en la vía de señales IRS-1/PI3K/AKT o la vía de señales GRB2/Ras/ERK; y
 - 15 c) comparar la sensibilidad de IGF2 de la célula progenitora con la sensibilidad a IGF2 de una célula que carece de una LOI de IGF2; en el que un incremento en la sensibilidad de IGF2 de la célula progenitora en comparación con la célula que carece de una LOI de IGF2 se correlaciona con un riesgo incrementado de desarrollar cáncer colorrectal.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, que comprende, además, poner en contacto la célula progenitora con IGF2 en presencia de un inhibidor del receptor de IGF1.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el inhibidor es un agente seleccionado del grupo que consiste en una tifostina, una pirrolo[2,3-d]-pirimidina, y un anticuerpo monoclonal.
5. Un método de evaluar la eficacia de un régimen quimioterapéutico, que comprende:
 - a) periódicamente aislar una célula progenitora en una muestra de un sujeto que recibe un producto quimioterapéutico; teniendo o estando el riesgo el sujeto de desarrollar cáncer colorrectal;
 - 25 b) poner en contacto la célula progenitora en la muestra con factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2); y
 - c) determinar la sensibilidad de la célula progenitora a IGF2 midiendo un cambio en la vía de señales IRS-1/PI3K/AKT o la vía de señales GRB2/Ras/ERK, en donde una reducción en la sensibilidad a IGF2 en comparación con un nivel previamente determinado de sensibilidad exhibido por una célula progenitora del individuo se correlaciona con una eficacia incrementada del régimen
 - 30

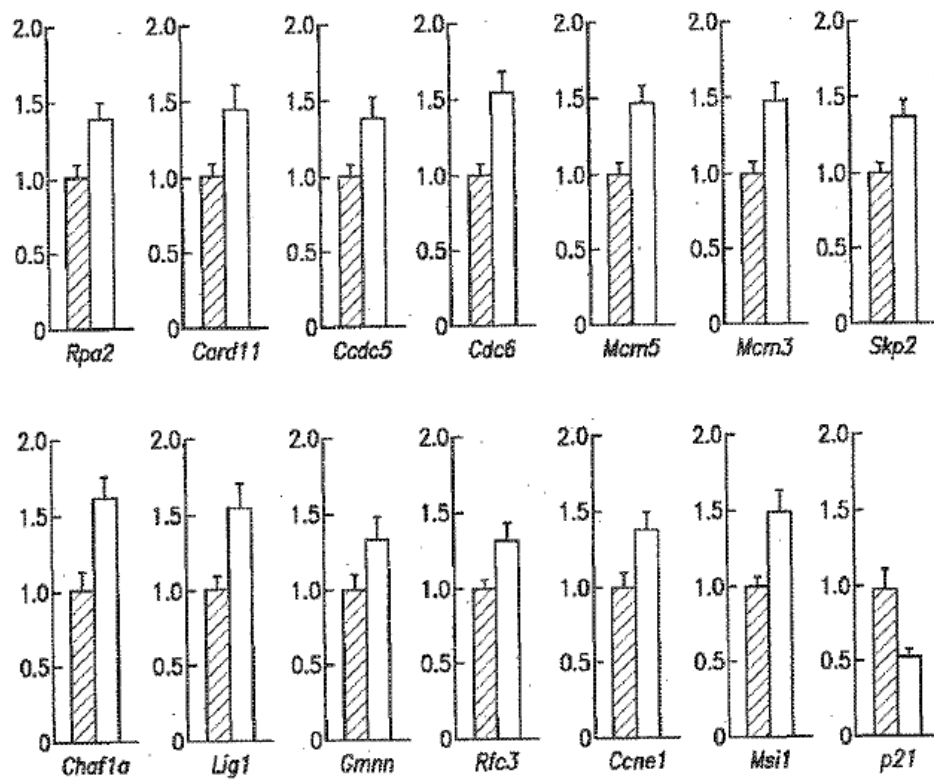


FIG. 1

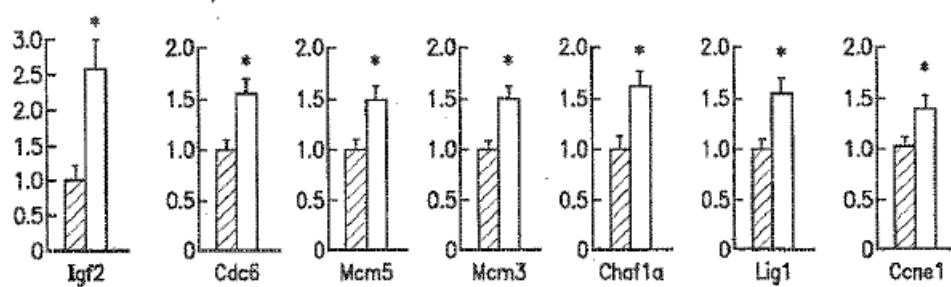


FIG. 2A

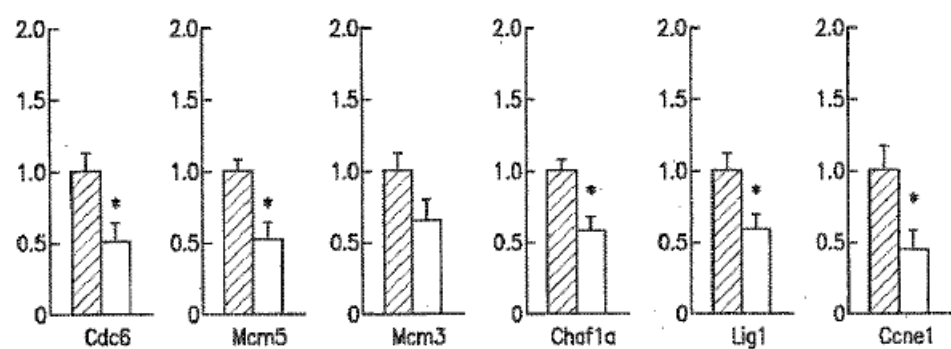


FIG. 2B

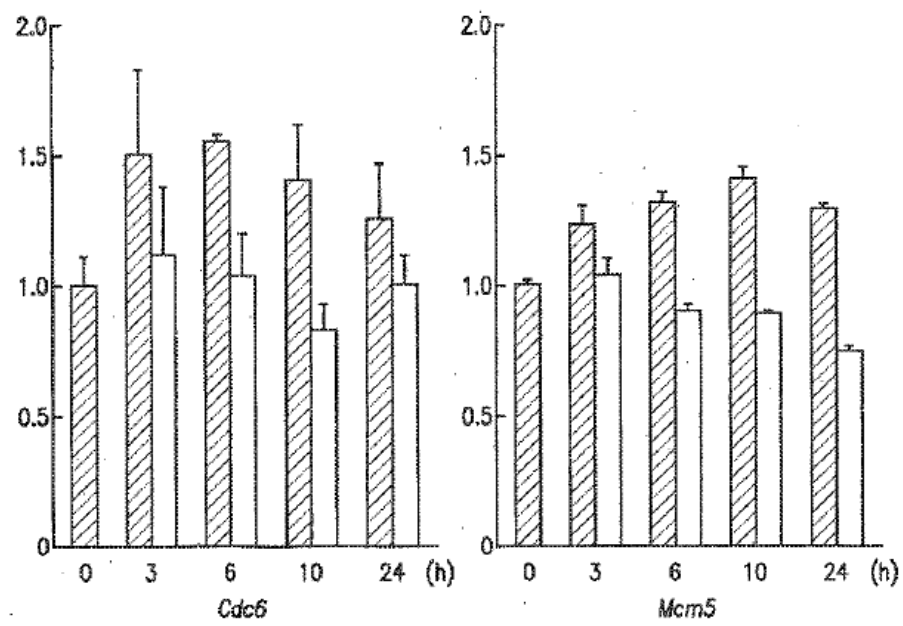


FIG. 3

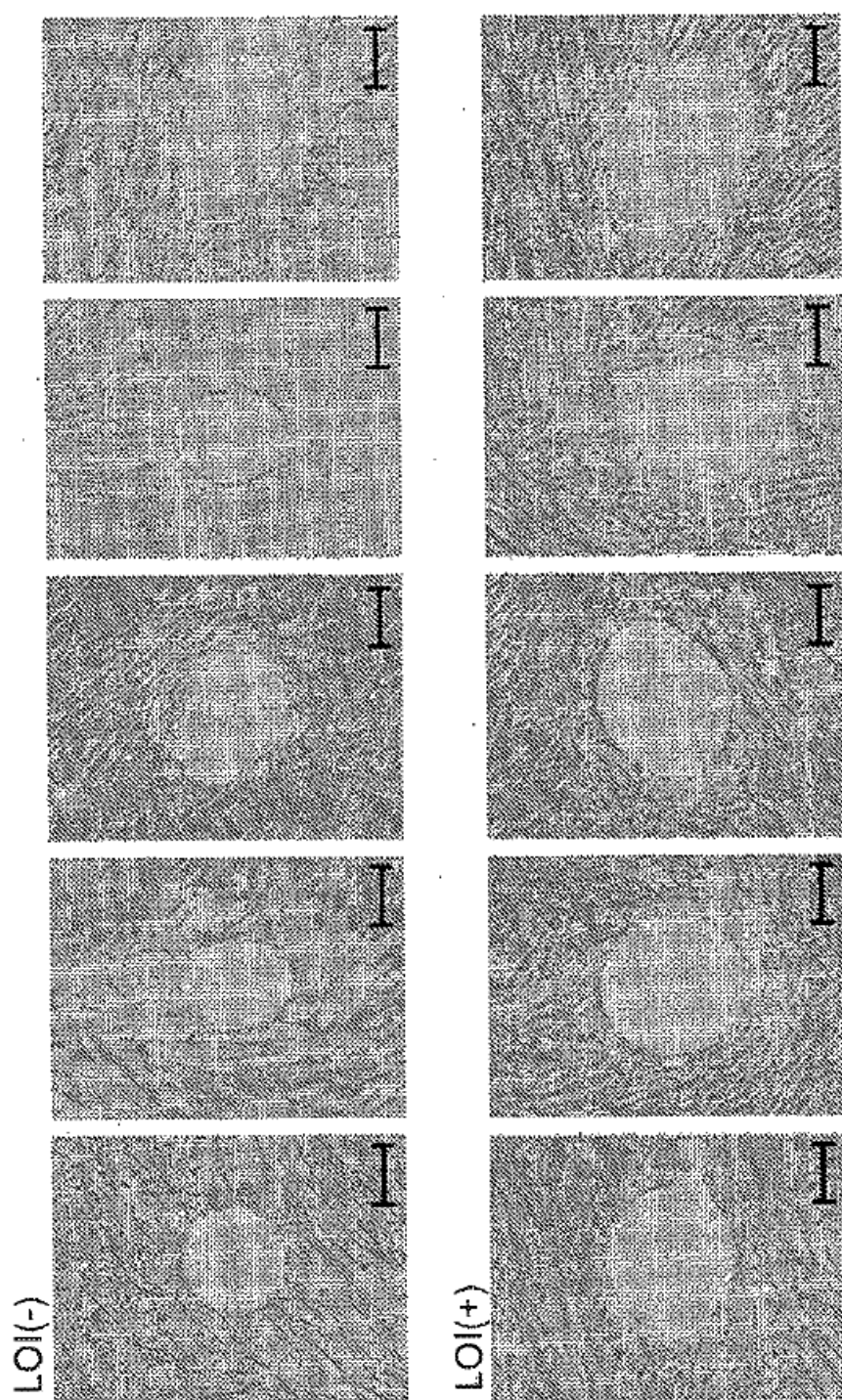


FIG. 4

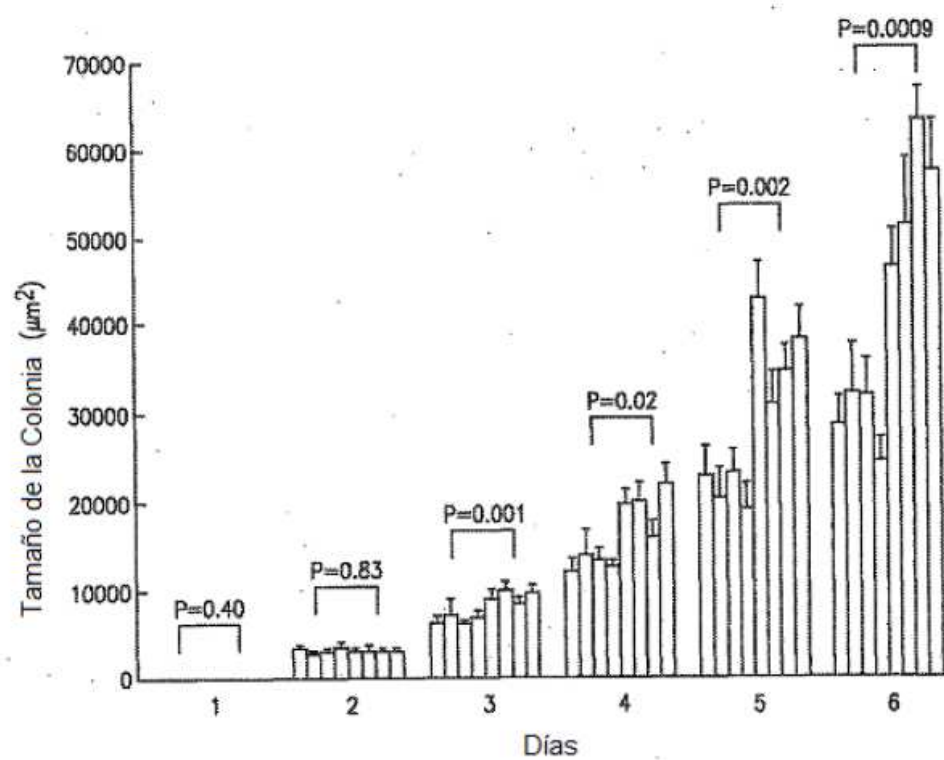


FIG. 5

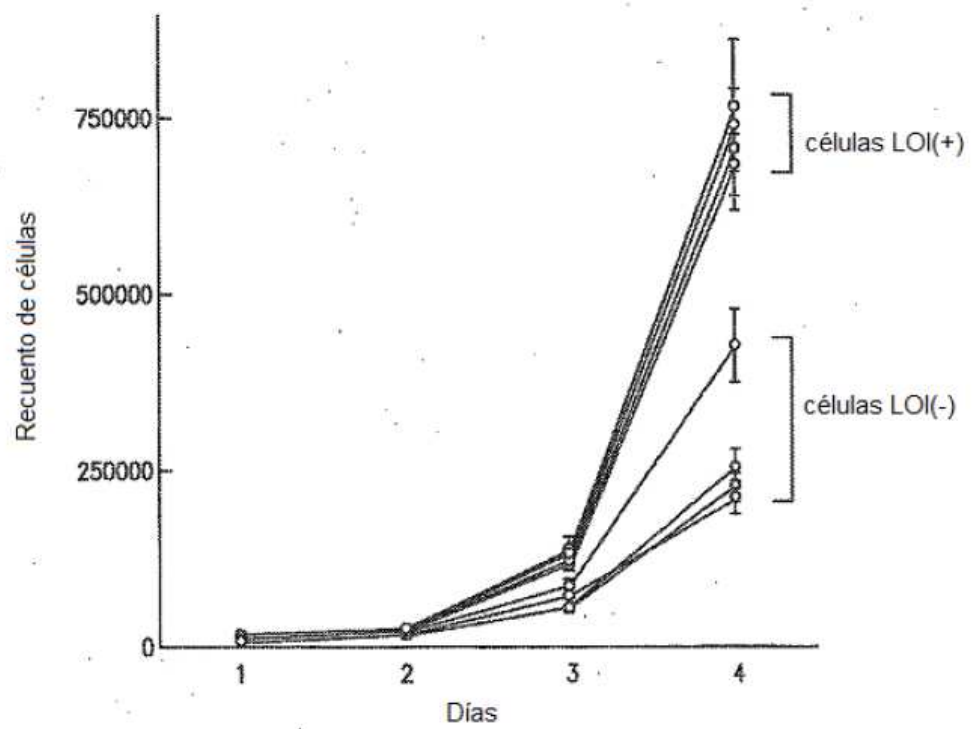


FIG. 6

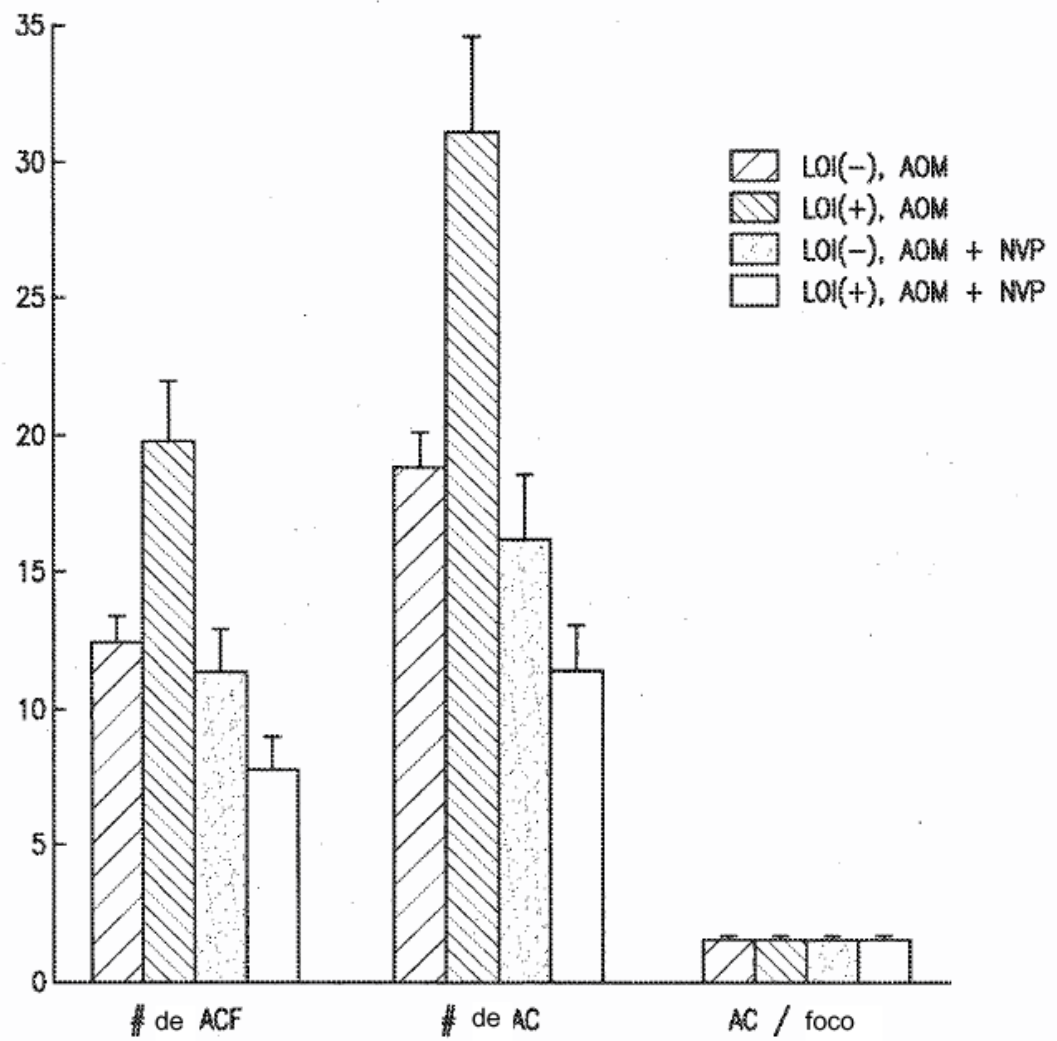


FIG. 7

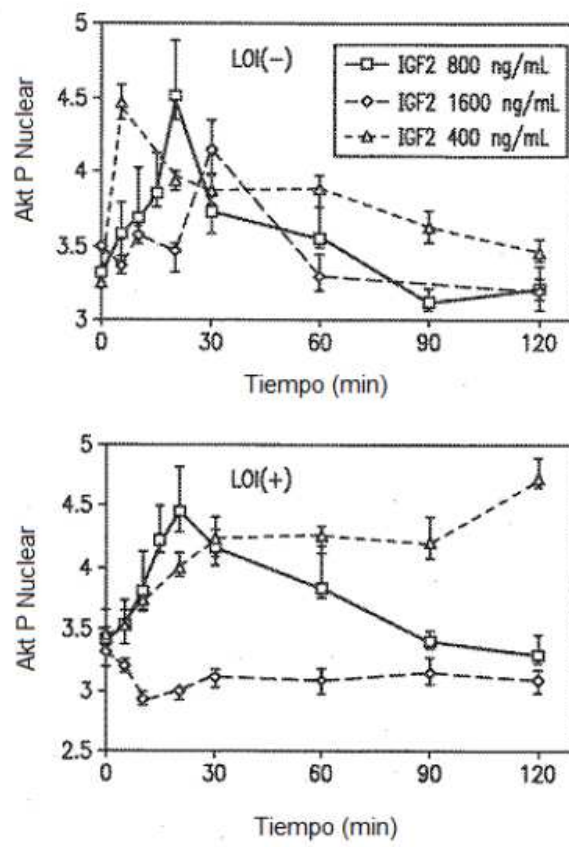


FIG. 8A

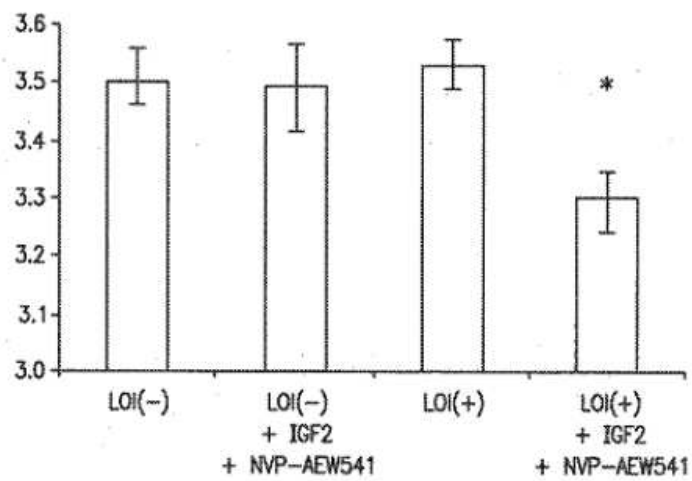


FIG. 8B

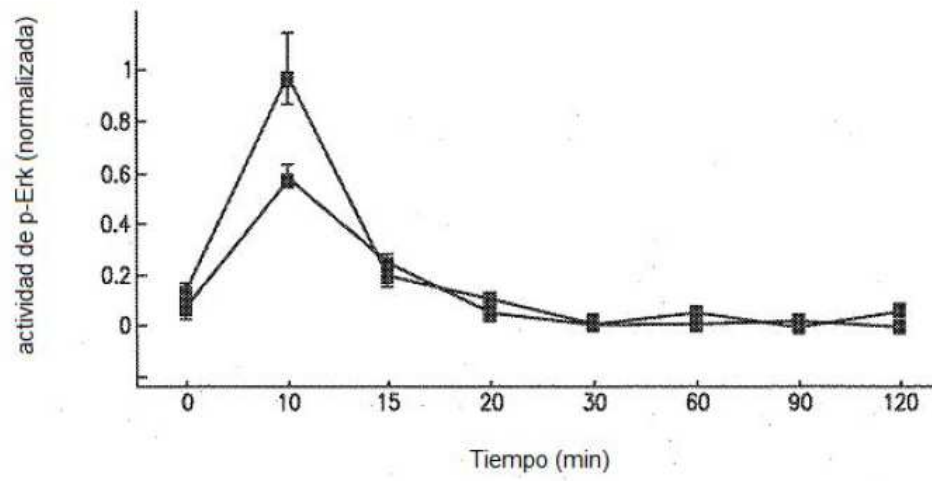


FIG. 8C

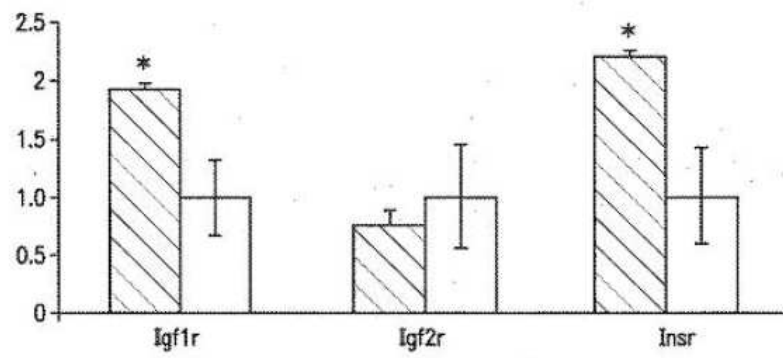


FIG. 8D

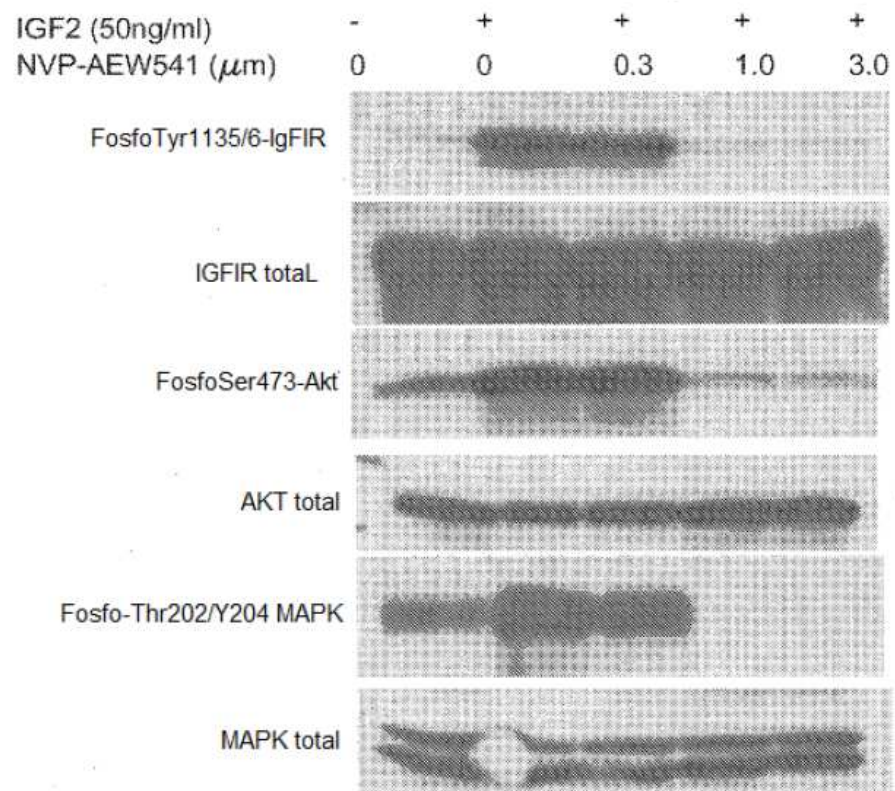


FIG. 9

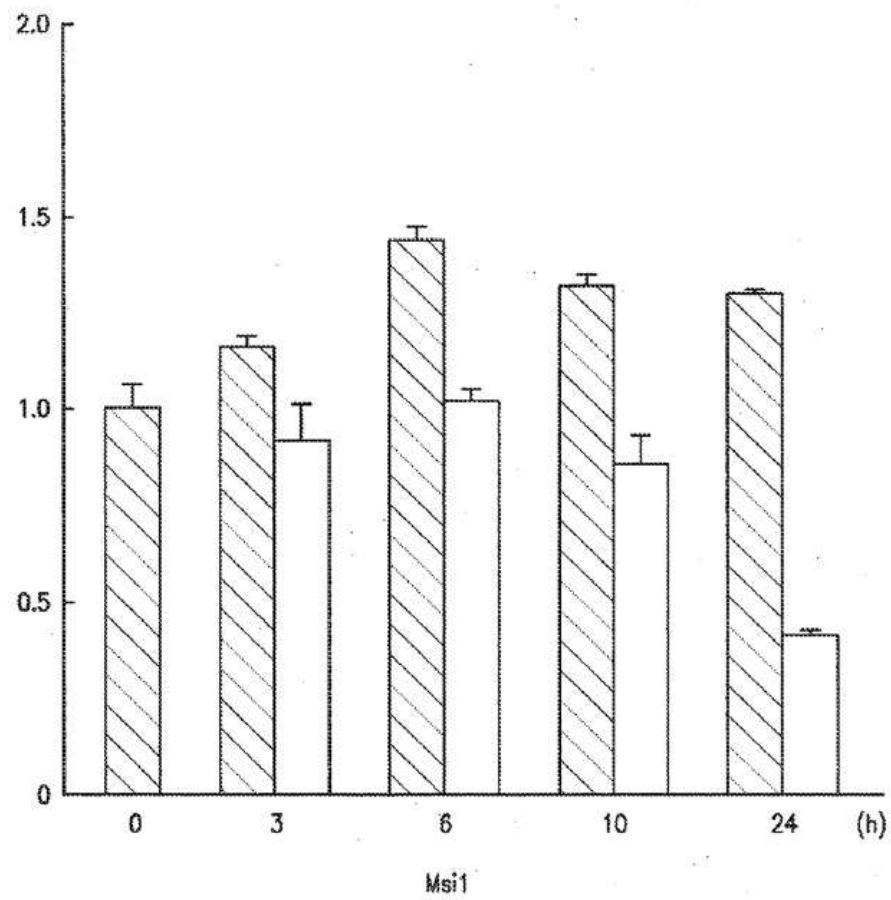


FIG. 10

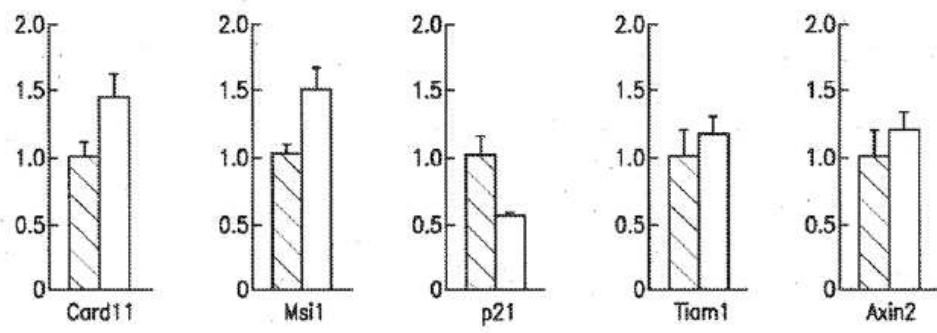


FIG. 11

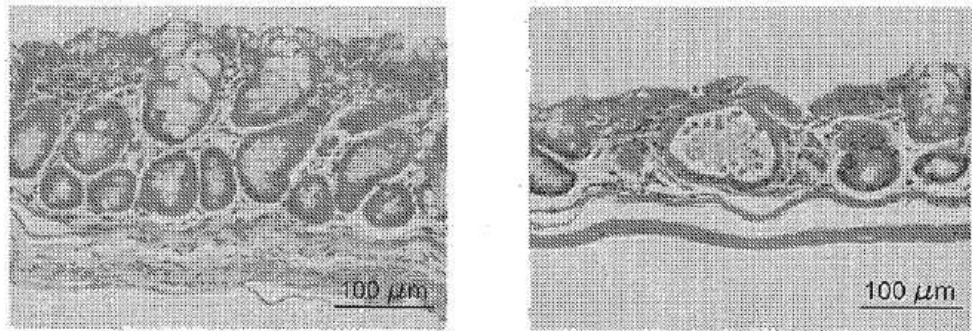


FIG. 12

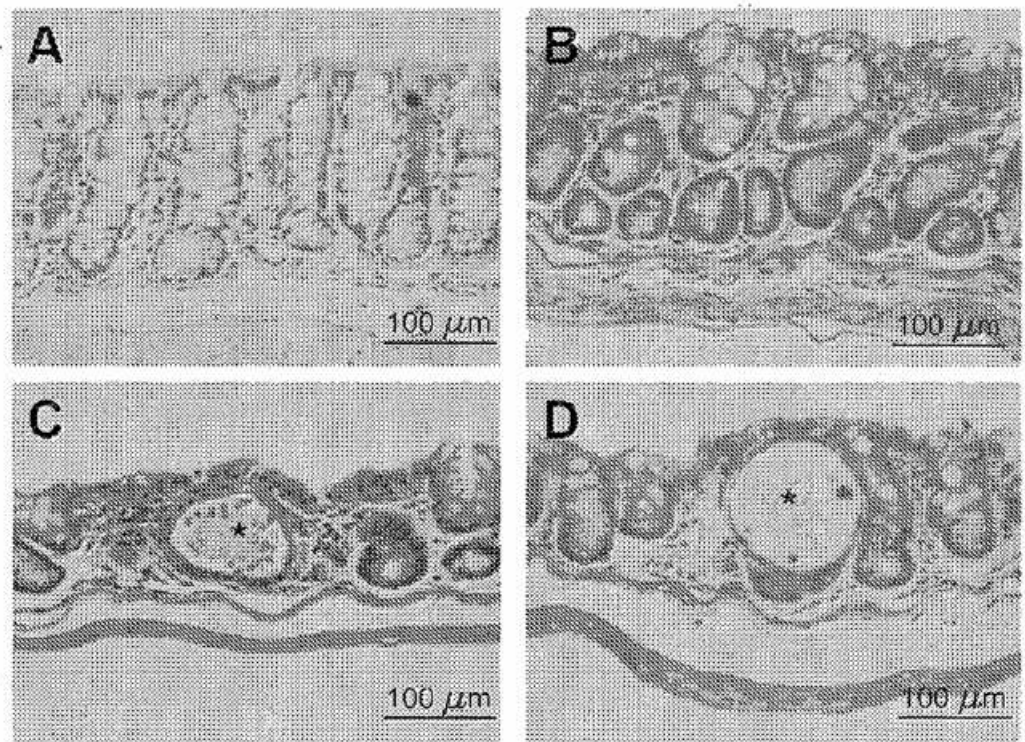


FIG. 13

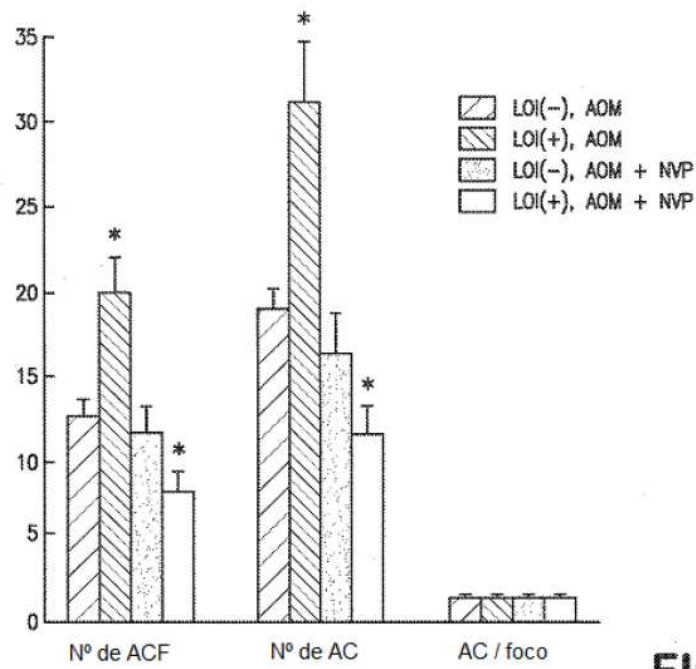


FIG. 14A

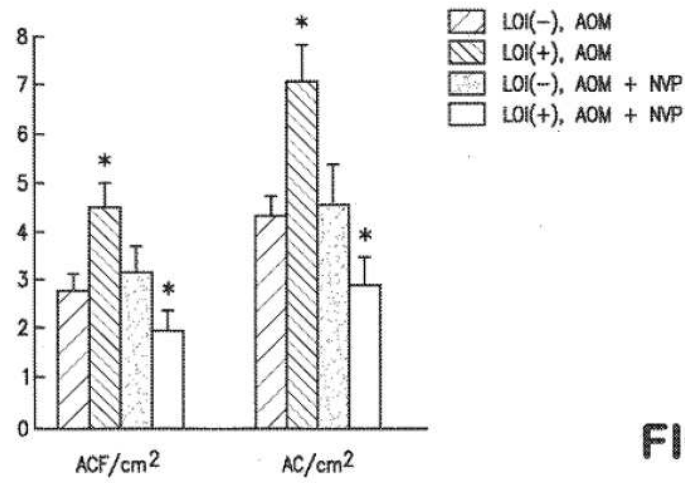


FIG. 14B