



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 852**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04797676 .6**

96 Fecha de presentación : **05.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1682665**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Utilización de fragmentos del factor de crecimiento de fibroblastos.**

30 Prioridad: **07.11.2003 US 518073 P**  
**18.05.2004 US 572247 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.10.2011**

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Bollekens, Jacques;**  
**Chibout, Salah-Dine;**  
**Vonderscher, Jacky;**  
**Legay, François;**  
**Cordier, André;**  
**Papoian, Ruben y**  
**Scherer, Andreas**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 365 852 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

Utilización de fragmentos del factor de crecimiento de fibroblastos

Campo de la invención

5 La invención se relaciona en general con el análisis *in vivo* de la eficacia de un compuesto o composición, y particularmente con el análisis y funcionalización biológica de moléculas clásicas pequeñas, productos naturales, genes, péptidos y proteínas por medio de actividad *in vivo*.

10 La invención se relaciona además con los usos médicos del factor 23 de crecimiento de fibroblastos (FGF-23), fragmentos del FGF-23, polipéptidos del terminal C del FGF-23, homólogos del FGF-23 y/o variantes del FGF-23, en particular para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis desregulada o trastornos de proliferación de células.

Antecedentes de la invención

15 Las compañías farmacéuticas están interesadas en evaluar y comprender la función y regulación de genes y productos génicos recientemente descubiertos (proteínas), especialmente genes y proteínas recientemente descubiertos, que podría ayudar en la comprensión de los mecanismos vinculados con enfermedades o con la acción de los compuestos. Además, los genes y los productos génicos pueden convertirse en fármacos o en biomarcadores potenciales. Grenet O, Pharmacogenomics J. 1(1): 11 - 2 (2001).

20 Sin embargo, una sola secuencia de genes no proporciona información acerca de la función real de la proteína en la fisiología de la célula o del organismo. Además, aunque el genoma tiene un número de genes relativamente bien definido, no se conoce un límite para el número posible de variantes de proteínas. El número potencial de proteínas codificadas por estos genes se estima que es de dos hasta al menos cien veces mayor que el número de genes, ya que se ha encontrado recientemente que se pueden producir proteínas también por medio de empalme a nivel de proteínas y no solamente a nivel del ARN.

25 El proceso actual de descubrimiento de fármacos procede desde un solo objetivo hasta un solo fármaco. El proceso actual es un proceso largo, frecuentemente con un desgaste tardío por falta de eficacia, un diseño equivocado o un indicio erróneo.

Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de un método más eficiente para el descubrimiento de identificación de candidatos a fármacos, objetivos génicos y biomarcadores.

Resumen de la invención

30 La invención suministra un proceso de descubrimiento para funcionalización biológica de péptidos, proteínas, genes, moléculas pequeñas y productos naturales utilizando perfiles de expresión génica de todo el organismo. El proceso de descubrimiento de la invención procede desde un solo principio o fármaco hasta objetivos e indicaciones múltiples (como se indica por medio de un impacto sobre cualquier objetivo en la cadena en cascada de una ruta), y productos farmacéuticos múltiples, suministrando así una guía rápida para un concepto correcto de prueba en humanos.

35 El proceso de descubrimiento de la invención se inicia con la administración de sustancias de prueba a animales, seguido por la selección de la expresión génica resultante en muchos órganos obtenidos del animal de prueba. La invención puede ser utilizada para funcionalizar biológicamente el genoma completo de cualquier organismo donde se encuentran disponibles chips de microarreglos. La invención no está restringida al tipo de compuesto que va a ser funcionalizado. Pequeñas moléculas, proteínas, productos naturales, ADNc (para funcionalizar cualquier gen de interés), etc., son todos susceptibles a la estrategia de la invención.

40

45 Ya que el proceso de descubrimiento de la invención se basa en una hipótesis no preconcebida y en análisis multiorgánico de todo el organismo, se pueden seleccionar polipéptidos para análisis en ausencia de cualquier criterio biológico de selección diferente de la secuencia del péptido. El patrón resultante de todo el organismo de los cambios de expresión génica en el transcriptoma proporciona un resumen de las actividades a nivel molecular y de todo el organismo. Por lo tanto, el enfoque imparcial de la invención con relación a la administración de un compuesto puede proporcionar información acerca de las relaciones fisiológicas a través de todo el organismo que son provocadas por la administración de compuesto.

El proceso de descubrimiento de la invención integra entonces el perfil *in vivo* con bases de datos genómicas internas y externas para dilucidar la función de proteínas desconocidas, típicamente en pocos meses. El enfoque

imparcial de la invención en lo que respecta a la administración de un compuesto proporciona convenientemente firmas genómicas de múltiples órganos. Los datos resultantes pueden ser analizados ya sea por medio del uso de herramientas conocidas por aquellos capacitados en el arte o por medio del uso de moles que comparan las firmas del compuesto producidas por la administración del compuesto entre los diferentes órganos. Este análisis multiorgánico se diferencia de los enfoques estándar, que, ya que no utilizan un enfoque imparcial de la administración del compuesto, no dan como resultado una identificación multiorgánica de la función del compuesto. En vez de eso, el enfoque estándar permite el análisis caso por caso, lo que puede hacer difícil las comparaciones experimentales cruzadas. En contraste con los enfoques estándar, la identificación de la función del compuesto utilizando el método de la invención permite la identificación de la función del compuesto en muchas rutas reguladoras y metabólicas. Además, la identificación de la función del compuesto utilizando el método de la invención resulta conveniente en la comprensión de la estabilidad del compuesto activo en el organismo, una propiedad del compuesto administrado que no sería previsible de otra manera a priori utilizando enfoques estándar.

La identificación de la función del compuesto utilizando el método de la invención puede ser en múltiples etapas, ya que una etapa o parte de la identificación conduce a otra etapa o parte de la identificación, para proporcionar una comprensión completa de la actividad del compuesto administrado *in vivo*. Por ejemplo, la identificación de la función del compuesto en un órgano (tal como el bazo) puede conducir a una comprensión de la función del compuesto en otros órganos. Por el contrario, los enfoques estándar, que se basan en el acceso inmediato a los ensayos en un número limitado de órganos, dependen de la evidencia anecdótica a partir de otros experimentos para etapas adicionales en la identificación de la función del compuesto.

La invención es adecuada para diferentes etapas del descubrimiento de fármacos, identificando tanto objetivos como biomarcadores de los fármacos. El proceso de descubrimiento de la invención suministra convenientemente un mayor número de candidatos validados para fármacos y de objetivos y biomarcadores identificados para fármacos junto con ahorro de tiempo, de recursos y de animales. El proceso de descubrimiento de la invención integra convenientemente en un proceso herramientas estándar de exploración con nuevos enfoques genómicos. El proceso de descubrimiento de la invención puede ser utilizado también para perfilar nuevamente compuestos seguros detenidos después de las etapas iniciales de aprobación del fármaco (por ejemplo, la Fase I) para una nueva indicación. La invención puede ser utilizada para ajustar la mejor opción para terapias de combinación, por medio de una adecuación óptima de las firmas de expresión génica entre los compuestos, cancelando los efectos secundarios y la potenciación de la eficacia. El proceso de descubrimiento de la invención puede ser utilizado para perfilar la cartera más avanzada de desarrollo para guiar las etapas posteriores del proceso de aprobación del fármaco (por ejemplo, la Fase II y la Fase III).

En diferentes modalidades, el proceso puede ser utilizado para analizar tejidos o fluidos corporales (tales como enfermedad coronaria, cáncer de seno y otras indicaciones; cada uno comparado con controles sanos). Las proteínas del plasma que se expresan en forma diferencial entre individuos normales y pacientes con arterias coronarias enfermas, con una función conocida o desconocida, se analizan para una identificación/validación potencial del objetivo, e identificación del biomarcador.

En una modalidad, el proceso de descubrimiento de la invención se inicia con una selección *in vivo* de proteínas, péptidos y compuestos de referencia en ratones. Con base en los resultados de la selección de los ratones, se lleva a cabo entonces una verificación *in vivo* de proteínas, péptidos o compuestos de referencia seleccionados en primates no humanos o en modelos animales de una patología o enfermedad humana. La comparación de la información resultante con un perfil de fármacos de referencia, con la actividad farmacológica bien caracterizada, facilita la interpretación biológica de los perfiles de compuestos desconocidos. En una modalidad particular, la tasa de selección para las proteínas, péptidos o compuestos de referencia es ~ del 20%.

En una modalidad, el proceso de descubrimiento de la invención combina en un proceso: (a) preselección en ratones; (b) verificación de las proteínas/péptidos/compuestos de referencia seleccionados en monos; (c) gran parte de los tejidos analizados (hasta 25 en ratones, hasta 120 en monos); (d) homogeneidad de la muestra de tejido (e) ARNm de alta calidad; (f) un enfoque de todo el genoma con chips de hibridación; (g) poderosas herramientas de bioinformación para agrupación y estadística; (h) la posibilidad de meta análisis de ensayos cruzados; y (i) localización a nivel celular de los genes o las rutas afectadas por medio de hibridación *in situ*.

Por medio del uso del proceso de descubrimiento de la invención, se ha encontrado sorprendentemente ahora que los polipéptidos relacionados con FGF-23 afectan genes clave que controlan la diferenciación y proliferación celular, así como la angiogénesis.

Los factores de crecimiento de fibroblastos (los FGF) forman una gran familia de factores de crecimiento de polipéptidos que se encuentran en organismos que van desde nematodos hasta humanos. Durante el desarrollo embrionario, los FGF tienen diversas funciones en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación celular. En el organismo adulto, los FGF son factores homeostáticos y actúan en la reparación de tejidos y en respuesta a las lesiones. La expresión inapropiada de algunos FGF puede contribuir a la patogénesis de cáncer.

5 El FGF-23 de ratón ha sido identificado por medio de búsqueda de homologías en la Base de Datos de Secuencias de Nucleótidos del GenBank con secuencias de aminoácidos del FGF-15 de ratón. El IGF-23 de ratón y FGF-23 humano son muy idénticos (~72% de identidad de aminoácidos). Tanto los ADNc del FGF-23 humano como de ratón codifican una proteína de 251 aminoácidos, que tiene un terminal amino hidrófobo (~24 aminoácidos) típico para las proteínas secretadas, y un terminal C único que no tiene homología con otros miembros de la familia del FGF. En el ratón, el ARNm para el FGF-23 se expresa en el cerebro, preferencialmente en el núcleo talámico ventrolateral, y en el timo en niveles bajos.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de FGF-23 o la expresión del FGF-23 mutado están asociadas con diferentes hallazgos patológicos:

10 El FGF-23 recombinante induce hipofosfatemia *in vivo* como resultado de pérdida de fosfato en la orina (Shimada T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 6500 - 6505 (2001)).

La sobreexpresión del FGF-23 ha sido observada en tumores que son responsables por la osteomalacia oncogénica (OOM) (White K. E., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 497 - 500 (2001)).

15 Se ha demostrado que el raquitismo hipofosfatémico dominante autosómico (ADHR) está asociado con mutaciones del FGF-23 dentro del sitio de escisión 176-RXXXXR-179, previniendo la degradación del FGF-23 (The ADHR Consortium, Nat. Genet. 26: 345 - 348 (2000)).

20 Si bien se ha demostrado que OOM y ADHR están asociados con el FGF-23, se ha demostrado que un trastorno adicional, hipofosfatemia asociada con X (XLH), que es fenotípicamente similar a OOM y ADHR, es el resultado de mutaciones en el gen PHEX. PHEX codifica una endopeptidasa unida a la membrana (The HYP Consortium, Nat. Genet. 11: 130 - 136 (1995)) y se plantea la hipótesis de que FGF-23 es un sustrato de PHEX, mientras que el mutante de ADHR por el FGF-23 ADHR (FGF-23(R179Q)) no es degradable por PHEX.

25 Cada uno de los síndromes anteriormente descritos se caracteriza por hipofosfatemia, menor reabsorción renal de fosfato, concentraciones normales o bajas de calcitriol en suero, concentraciones normales en suero de calcio y de hormona paratiroidea, y mineralización esquelética defectuosa (Quarles L. D. and Drezner M. K., J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 494 - 496 (2001)).

30 Debido a que tanto la sobreproducción como las mutaciones de sentido erróneo o aletargado del FGF-23 provocan hipofosfatemia con pérdida de fosfato en la orina, se concluye que el FGF-23 es al menos uno de los factores causantes de OOM y es un regulador importante regulador de fosfato y del metabolismo óseo (Shimada T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6500 - 6505(2001)). Sin embargo, los objetivos moleculares del FGF-23 o de los productos de escisión proteolítica del FGF-23 son hasta ahora desconocidos, al igual que el mecanismo de cómo el FGF-23 o las proteínas o péptidos derivados del FGF-23 provocan anomalías renales y esqueléticas (Quarles L. D., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285: E1 - 9 (2003)).

35 La presente invención se relaciona por lo tanto con el uso de un polipéptido para la fabricación de un medicamento para ser utilizado en el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada, en donde el polipéptido se selecciona de los grupos que consisten de (a) el factor 23 de crecimiento de fibroblastos (FGF-23) (SEQ. ID No: 1) o un fragmento del FGF-23; (b) un polipéptido bioactivo que tiene un porcentaje de identidad de al menos 50% con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos de (a); o (c) una variante bioactiva de cualquiera de los polipéptidos de (a) o (b).

40 En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el uso de un polipéptido como se definió anteriormente para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un trastorno celular proliferativo.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada o de un trastorno celular proliferativo que comprende la administración de una cantidad efectiva de un polipéptido como se definió anteriormente a un mamífero incluido un humano que sufra de la enfermedad o el trastorno.

45 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para uso en una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada o un trastorno celular proliferativo que contiene un polipéptido como se definió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

50 La FIG. 1 es un conjunto de secuencias de polipéptidos y de correlaciones de secuencias putativas de polipéptidos para GPA018, GPA019, GPA020, GPA022 y GPA023.

La FIG. 2 es un diagrama de cajas de los resultados de proliferación (Unidades) relacionados con cambios vasculares sobre montajes planos retinales de animales tratados con el polipéptido del terminal C del FGF-23 (FGF23CTP; (ojo derecho; columna 1) y PBS (ojo izquierdo; columna 2);

Descripción detallada de la invención

5 Introducción y resumen. El proceso clásico del descubrimiento en la industria farmacéutica se basa en objetivos (enzimas, receptores, ensayos celulares, modelos animales y de enfermedades, etc.). Los productos químicos o biológicos se prueban, en una modalidad de alto rendimiento, sobre una batería de diferentes objetivos preseleccionados. Las desventajas del enfoque clásico son los modelos objetivo *in vitro* "artificialmente desconectados" comparado con la relación interdependiente y estrechamente interconectada de los diferentes  
10 objetivos en todo el organismo y el hecho de que la actividad biológica sobre todos los objetivos no seleccionados se pierde.

Por el contrario, la invención es un proceso de descubrimiento de una "hipótesis no preconcebida" para identificar rápidamente y analizar la actividad biológica de nuevos productos en todo el organismo, en múltiples órganos y en todo el transcriptoma. Todas las interacciones fisiológicas entre los diferentes órganos o tejidos están presentes y cualquier ruta celular o cualquiera de los objetivos potenciales podrían ser potencialmente analizados en un sistema  
15 no artificial.

El proceso de descubrimiento de fármacos de la invención incrementa convenientemente las posibilidades en el campo de la proteómica y la funcionalización. La proteómica involucra la separación sistemática, identificación y caracterización de las proteínas presentes en una muestra de tejido, o en un fluido biológico, en un momento dado.  
20 Todos los procesos biológicos, incluidas las enfermedades y las respuestas a los fármacos, inducen cambios en las proteínas, y el perfil global de la proteína (el "proteoma") varía durante el desarrollo de un organismo, la maduración de los tipos de células o tejidos, y el progreso o tratamiento de una enfermedad. Cada tipo de célula puede expresar diferentes patrones de proteínas en diferentes momentos. Cada proteína a su vez puede ser modificada químicamente en una cantidad de formas igualmente diversas para servir diferentes funciones celulares. Ya que las  
25 proteínas derivadas del mismo gen pueden ser prácticamente idénticas, y pueden diferir únicamente en pequeños detalles pero funcionalmente relevantes, las herramientas para la identificación de proteínas no solamente identifican un gran número de proteínas sino que también diferencian entre familias cercanas.

El enfoque de la proteómica clásica combina electroforesis bidimensional en gel de alta resolución (2-DGE) con un software para formación de imágenes que selecciona cualitativa y cuantitativamente proteínas que se diferencian en  
30 abundancia, el peso molecular (Mr) o el cambio entre los geles. Estas diferencias en las proteínas pueden ser luego identificadas con gran velocidad y sensibilidad por medio del uso de una combinación de enfoques de espectrometría de masas "del estado del arte" (MS) y robótica, junto con herramientas bioinformáticas sensibles de búsqueda.

Los transcritos de ARN representan la forma intermedia entre el ADN y las proteínas que están entre las moléculas más activas involucradas en las funciones celulares. El contenido total de ARN es llamado el "transcriptoma". La tecnología de chips de ADN de alta densidad permite el acceso potencial a los análisis de todos los transcritos producidos por una población de células o del tejido en cualquier momento determinado. El análisis de expresión de  
35 ARN a escala del genoma puede proporcionar por lo tanto nuevos puntos de vista en los eventos celulares inducidos por la administración a un animal con péptidos u otros compuestos químicos. Esto proporciona una visión amplia de las rutas metabólicas, de señalización, reguladoras u otras rutas bioquímicas en el animal que está siendo  
40 analizado. El análisis de las perturbaciones inducidas en la transcripción celular proporciona una descripción molecular detallada de la actividad del compuesto administrado.

Un análisis de un transcriptoma se ha convertido en una realidad accesible con la implementación de un sistema de cuantificación de alto rendimiento del ARN. Los microarreglos de alta densidad permiten recolectar miles de puntos  
45 de información de una vez, alcanzando el orden de magnitud del número probable de genes expresados y produciendo una visión amplia y detallada de los eventos celulares.

Como los cambios de las diferentes funciones dentro de una célula están estrechamente interconectados, los cambios en los diferentes órganos dentro de un organismo están relacionados. La aplicación del perfilado genético sometido al mismo tratamiento proporciona una visión completa de los efectos y modificaciones del estado fisiológico. La identificación de cambios comunes en órganos con transcriptomas originalmente muy diferentes  
50 facilita la eliminación del ruido experimental. La presencia o la ausencia de señales idénticas pueden indicar si el tratamiento tiene un efecto pleiotrópico o afecta un órgano objetivo. Si un compuesto se dirige a un órgano principal, los otros órganos reflejarán las modificaciones funcionales del primer órgano impactado. Este tipo de información puede ser recolectada en correlación con el efecto farmacológico o con los efectos tóxicos potenciales. El patrón de  
55 cambios de expresión de todo el organismo puede proporcionar también información útil sobre la farmacodinámica del compuesto, delineando en forma precisa el rango de órganos afectados.

La acumulación de información en diferentes órganos no solamente ayuda a dilucidar el modo preciso de acción sino que también proporciona una reconstrucción completa de las modificaciones inducidas por el compuesto a nivel del organismo.

5 Administración de compuestos. La administración de la proteína o de otro compuesto farmacéutico desencadena múltiples cascadas de eventos de señalización intracelular, que involucran redes complejas (rutas) y que se basan en modificaciones de la proteína tales como fosforilación, glicosilación, etc. Estos eventos eventualmente conducen a modificaciones de los niveles de expresión génica. La administración de un compuesto activo conduce por lo tanto a cambios múltiples e independientes en la composición del transcriptoma.

10 En una modalidad, el animal de prueba es un vertebrado. En una modalidad particular, el vertebrado es un mamífero. En una modalidad más particular, el mamífero es un primate, tal como un mono cinomólogo o un humano. Como se la utiliza aquí, la administración de un agente o de un fármaco a un individuo o a un paciente incluye la administración por parte de ellos mismos y la administración por un tercero. En modalidades más particulares, se pueden administrar sustancias naturales o sintéticas de fuentes biológicas o no biológicas, por ejemplo aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, los ADNc, compuestos químicos, a animales, por ejemplo ratones (*Mus musculus*),  
 15 ratas (*Rattus norvegicus*), monos (*Macaca fascicularis*), por medio de métodos conocidos en el arte, por ejemplo por medio de inyecciones, inhalación, o administración oral. La administración de esas sustancias se puede ajustar en términos de tiempo de exposición y de dosis, y de combinaciones de los mismos. El "grupo de tratamiento" de animales debe recibir una sustancia o una combinación de sustancias en un compuesto que sirve vehículo adecuado para la administración de la sustancia o la combinación de sustancias, mientras que el grupo de "control" (o de "línea base") debe recibir únicamente el compuesto que sirve como vehículo. Durante el período de tratamiento se pueden tomar muestras de especímenes biológicos tales como trozos de tejido (por ejemplo obtenidos por medio de una biopsia), o fluidos corporales, tales como sangre, orina, o saliva. Al final del período de tratamiento se puede sacrificar todos los animales de todos los grupos y se pueden tomar muestras de especímenes biológicos tales como órganos completos o trozos de los mismos. Todo espécimen muestreado puede ser almacenado como se  
 20 conoce en el arte para análisis adicionales que incluyen, pero no se limitan a, RT-PCR, transferencias tipo Northern, hibridación *in situ*, perfilado de expresión génica con microarreglos.

Como se la utiliza aquí, "administración directa" es la administración por medio de inyección, sonda nasogástrica, alimentación u otro tipo de administración de un compuesto, tal como una proteína, a animales. Después de algún tiempo, es decir horas, días o semanas, se recolectan órganos y tejidos de los animales y se determinan los perfiles  
 30 de expresión génica. Éste procedimiento es comúnmente utilizado en farmacotoxigenómicos, farmacogenómicos y similares.

En una modalidad, la invención comienza con proteínas diferencialmente expresadas en plasma entre individuos normales y pacientes con arterias coronarias internas con relación a la identificación y validación de objetivos potenciales y la identificación de biomarcadores.

35 El proceso de descubrimiento de fármacos de la invención es particularmente sensible al análisis de las proteínas más pequeñas de un proteoma (en el rango de 0,5 a 20 kDa) que escapan de los métodos clásicos de detección. Las proteínas de peso molecular pequeño pueden ser fácilmente sintetizadas por medio de métodos comerciales (por ejemplo, el método Microprot™, GeneProt, Ginebra, Suiza). Las proteínas químicamente sintetizadas pueden ser rápidamente producidas y no contienen contaminantes biológicos.

40 Para ratones, se utiliza una cantidad mínima del compuesto que va a ser funcionalizado (únicamente aproximadamente 5 mg).

Como se la utiliza aquí, "administración indirecta" es la inyección de un gen que codifica para esa proteína (como un plásmido de ADNc) y luego hacer el perfil de expresión génica. En una modalidad, la tecnología es el uso de ADN 'desnudo' (un plásmido de expresión de ADNc) inyectado en ratones (u otros animales). Esta técnica es  
 45 ampliamente publicada ya sea para propósitos de inmunización con ADN (Kim J-M et al., Gene Ther. 10(15): 1216 - 24 (Agosto de 2003)) o de suministro de genes para propósitos terapéuticos (Aliño SF et al., Gene Ther. 10(19): 1672 - 9 (Septiembre de 2003)). Entre una cantidad de técnicas para transferencia de genes *in vivo*, una inyección intravenosa o la inyección directa de ADN de plásmido en el músculo son simples, económicos, y seguros. Kim J-M et al., Gene Ther. 10(15): 1216 - 24 (Agosto de 2003). La eficacia importante de ADN genómico no viral abre un  
 50 nueva vía en las aplicaciones seguras de terapia génica en humanos. Aliño SF et al., Gene Ther. 10(19): 1672 - 9 (Septiembre de 2003).

La administración de ADN desnudo puede hacerse por medio de métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte; ver, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.165.754; 6.309.370; 6.566.342; 6.620.617 y 6.651.655, y las referencias citadas allí.

5 Perfiles de expresión génica. Después de un período de tiempo (por ejemplo, dos semanas) de administración de proteína, se practica la autopsia a los animales tratados. Se hace la disección de los tejidos (por ejemplo, 25 tejidos para ratones/120 tejidos para monos) y congelada rápidamente para análisis genómicos. Se pueden aislar muestras de órganos (por ejemplo, cincuenta muestras de órganos para monos) para exámenes histopatológicos y para localizaciones de expresión génica, por ejemplo por medio de hibridación *in situ*. Estudios iniciales han mostrado que para ratones, 3 - 10 tejidos de veinticinco tejidos muestreados son generalmente suficientes para caracterizar un compuesto por medio de expresión génica e hibridación; para monos, veinte tejidos de 120 tejidos muestreados son generalmente suficientes.

10 En modalidades más particulares, los métodos para detectar el nivel de expresión de ARNm son bien conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, PCR por transcripción reversa, PCR cuantitativa en tiempo real, transferencias tipo Northern y otros métodos de hibridación. Un método particularmente útil para detectar el nivel de transcritos de ARNm obtenidos a partir de una pluralidad de genes involucra hibridación de ARNm etiquetado con un arreglo ordenado de oligonucleótidos. El método permite determinar el nivel de transcripción de una pluralidad de estos genes en forma simultánea para generar perfiles o patrones de expresión génica.

15 Como se lo utiliza aquí, un perfil de expresión génica es diagnóstico cuando el aumento o la disminución de la expresión génica es un incremento o una disminución (por ejemplo, al menos una diferencia de 1,2 veces) sobre la expresión génica de línea base después de la administración de un compuesto. Como se lo utiliza aquí, un patrón de expresión génica es "mayor a la normal" cuando una expresión génica (por ejemplo, en una muestra de un individuo tratado) muestra una diferencia de 1,2 veces (es decir, más alta) en el nivel de expresión comparada con las muestras de línea base. Un patrón de expresión génica es "inferior a la normal" cuando la expresión génica (por ejemplo, en una muestra de un individuo tratado) muestra una diferencia de 1,2 veces (es decir, más baja) en el nivel de expresión comparada con las muestras de línea base. En otras modalidades, un cambio de 1,5 veces puede ser utilizado como criterio.

25 Las técnicas para la detección de expresión génica de los genes descritos por esta invención incluyen, pero no se limitan a transferencias tipo Northern, RT-PCT, PCR en tiempo real, extensión del iniciador, protección por ARNasa, perfilar la expresión del ARN y técnicas relacionadas. Las técnicas para la detección de expresión génica por medio de la detección de los productos proteicos codificados por los genes descritos por esta invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que reconocen los productos proteicos, transferencias tipo Western, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, los ELISA y técnicas relacionadas. Estas técnicas son bien conocidas por aquellos capacitados en el arte. Sambrook J et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 2000). En una modalidad, la técnica para detección de la expresión génica incluye el uso de un chip génico. La construcción y el uso de chips génicos son bien conocidos en el arte. Ver, las Patentes D de los Estados Unidos Nos. 5.202.232; 5.445.934; 5.525.464; 5.695.940; 5.744.305; 5.795.716 y 5.800.992. Ver también, Johnston, M. *Curr Biol* 8:K171 - 174 (1998), Iyer VR et al., *Science* 283: 83 - 8T (1999) y Elías P, "New human genome 'chip' is a revolution in the offing" *Los Angeles Daily News* (Octubre 3, 2003):

40 Los perfiles de expresión génica pueden ser generados utilizando por ejemplo la tecnología de microarreglos Affymetrix. En resumen, se extrae ARN total o, preferiblemente, poliA<sup>+</sup>-ARN de una muestra biológica utilizando procedimientos estándar conocidos en el arte, por ejemplo el kit RNeasy® (Qiagen, MD, EUA). En una etapa posterior, se prepara ADNc bicatenario en un proceso llamado "transcripción reversa (RT)" que es conocido en el arte, utilizando por ejemplo el "SuperScript Double-Stranded ADNc Synthesis Kit" (Invitrogen, CA, EUA). En una etapa posterior, llamada "transcripción *in vitro*", se marca el ADNc bicatenario obtenido en una etapa previa con un fluorocromo por medio de métodos conocidos en el arte, utilizando por ejemplo el Kit de Marcación ENZO (ENZO, NY, EUA). Se hibrida ARN marcado con microarreglos de oligonucleótidos. Éstos son conocidos en el arte y consisten de una superficie con la cual puede hibridarse específicamente sondas que corresponden en secuencia con productos génicos (por ejemplo ARNm, polipéptidos, fragmentos de los mismos, etc.) o enlazarse a una posición conocida. El procesamiento de los microarreglos, incluyendo por ejemplo lavado, coloración, escaneo, se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos de intensidad de la hibridación detectados por el escáner son adquiridos automáticamente y procesados por los componentes del software analítico, por ejemplo el software GENECHIP® (Affymetrix, CA, EUA). Los datos en bruto se normalizan a los niveles de expresión utilizando una intensidad objetivo de 200.

45 Dos elementos de valor en el perfilado de la expresión son la calidad y homogeneidad de las muestras de tejido y la calidad del ARNm. Para este propósito, la ubicación de los tejidos que van a ser muestreados y cada muestra pueden ser cuidadosamente diseccionadas a partir de los otros tejidos que los rodean utilizando un microscopio binocular.

55 Las muestras son luego transferidas a un laboratorio de biología molecular para extracción del ARN. El protocolo para extracción del ARN puede ser parcialmente automatizado incrementando así la reproducibilidad y velocidad de esta etapa. El ARN extraído puede ser almacenado durante largos períodos de tiempo en estado congelado y mantenidos como un archivo.

Se transcribe en forma reversa una alícuota del ARN extraído para obtener un ADNc. En una segunda etapa, se transcribe ADNc en presencia de una etiqueta fluorescente para obtener ARNc. La composición del ARNc obtenido es idéntica a la composición original del ARN en las muestras, pero cada molécula transporta ahora un marcador fluorescente. La mezcla marcada de ARNc se usa para el proceso de hibridación, por ejemplo utilizando ensayos de GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, California, EUA). Los datos en bruto (obtenidos después de un escaneo con láser del chip) se procesan por medio de un algoritmo específico que condensa para cada gen toda la información disponible en un valor único. Este valor llamado diferencia promedio representa el nivel de expresión del gen.

La información puede ser refinada adicionalmente por medio del uso de técnicas complementarias. La hibridación *in situ*, por ejemplo, puede indicar precisamente que tipo de célula dentro de un órgano expresa específicamente un gen dado. Esta técnica basada en la detección de ARN es independiente de la disponibilidad de un anticuerpo. También se puede utilizar PCR cuantitativa para confirmar los niveles de expresión de genes particulares de interés.

Análisis. El procesamiento matemático y estadístico de los datos (agrupamiento) ayuda a reducir la complejidad y el tamaño de los grupos de datos. Se pueden utilizar diferentes tipos de agrupamiento para separar los diferentes genes de acuerdo con su similitud de comportamiento a través de las diferentes condiciones y para establecer relaciones entre los genes que pueden estar relacionados con el mismo fenómeno biológico. El procesamiento de datos también incluye análisis estadísticos para separar variaciones significativas del ruido experimental. Sin embargo, la rigurosidad de las diferentes etapas de filtración debe ser modulada para integrar la naturaleza biológica de los datos.

El listado de diferentes genes afectados es luego comparado con la información recolectada en la literatura científica. La síntesis del conocimiento disponible relacionado con los diferentes genes, apunta a una o a diferentes rutas de señalización, metabólicas o a otras rutas bioquímicas o a modificaciones conocidas. Una vez se ha reconstruido una imagen coherente, se pueden asociar los perfiles con indicaciones potenciales. La discriminación entre las diferentes hipótesis sigue un proceso estrechamente relacionado con diagnósticos diferenciales.

Durante el análisis, se establece una comparación constante entre los datos de la expresión y el conocimiento actual sobre señalización celular y regulación. Tal puente permanente proporciona una ruta eficiente para refinar los modelos existentes, particularmente en el campo de la señalización intra e intercelular. La interdependencia de los cambios de la expresión génica es evaluada en diferentes órganos y bajo diferentes estímulos. Nuevos jugadores en las rutas pueden ser identificados y se puede refinar el vínculo entre los jugadores ya descritos. Incluso si únicamente parte o la regulación celular depende de los cambios de expresión del ARN, la acumulación de los datos de la expresión puede ayudar a construir un modelo nuevo y más preciso de las funciones celulares. La información recolectada podría ayudar a identificar los elementos críticos de las rutas que son utilizadas como objetivo o biomarcador.

Algunos de los perfiles de expresión pueden ser fácilmente confrontados con la información existente recolectada a partir del conocimiento científico general. La relación de esta información con una indicación potencial o un posible efecto secundario es entonces sencilla. Algunas combinaciones de cambios de expresión son más difíciles para traducir en información farmacológica. En tales casos, la confrontación del perfil de expresión del ARN de un compuesto desconocido con el perfil de un fármaco de referencia o enfermedad puede facilitar la interpretación. Entonces puede no ser necesario reconstruir las modificaciones celulares completas para encontrar una indicación potencial. Los fármacos de referencia y los perfiles de la enfermedad también ayudarán a construir la masa crítica de la información en la base de datos.

En modalidades de análisis estadísticos más particulares, los grupos de datos de los microarreglos pueden ser analizados por medio del uso de los componentes analíticos del software, tales como GeneSpring® (Silicon Genetics, CA, EUA). Los grupos de datos de los microarreglos consisten en parte de identificadores de grupos de sondas que se refieren a una secuencia de oligonucleótidos que está unida al portaobjetos de vidrio y al cual se une un ADNc marcado (ver más arriba) con una secuencia complementaria si está presente en la muestra de tejido o fluido corporal. La intensidad escaneada de la señal que es detectada y convertida en valores numéricos por un software, por ejemplo MAS5 (Affymetrix, CA, EUA), es una medida indirecta de la cantidad, o nivel de expresión del ADNc presente en las muestras biológicas bajo investigación. La entidad de los niveles de expresión génicos como los indicados por medio de los valores de intensidad de la señal para todos los grupos de sondas en un grupo de datos del microarreglo de una muestra biológica puede denominarse como el perfil de expresión de esa muestra. En cada grupo de datos del microarreglo, se pueden crear los valores de intensidad de la señal, las anotaciones génicas o del ADNc, así como los parámetros de calidad que pueden ser creados por medio del software, por ejemplo MAS5 (Affymetrix, CA, EUA), son el resultado de la información resultante asociada con la ID del grupo de la sonda.

En el sistema del microarreglo del ADNc, las expresiones de los genes de las células experimentales de interés se miden con relación a las expresiones de los mismos genes en una referencia fija o tipo de célula de control. Para identificar efectos estadísticamente relevantes de una sustancia sobre el perfil de expresión que muestras de tejido o



de fluido corporal bajo investigación, se pueden filtrar grupos de sondas con base en los valores asociados dados por el software utilizado para crear los valores, por ejemplo MAS5 (Affymetrix, CA, EUA). Los filtros pueden basarse en los parámetros de calidad, nivel de expresión, cambios de los niveles de expresión en las muestras del espécimen tratado versus el espécimen de control, así como de significancia. El listado resultante de grupos de sondas se refiere a genes tales que experimentan un cambio significativo en su nivel de expresión como resultado directo o indirecto del tratamiento de las muestras biológicas de las cuales se derivan.

La interpretación de tales listas de genes con relación a los efectos de una sustancia sobre sistemas biológicos y rutas está sometida al conocimiento y experiencia de los investigadores. La aplicación de componentes analíticos del software tales como GeneSifter © (VizX Labs, Seattle, WA, EUA) ayuda en la interpretación de tales listados de genes.

Además, hemos desarrollado un software para un análisis de múltiples órganos a partir de los datos generados por el método de la invención, que compara las firmas del compuesto producidas por la administración del compuesto entre los diferentes órganos.

Nuevos usos identificados por medio del proceso de descubrimiento de fármacos de la invención. La presente invención también prevé la utilización de un polipéptido para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada, en donde el polipéptido se selecciona de los grupos que consisten de (a) el factor 23 de crecimiento de fibroblastos (FGF-23) (SEQ. ID No: 1) o un fragmento del FGF-23; (b) un polipéptido bioactivo que tiene un porcentaje de identidad de al menos 50% con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptido de (a); o (c) una variante bioactiva de cualquiera de los polipéptido de (a) o (b).

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también prevé el uso de un polipéptido como el definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un trastorno celular proliferativo.

SEQ ID No. 1 (Secuencia de aminoácidos del FGF-23 humano)

```

      10           20           30           40           50           60
      |           |           |           |           |           |
MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNGH

      70           80           90           100          110          120
      |           |           |           |           |           |
VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL

      130          140          150          160          170          180
      |           |           |           |           |           |
ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS

      190          200          210          220          230          240
      |           |           |           |           |           |
AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRRG RVNTHAGGTG

      250
      |
PEGCRPFAKF I
    
```

El término "polipéptido" como se lo utiliza aquí, se refiere a una proteína, péptido, oligopéptido u oligopéptido sintético. Estos términos pueden ser utilizados en forma intercambiable. Cualquiera de dichos términos se refiere a una cadena de dos o más aminoácidos que están emplazados juntos a través de enlaces amida o peptídicos, independientemente de modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación o fosforilación. Los polipéptidos pueden incluir también más de una subunidad, donde cada subunidad es codificada por una secuencia separada de ADN.

El término "bioactivo", como se lo utiliza aquí, se refiere a una molécula que provoca o realiza un evento biológico. Tal evento biológico puede por ejemplo estar relacionado con una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada o con un trastorno celular proliferativo.

Un "polipéptido bioactivo" de la invención incluye FGF-23, fragmentos de FGF-23 tales como fragmentos derivados del terminal C del FGF-23. También están incluidos homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos 50% con el FGF-23 o fragmentos del mismo y variantes del FGF-23 o de fragmentos del FGF-23. El polipéptido de acuerdo con la invención puede incluir al FGF-23 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Un fragmento del FGF-23 puede contener al menos 10 aminoácidos, preferiblemente al menos 15, 20, 25 ó 30 aminoácidos. Más preferiblemente un fragmento del FGF-23 puede contener al menos 50, 60, ó 70 aminoácidos. Lo más preferible, un fragmento del FGF-23 contiene 75 aminoácidos. Alternativamente, un fragmento del FGF-23 puede contener al menos 80 ó 100 aminoácidos, y más preferiblemente al menos 120 ó 150 aminoácidos. En particular, el fragmento puede contener al menos 180 aminoácidos, tal como por ejemplo 200 aminoácidos.

Tal polipéptido puede ser también un producto de escisión proteolítico del FGF-23 generado por proteasas tales como una endopeptidasa unida a la membrana que incluye PHEX. Un polipéptido de acuerdo con la invención puede incluir un fragmento del terminal C del FGF-23. Tal fragmento del terminal C puede contener al menos 15 aminoácidos del terminal C del FGF-23, preferiblemente al menos 25, al menos 35 ó 45, más preferiblemente al menos 55 o al menos 65, lo más preferible al menos 70, tal como por ejemplo 75 aminoácidos. Los al menos 15 aminoácidos pueden incluir la mayoría de los al menos 15 aminoácidos del terminal C, pudiendo incluir también los al menos 15 aminoácidos dentro de la parte del terminal C del FGF-23. El polipéptido puede incluir al menos la mayoría de los 75 aminoácidos del terminal C del FGF-23 y puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, denominada polipéptido del terminal C del FGF-23 (FGF23CTP).

SEQ ID No. 2 (Secuencia de aminoácidos del FGF23CTP)

```

          10          20          30          40          50          60
          |          |          |          |          |          |
HTRSAEDDSE RDPLNVLKPR ARMTPAPASC SQELPSAEDN SPMASDPLGV VRGGRVNTHA
          70          75
          |          |
GGTGPEGCRP FAKFI
    
```

El polipéptido puede tener también una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% u 80%, y lo más preferiblemente al menos 90% por ejemplo 95%, 97%, o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptido los anteriormente mencionados.

Los polipéptidos bioactivos de la presente invención como los descritos anteriormente también pueden denominarse como FGF-23, proteína o polipéptido del FGF-23, polipéptidos relacionados o derivados del FGF-23, polipéptidos relacionados o derivados del terminal C del FGF-23, o polipéptidos del terminal C del FGF-23.

Los residuos aminoácidos se denomina aquí por medio de sus notaciones estándar de una sola letra o de tres letras: A (Ala) alanina; C (Cys) cisteína; D (Asp) ácido aspártico; E (Glu) ácido glutámico; F (Phe) fenilalanina; G (Gly) glicina; H (His) histidina; I (Ile) isoleucina; K (Lys) lisina; L (Leu) leucina; M (Met) metionina; N (Asn) asparagina; P (Pro) prolina; Q (Gln) glutamina; R (Arg) arginina; S (Ser) serina; T (Thr) treonina; V (Val) valina; W (Trp) triptófano; Y (Tyr) tirosina.

El término "porcentaje (%) de identidad", o un término similar, utilizado con respecto a la comparación de una secuencia de referencia y de otra secuencia (es decir una secuencia "candidata"), significa que en una alineación óptima entre las dos secuencias, la secuencia candidata es idéntica a la secuencia de referencia en una cantidad de posiciones de la subunidad equivalentes al porcentaje indicado, siendo las subunidades nucleótidos para comparaciones de polinucleótidos o de aminoácidos para comparaciones de polipéptidos. Como se lo utiliza aquí, una "alineación óptima" de las secuencias que están siendo comparadas es aquella que maximiza correspondencias entre subunidades y minimiza el número de huecos empleados en la construcción de una alineación. El porcentaje de identidades se puede determinar con la implementación de algoritmos comercialmente disponibles descritos por Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 - 453 (1970) (programa "GAP" del Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group, Madison, WI). Otros paquetes de software en el arte para construir alineaciones y calcular el porcentaje de identidad u otras mediciones similares incluyen al programa "BestFit", basado en el algoritmo de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482 - 489 (1981) (Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group, Madison, WI). El porcentaje de identidad también puede ser generado por medio de WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996)). WU-BLAST-2 utiliza diferentes parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales la mayoría de los cuales se establecen en los valores predeterminados. Los parámetros que pueden ser ajustados se establecen con los

siguientes valores: empalme por superposición = 1, fracción por superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Un valor en % de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina por medio del número de residuos idénticos que coinciden, dividido por el número total de residuos en la región alineada. Por ejemplo, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta cinco por ciento de los residuos aminoácidos en la secuencia de referencia pueden ser suprimidos o sustituidos con otro aminoácido, o una cantidad de aminoácidos hasta un cinco por ciento de los residuos aminoácidos totales en la secuencia de referencia pueden ser insertados dentro de la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones del terminal amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones del terminal, intercaladas ya sea individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia de uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Se entiende que la hacer las comparaciones con las secuencias de referencia de la invención, esa secuencia candidato puede ser un componente o segmento de un polipéptido o polinucleótido más grande y que tales comparaciones para el propósito de computar el porcentaje de identidad se debe llevar a cabo con respecto al componente o segmento relevante.

Un polipéptido de la invención también incluye un fragmento de polipéptido de un polipéptido de la invención. Tal fragmento de polipéptido se entiende que es un polipéptido que tienen una secuencia de aminoácidos que es completamente la misma en parte, pero no totalmente, de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Tal fragmento de polipéptido puede ser "independiente" o puede ser parte de un polipéptido más grande del cual dicho fragmento del polipéptido forma una parte o región, más preferiblemente como una región continua única. Preferiblemente tal polipéptido o fragmento de polipéptido retiene la actividad biológica del correspondiente polipéptido de la invención.

La invención también incluye variantes funcionalmente preservadas de los polipéptidos o fragmentos de polipéptidos descritos aquí. Tales variantes pueden ser elaboradas utilizando métodos estándar en el arte, por ejemplo, por medio de sustituciones conservadoras de aminoácidos. Típicamente tales sustituciones están entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr. Se prefieren particularmente las variantes en las cuales se sustituyen, suprimen o añaden varios, 5 a 10, 1 a 5, o 2 aminoácidos, en cualquier combinación.

En varias otras modalidades, el polipéptido (fragmento) o variante de polipéptido puede ser lineal o ramificada, puede incluir aminoácidos modificados, puede ser interrumpida por no aminoácidos, y/o puede ser ensamblada en un complejo de más de una cadena de polipéptido. Como es bien entendido en el arte, un polipéptido puede ser modificado en forma natural o por medio de intervención; por ejemplo, formación de un enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcación. En algunas modalidades, los polipéptidos o fragmentos de polipéptidos contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo; por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en el arte.

Un polipéptido o fragmento de polipéptido de la invención incluye polipéptidos aislados de origen natural. Preferiblemente, tal polipéptido de origen natural tiene una frecuencia en una población seleccionada de al menos un cinco por ciento, y más preferiblemente, de al menos diez por ciento. La población seleccionada puede ser cualquier población reconocida de estudio en el campo de la genética de poblaciones. Preferiblemente, la población seleccionada es caucásica, negroide, o asiática. Más preferiblemente, la población seleccionada es francesa, alemana, inglesa, española, suiza, japonesa, china, coreana, de Singapur pero de origen chino, islandesa, norteamericana, israelí, árabe, turca, griega, italiana, polaca, isleña del pacífico, o india.

Un polipéptido (fragmento) de la invención puede incluir también polipéptidos producidos en forma recombinante, polipéptido si producidos en forma sintética y una combinación de tales polipéptidos de la invención, y fragmentos de los mismos. Los medios para preparar tales polipéptidos son bien comprendidos en el arte. Por ejemplo, se pueden aislar un fragmento de polinucleótido o un polipéptido de la invención a partir de fluidos corporales que incluyen, pero no se limitan a, suero, orina, y ascitis, o sintetizados por métodos químicos o biológicos (por ejemplo, un cultivo de células, expresión génica recombinante). "Aislado", si no se especifica otra cosa aquí incluye el significado "separado de material coexistente".

Los polipéptidos recombinantes de la presente invención pueden ser reparados por medio de procesos bien conocidos en el arte a partir de células huésped modificadas por ingeniería genética que contienen sistemas de expresión. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con la producción de polipéptidos por medio de técnicas recombinantes, con sistemas de expresión que contienen un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención, con células huésped que están modificadas por medio de ingeniería genética con tales sistemas de expresión, y con métodos para aislar los polipéptidos.

Otra modalidad establece que un polipéptido de la invención sea codificado por un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones rigurosas a la SEQ. ID No: 3 o a la SEQ. ID No: 4. En algunas modalidades, el ácido nucleico contiene

al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, o al menos 150 nucleótidos. Preferiblemente el ácido nucleico contiene al menos 175 o al menos 200 nucleótidos. En particular contiene 225 ó 228 nucleótidos. El ácido nucleico puede contener también al menos 300, o al menos 400 ó 500 nucleótidos. Preferiblemente puede contener al menos 600 o al menos 700 nucleótidos. Más preferiblemente contiene al menos 750 nucleótidos. Tales ácidos nucleicos pueden contener nucleótidos contiguos de la SEQ ID No: 3 ó 4 o nucleótidos contiguos capaces de hibridar a la SEQ ID NO: 3 ó 4 bajo condiciones rigurosas.

SEQ ID No. 3 (Secuencia de ácido nucleico del FGF-23 humano)

```

atgttggggg cccgcctcag gctctgggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc 60
gtcctcagag cctatcccaa tgcctcccca ctgctcggct ccagctgggg tggcctgac 120
cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccacaa gaatggccat 180
gtggatggcg caccccatca gaccatctac agtgcctga tgatcagatc agaggatgct 240
ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga tttcagaggc 300
aacatTTTTg gatcacacta ttcgacccg gagaactgca ggttccaaca ccagacgctg 360
gaaaacgggt acgacgtcta ccactctcct cagtatcact tcctgggtcag tctgggccgg 420
gcgaagagag ccttcctgcc aggcataaac ccacccccgt actcccagtt cctgtcccgg 480
aggaacgaga tccccctaat tcaattcaac acccccatac cacggcggca cccccggagc 540
gccgaggacg actcggagcg ggacccccctg aacgtgctga agccccgggc ccggatgacc 600
ccggccccgg cctcctgttc acaggagctc ccgagcggcg aggacaacag cccgatggcc 660
agtgacctat taggggtggt cagggggcgt cgagtgaaca cgcacgctgg gggaaacgggc 720
ccggaaggct gccgcccctt cgccaagttc atctag 756
    
```

SEQ ID No. 4 (Secuencia de ácido nucleico del FGF23CTP)

```

cacacccgga ggcgggagga cgactcggag cgggaccccc tgaacgtgct gaagccccgg 60
gccccgatga cccccgcccc ggcctcctgt tcacaggagc tcccgagcgc cgaggacaac 120
agccccgatg ccagtgacct attaggggtg gtcagggcg gtcgagtga cacgcacgct 180
gggggaaacg gcccggaagg ctgccgcccc ttcgccaagt tcatctag 228
    
```

El término "ácido nucleico" significa moléculas de ácido nucleico naturales o semi-sintéticas o sintéticas o modificadas. Se refiere a secuencias de nucleótidos, oligonucleótidos o polinucleótidos incluidos ácido desoxirribonucleico (ADN) y/o ácido ribonucleico (ARN) y/o nucleótidos modificados. Estos términos se utilizan en forma intercambiable. El ARN puede estar en la forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNsn (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, y ribozimas. El ADN puede estar en la forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal, ADN cromosómico o ADN genómico, ADNc, o derivados de estos grupos. Además estos ADN y ARN pueden ser mono, bi, tri o tetracatenarios. El término también incluye los PNA (ácidos nucleicos peptídicos), fosforotioatos, y otras variantes de la columna vertebral de fosfato de ácidos nucleicos nativos.

Las "condiciones rigurosas" de las reacciones de hibridación pueden ser fácilmente determinadas por alguien ordinariamente capacitado en el arte, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más altas para una hibridación adecuada, mientras que sondas más cortas requieren temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la habilidad del ácido nucleico desnaturizado para hibridarse nuevamente cuando están presentes hebras complementarias en un ambiente cercano pero por debajo de su temperatura de fusión. Entre más alto el grado de homología entre la sonda y la secuencia que puede ser hibridada tal como la SEQ. ID No: 3 ó 4, más alta la temperatura relativa que puede ser utilizada. Como resultado, resulta que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas no tanto. Además, la rigurosidad es también inversamente proporcional a las concentraciones de sal. Las "condiciones rigurosas" se ejemplifican por medio de las condiciones de reacción caracterizadas por: (1) fuerza iónica baja y alta temperatura para lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1 % a 50°C; (2) el uso de un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (vol/vol) con albúmina de suero bobino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C. Alternativamente, condiciones rigurosas pueden ser: formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5x solución

de Denhardt, ADN sonificado de esperma de salmón (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste de 0,1x SSC que contiene EDTA a 55°C. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Protocols in Molecular Biology* (1995).

Elaboración recombinante de polipéptidos del terminal C del FGF-23. Los ácidos nucleico descritos aquí por ejemplo las SEQ. ID No: 3 ó 4 pueden ser utilizados en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de los polipéptidos correspondientes en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración en el código genético, otras secuencias de ADN pueden codificar la secuencia equivalente de aminoácidos, y pueden ser utilizadas para clonar y expresar al FGF-23 o fragmentos del mismo. Los codones preferidos por una célula huésped particular pueden ser seleccionados y sustituidos en las secuencias de nucleótidos de origen natural, para incrementar la tasa y/o eficiencia de la expresión. El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica al FGF-23 deseado o fragmentos del FGF-23 tales como FGF23CTP puede ser insertado en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN), y/o para expresión.

Sistemas de expresión. El polipéptido puede ser expresado en forma recombinante en cualquiera de una cantidad de sistemas de expresión de acuerdo con los métodos conocidos en el arte (Ausubel, et al., editors, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley Sons, New York, 1990). Tales sistemas de expresión incluyen sistemas cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus por ejemplo baculovirus, papovavirus, por ejemplo SV40, virus vacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tal como aquellos derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, por ejemplo cósmidos y fagémidos.

Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan así como que engendran expresión. Generalmente, cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un huésped, puede ser utilizado. La secuencia apropiada de nucleótidos puede ser insertada en un sistema de expresión por medio de cualquiera entre una variedad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, aquellas expuestas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). En general, se inserta el ADN en un sitio apropiado para la endonucleasa de restricción, utilizando técnicas conocidas en el arte.

Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más entre un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento reforzador, un promotor, una secuencia señal o de secreción, y una secuencia de terminación de la transcripción:

El vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así mantenerlo en dos organismos, por ejemplo en células de insecto o de mamífero para expresión y en un huésped procarionota para clonación y aplicación. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, cepas de levadura, y virus.

Preferiblemente, el vector de expresión contiene un gen marcador para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en el arte y variarán con la célula huésped utilizada. Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente un gen de selección, también llamado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos por ejemplo, el gen para la D-alanina racemasa.

Las secuencias promotoras codifican ya sea promotores constitutivos o inducibles. Los promotores pueden ser o bien promotores de origen natural o promotores híbridos. Los promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor, son también conocidos en el arte, y son útiles en la presente invención. Además, para la integración de los vectores de expresión, el vector de expresión contiene al menos una secuencia homóloga al genoma de la, y preferiblemente, dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. El vector de integración puede ser dirigido a un lugar específico en la célula huésped por medio de la inserción de la secuencia homóloga apropiada en el vector. Las construcciones para integración de los vectores son bien conocidas en el arte.

Se puede incorporar una señal apropiada de secreción en el polipéptido deseado para permitir la secreción del polipéptido dentro del lumen del retículo endoplasmático, el espacio periplásmico o el ambiente extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas. La secuencia señal puede ser una secuencia señal de procarionota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o guías de enterotoxina II estables al calor. Para secreción de la levadura la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la guía de invertasa de levadura, la guía del factor alfa (incluidas las guías del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*). En los sistemas de expresión de las células de mamífero, las secuencias señalan de mamífero de

los polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, así como las guías secretoras virales pueden ser utilizadas para secreción directa del FGF-23 o de fragmentos del mismo tales como FGF23CTP.

5 Las células huésped apropiadas incluyen células de levadura, bacterias, arqueobacterias, hongos, y células de insectos y animales, incluidas células de mamíferos, por ejemplo células primarias, incluyendo pero sin limitarse a células madre. Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces*, y *Bacillus subtilis*, de hongos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, otras células de levadura o *Aspergillus*; células de insecto tales como S2 de *Drosophila* y células Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y células de melanoma de Bowes, y células de plantas.

10 Se puede escoger una cepa de células huésped por su habilidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado en la forma deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traducciona, que escinde una forma "prepro" del polipéptido, puede también ser importante para la correcta inserción, plegado y/o función.

15 FGF-23 o fragmentos del mismo tales como FGF23CTP pueden ser producidos por medio del cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un FGF-23 o fragmentos del mismo bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar expresión de la proteína o el polipéptido. En una modalidad preferida de la invención, se provee una célula huésped que es transfectada en forma estable o transitoria con un ácido nucleico de la SEQ. ID No: 3 ó 4 o transfectada con un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones rigurosas a la SEQ. ID No: 3 ó 4. De acuerdo con otra modalidad de la invención, dicha célula huésped se cultiva para permitir la expresión del FGF-23 o de un fragmento del FGF-23, y se aísla el polipéptido del cultivo de células.

25 Las células huésped transformadas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, vectores de expresión de ADN de plásmidos o de cosmidos, levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura, y células de insecto infectadas con un virus recombinante de insecto (tal como baculovirus), y un sistema de expresión de mamífero.

30 Las condiciones apropiadas para expresión del FGF-23 o de fragmentos del mismo tales como FGF23CTP variarán con la escogencia del vector de expresión y la célula huésped, y serán fácilmente comprobadas por alguien capacitado en el arte a través de experimentación de rutina. Por ejemplo, el uso de promotores constitutivos en el vector de expresión requerirá la optimización del crecimiento y proliferación de la célula huésped, mientras que el uso de un promotor inducible requiere de condiciones apropiadas de crecimiento para la inducción. Además, en algunas modalidades, el momento de la cosecha es importante. Por ejemplo, los sistemas baculovirales utilizados junto con células de insecto son virus líticos, y por lo tanto la selección del momento de la cosecha puede ser crucial para el rendimiento del producto.

35 El FGF-23 deseado o un fragmento del FGF-23 pueden ser producidos en forma recombinante no solamente directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo. Tal polipéptido heterólogo es colocado generalmente en el terminal amino o carboxilo del FGF-23 o de un fragmento del FGF-23 y puede proporcionar una etiqueta para el epítipo con la cual puede enlazarse en forma selectiva un anticuerpo anti-etiqueta. Por lo tanto, tal etiqueta del epítipo permite que FGF-23 o un fragmento del mismo sea fácilmente purificado por medio del uso de un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se enlaza con la etiqueta del epítipo. Los ejemplos de etiquetas del epítipo son 6xHis o la etiqueta c-myc. Alternativamente FGF-23 o un fragmento del mismo puede ser expresado en la forma por ejemplo de una proteína de fusión-GST. Las construcciones apropiadas generalmente son conocidas en el arte y se encuentran disponibles con proveedores comerciales tales como Invitrogen (San Diego, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif.), Gibco BRL (Rockville, Md.) o Clontech (Palo Alto, Calif.).

50 Evaluación de la expresión génica. La expresión génica puede ser evaluada directamente en una muestra, por ejemplo, por medio de técnicas estándar conocidas por aquellos capacitados en el arte, por ejemplo, transferencias tipo Southern para detección de ADN, transferencias tipo Northern para determinar la transcripción de ARNm, transferencia en mancha (ADN o ARN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda adecuadamente marcada, con base en las secuencias suministradas aquí. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos en ensayos para detección de ácidos nucleicos, tales como dúplex específicos, incluidos dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Tales anticuerpos pueden ser marcados y se puede llevar a cabo el ensayo donde el dúplex se enlaza a una superficie, para que después de la formación del dúplex sobre la superficie, se pueda detectar la presencia de anticuerpo enlazado al dúplex. La expresión génica, alternativamente, puede ser medida por medio de coloración inmunohistoquímica de secciones de células o de tejidos y ensayos de cultivos de células o de fluidos corporales, para evaluar directamente la expresión del FGF-23 o de un fragmento del FGF-23. Los anticuerpos útiles para tales ensayos inmunológicos pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden

ser preparados contra una secuencia nativa del FGF-23 o de fragmentos del FGF-23 con base en las secuencias de ADN suministradas aquí.

Purificación de la proteína expresada. El FGF-23 expresado o un fragmento del FGF-23 tal como FGF23CTP pueden ser purificados o aislados después de la expresión, utilizando cualquiera entre una variedad de métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte. La técnica apropiada variará dependiendo de la vía de expresión del FGF-23 o un fragmento del FGF-23. El polipéptido puede ser, por ejemplo, recuperado del medio de cultivo en la forma de una proteína secretada o a partir de lisados de células huésped. Se pueden romper las células por medio de diferentes medios físicos o químicos, tales como signos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica, o por medio del uso de agentes de lisado de células, mientras que los polipéptidos enlazados a la membrana pueden ser liberados de la misma utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X100) o por medio de escisión enzimática. La técnica apropiada para purificación o al aislamiento del polipéptido variará también dependiendo de qué otros componentes estén presentes en la muestra. E grado de purificación necesariamente variará también dependiendo del uso del FGF-23 o de un fragmento del mismo. Los componentes contaminantes que son removidos por aislamiento o purificación son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos. La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y del FGF-23 particular o fragmento del FGF-23 producido.

Ordinariamente, el FGF-23 aislado o un fragmento del mismo serán preparados por medio al menos de una etapa de purificación. Los métodos bien conocidos para purificación incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferiblemente, se emplea cromatografía de afinidad para la purificación. Por ejemplo, el FGF-23 o un fragmento del mismo tal como FGF23CTP pueden ser purificados utilizando una columna estándar de anticuerpo del polipéptido del terminal C del anti-FGF-23. Las técnicas de ultrafiltración y diálisis, junto con la concentración de proteína, son también útiles (ver, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, New York, N.Y., 1982). Se pueden emplear técnicas bien conocidas para plegar nuevamente proteínas para regenerar la conformación activa cuando se desnaturaliza el polipéptido durante el aislamiento y/o purificación.

Marcación del polipéptido expresado. Los ácidos nucleicos, proteínas y anticuerpos de la invención pueden ser marcados. Por marcado se entiende aquí que un compuesto tiene unido al menos un elemento, isótopo o compuesto químico para permitir la detección del compuesto. En general, las etiquetas caen en tres clases: a) etiquetas isotópicas, que pueden ser radioactivas o isótopos pesados; b) etiquetas inmunes, que pueden ser anticuerpos o antígenos; y c) tintas fluorescentes o coloreadas. Las etiquetas pueden ser incorporadas en el compuesto en cualquier posición que no interfiera con la actividad biológica o característica del compuesto que esté siendo detectada.

Elaboración química del FGF-23 y de fragmentos del FGF-23. Los polipéptidos o fragmentos de los mismos pueden ser producidos no solamente por medio de métodos recombinantes, sino también por medio del uso de métodos químicos bien conocidos en el arte. La síntesis de péptidos en fase sólida puede ser llevada a cabo en un proceso de flujo continuo o por tandas que añade secuencialmente residuos aminoácidos alfa-amino y de cadena lateral protegida a un soporte polimérico insoluble a través de un grupo enlazador. Un grupo enlazador tal como polietilén glycol derivatizado de metilamina se une a poli(estireno-co-divinilbenceno) para formar la resina de soporte. Los residuos aminoácidos son N-alfa-protegidos por medio de Boc lábil al ácido (t-butiloxicarbonilo) o Fmoc lábil a base (9-fluorenilmetoxicarbonilo). El grupo carboxilo del aminoácido protegido se acopla a la amina del grupo enlazador para anclar el residuo a la resina de soporte en fase sólida. Se utilizan ácido trifluoroacético o piperidina para remover el grupo protector en el caso de Boc o Fmoc, respectivamente. Se añade cada aminoácido adicional al residuo anclado utilizando un agente de acoplamiento o derivado pre-activado de aminoácido, y se lava la resina. Se sintetiza el péptido de longitud completa por medio de desprotección secuencial, acoplamiento de aminoácidos derivatizados, y lavando con diclorometano y/o N,N-dimetilformamida. Se escinde el péptido entre el terminal carboxi del péptido y el grupo enlazador para producir un péptido ácido o amida. (Novabiochem 1997/98 Catalog and Peptide Synthesis Handbook, San Diego Calif. pp. S1 - S20). También se puede llevar a cabo una síntesis automatizada en máquinas tales como el sintetizador de péptidos ABI 431 A (Applied Biosystems). Se puede purificar un polipéptido o un fragmento del mismo por medio de cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento y su composición confirmada por medio de análisis de aminoácidos o por secuenciación (Creighton T.E. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, W H Freeman, New York N.Y.).

Variantes. Las variantes del polipéptido natural pueden ser deseables en una variedad de circunstancias. Por ejemplo, se pueden reducir los efectos secundarios indeseables por medio de ciertas variantes, particularmente si la actividad del efecto secundario está asociada con una parte diferente del polipéptido de aquella de la actividad deseada. En algunos sistemas de expresión, el polipéptido nativo puede ser susceptible a degradación por proteasas. En tales casos, sustituciones seleccionadas y/o supresiones de aminoácidos que cambian las secuencias susceptibles pueden mejorar los rendimientos significativamente. Las variantes pueden incrementar también los

rendimientos en los procedimientos de purificación y/o incrementar la vida útil de proteínas por medio de la eliminación de aminoácidos susceptibles a oxidación, acilación, alquilación, u otras modificaciones químicas. Preferiblemente, tales variantes incluyen alteraciones que son conformacionalmente neutras, es decir son diseñadas para producir cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos variante comparado con el polipéptido nativo, y (ii) antigénicamente neutros es decir se diseñan para producir cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos variante comparado con el polipéptido nativo.

Fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad. Los polipéptidos anteriormente mencionados pueden, de acuerdo con la invención, ser utilizados para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada o un trastorno celular proliferativo.

El término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Aquellos que requieren de un tratamiento incluyen a todos aquellos que ya presentan el trastorno así como aquellos en quienes el trastorno debe ser prevenido.

Un "trastorno" o una "enfermedad" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con FGF-23 o con una fracción del FGF-23 como se definió anteriormente y adicionalmente más adelante. Esta incluye tanto trastornos agudos como crónicos, así como aquellas condiciones patológicas que predisponen al trastorno o la enfermedad en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos o enfermedades que son tratadas aquí incluyen cualquier condición que resulte de angiogénesis desregulada o de proliferación celular desregulada. Los ejemplos de enfermedades asociadas con angiogénesis desregulada incluyen: neovascularización ocular, por ejemplo retinopatías (incluida retinopatía diabética), degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerosis, enfermedades inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias reumatóides o reumáticas, especialmente artritis, por ejemplo artritis reumatoide, u otros trastornos inflamatorios crónicos, tales como asma crónica, aterosclerosis arterial o posterior un trasplante, endometriosis, y especialmente enfermedades neoplásicas, por ejemplo los así llamados tumores sólidos y tumores líquidos (por ejemplo leucemias).

Un ejemplo preferido de enfermedades asociadas con angiogénesis desregulada se selecciona del grupo de retinopatías, degeneración macular relacionada con la edad, hemangioblastoma, hemangioma, y tumores. Un ejemplo particularmente preferido de enfermedades asociadas con angiogénesis desregulada es retinopatía.

Los ejemplos de trastornos proliferativos celulares incluyen: enfermedades renales crónicas o agudas, por ejemplo nefropatía diabética, nefrosclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica o rechazo de trasplantes, o especialmente enfermedad renal inflamatoria, por ejemplo glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome hemolítico urémico, nefropatía diabética, nefrosclerosis hipertensiva, ateroma, restenosis arterial, queratosis actínica, arteriosclerosis, aterosclerosis, bursitis, hepatitis, enfermedad de tejido conector mixto (MCTD), mielofibrosis, hemoglobinuria paroxística nocturna, policitemia vera, psoriasis, trombocitemia primaria, y enfermedades autoinmunes, inflamación aguda, trastornos fíbricos (por ejemplo cirrosis hepática), diabetes, endometriosis, asma crónica, trastornos neurodegenerativos y especialmente enfermedades neoplásicas tales como adenocarcinoma, gliomas, leucemia, linfoma, melanoma, mieloma, sarcoma, sarcoma de Kaposi, teratocarcinoma, y, en particular, cánceres de la glándula adrenal, vejiga, óseo, de médula ósea, cerebro, seno, cervix, colon, vesícula biliar, ganglios, tracto gastrointestinal, corazón, riñón, hígado, pulmón (especialmente cáncer de pulmón de células pequeñas), musculo, ovario, páncreas, paratiroides, pene, próstata, glándulas salivales, piel, bazo, testículo, timo, tiroides, y útero.

Un ejemplo preferido de un trastorno proliferativo celular se selecciona del grupo de enfermedades renales crónicas o agudas, arteriosclerosis, aterosclerosis, psoriasis, endometriosis, diabetes, asma crónica y cáncer. Un ejemplo particularmente preferido de un trastorno proliferativo celular es cáncer.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada que comprende la administración de una cantidad efectiva de un polipéptido a un mamífero incluido un humano que sufre de la enfermedad, en donde se selecciona el polipéptido de los grupos que consisten de (a) FGF-23 (SEQ. ID No: 1) o un fragmento del FGF-23; (b) un polipéptido bioactivo que tiene un porcentaje de identidad de al menos 50% con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos de (a); o (c) una variante bioactiva de cualquiera de los polipéptido de (a) o (b). Por lo tanto, se puede administrar un polipéptido como el descrito anteriormente.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular que comprende la administración de una cantidad efectiva del FGF-23 o de un fragmento del FGF-23 tal como FGF23CTP como se describió anteriormente para un mamífero incluido un humano que padece del trastorno.



"Mamífero" para propósitos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos humanos, animales domésticos, y de zoológico, deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, ganado, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

5 Composición farmacéutica. Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en una enfermedad asociada con angiogénesis desregulada o un trastorno proliferativo, que contiene FGF-23 o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención como se describe más arriba y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la invención se administra en cantidades efectivas.

10 La composición farmacéutica puede ser utilizada en los métodos anteriores de tratamiento. Tales composiciones son preferiblemente estériles y contienen una cantidad efectiva del FGF-23 o un fragmento del FGF-23 tal como FGF23CTP o un ácido nucleico que codifica al polipéptido para inducir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuado para administración a un paciente.

15 Una "cantidad efectiva" del FGF-23 o un fragmento del mismo, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para obtener resultados benéficos o deseados incluidos resultados clínicos tales como inhibición de retinopatía diabética o prematura, inhibición de angiogénesis, reducción del tamaño del tumor, retardo del crecimiento de células cancerosas, disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad o el trastorno, incremento de la calidad de vida de aquellos que sufren de la enfermedad o el trastorno, disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para el tratamiento de la enfermedad o el trastorno, reforzar el efecto de otro medicamento, retardar el progreso de la enfermedad o el trastorno, y/o prolongar la supervivencia de los pacientes, ya sea directa o indirectamente.

20 Tales cantidades dependerán también de la condición particular que está siendo tratada, la severidad de la condición, los parámetros individuales de cada paciente incluidas la edad, la condición física, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la ruta específica de administración y factores similares que hacen parte del conocimiento y experiencia del profesional de la salud. Estos factores son bien conocidos por aquellos ordinariamente capacitados en el arte y pueden ser abordados únicamente con  
25 experimentación de rutina.

Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más dosis y puede o no ser lograda en conjunto con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "cantidad efectiva" puede ser considerada en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar la administración de un solo agente en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más de otros agentes, se logra o puede lograrse un  
30 resultado deseable.

Una cantidad efectiva del FGF-23 o un fragmento del FGF-23 o la composición farmacéutica que contiene al polipéptido de la invención, sola o en conjunto con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede ser suministrada por medio de cualquier ruta convencional, incluida una inyección o por medio de una infusión gradual con el paso del tiempo. La administración, por ejemplo, puede ser oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular,  
35 intracavitaria, subcutánea, tópica o transdérmica.

Cuando es administrada, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en preparaciones farmacéuticamente aceptables. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se lo utiliza aquí significa uno o más rellenos líquidos o sólidos compatibles, diluyentes o sustancias para encapsulación que son adecuadas para administración en mamíferos incluidos los humanos. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación.  
40

El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes amortiguadores, preservantes, portadores compatibles, agentes complementarios potenciadores de inmunidad tales como adyuvantes y citoquinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos.  
45

Cuando se las utiliza en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden utilizar convenientemente sales que no son farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance la invención.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes amortiguadores adecuados, incluidos: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, preservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorbutanol; parabenos y timerosal.

5 Las dosis del polipéptido o del ácido nucleico que codifica dicho polipéptido administrado a un individuo pueden ser escogidas de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con la forma de administración utilizada y con el estado del individuo. Otros factores incluyen el período deseado de tratamiento. En el caso de que la respuesta del individuo sea insuficiente con las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis efectivamente más altas por medio de una ruta diferente de suministro más localizada) hasta el grado en que lo permita la tolerancia del paciente.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden ser presentadas en forma muy conveniente en forma de dosis unitarias y pueden ser preparadas por medio de cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner al agente activo junto con un portador que constituya uno o más ingredientes accesorios. En general, se preparan las composiciones poniendo en contacto en forma uniforme e íntima al compuesto activo junto con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, darle forma al producto.

15 Las composiciones adecuadas para administración oral pueden ser presentadas como unidades discretas, tales como cápsulas, tabletas, grageas, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o en líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

20 Las composiciones adecuadas para la administración parenteral incluyen convenientemente una preparación acuosa o no acuosa estéril de un polipéptido o ácido nucleico que codifica al polipéptido, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación puede ser formulada de acuerdo con métodos conocidos utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butano diol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden ser empleados están agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

25 La formulación del portador adecuado para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc., puede ser encontrada en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

30 Los siguientes ejemplos se presentan con el propósito de ilustrar más completamente las modalidades preferidas de la invención. Estos ejemplos no deben constituirse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención, como se define por medio de las reivindicaciones anexas.

### EJEMPLO I

Farmacología investigativa integrada a través de perfiles de expresión génica *in vivo* en ratones

35 En este ejemplo, se funcionalizan 100 péptidos desconocidos sintetizados químicamente utilizando el método de descubrimiento de la invención. La mayoría de estos péptidos están presentes en plasma humano.

40 Como control, se investigan actualmente veinte fármacos de referencia con el método de descubrimiento de la invención. Para esta selección, se tratan grupos de seis machos, uno de control y cuatro tratados, durante dos semanas por medio de la administración diaria por vía subcutánea de las proteínas. Los fármacos de referencia pueden ser activos para el tratamiento de condiciones en las áreas de glaucoma, neuroprotección, neovascularización, antiangiogénesis, acné, asma y alergia, enfermedades cardiovasculares, trastorno neurológico, dolor, diabetes, hipercolesterolemia, osteoporosis y oncología.

45 Las expectativas de esos péptidos activos seleccionados son que (a) diferentes fármacos terapéuticos potenciales podrían ser identificados; (b) péptidos objetivo para anticuerpos terapéuticos podrían ser identificados; (c) nuevos objetivos para investigación, deducidos a partir de las rutas bioquímicas reconstruidas, podrían ser identificados; y (d) biomarcadores, que son utilizados para el desarrollo de pruebas diagnósticas podrían ser identificados. Las investigaciones bioinformáticas de expresión génica en ratones sugieren indicaciones terapéuticas y una nueva percepción a través del análisis de rutas moleculares y funciones, que permiten priorización para la verificación de proteínas/péptidos seleccionados en monos. La tasa de selección de proteína/péptido es aproximadamente del 20%. Los criterios de selección/priorización son del tipo de actividad, el interés terapéutico y la toxicidad sospechada.

50 En un análisis inicial, después de la administración de un péptido (FGF23CTP, ver más adelante, EJEMPLO III) a ratones, se observaron los cambios en el nivel de transcripción en diferentes órganos lo que indica que el compuesto es activo y que impacta sobre las rutas involucradas en la diferenciación celular.

**EJEMPLO II**

Un estudio de farmacología y toxicidad de 7 días por vía subcutánea en ratones; análisis de la expresión génica del microarreglo

5 Introducción y resumen. Se analizaron cinco péptidos con una función no identificada en ratones para obtener datos bioquímicos y farmacogenómicos que permitirían una especificación de su actividad. Se trataron ratones CD-1 obtenidos por cruce de razas con péptidos GPA018, GPA019, GPA020, GPA022, y GPA023 durante siete días, se observaron las señales clínicas de los efectos del tratamiento (mortalidad, signos clínicos, peso corporal, consumo de alimento, hematología, bioquímica clínica) y, después sacrificio, se utilizaron un conjunto seleccionado de tejidos para el perfil de expresión génica. Se llevó a cabo un muestreo por ultracongelación de los tejidos en la necropsia al final del período de tratamiento. Estos tejidos fueron utilizados para obtener el perfil de expresión del ARNm y para el análisis histopatológico (fijación con formalina). Además, se registraron los parámetros investigados en un estudio exploratorio estándar. Ninguno de los péptidos tuvo ninguna influencia sobre los parámetros clínicos o farmacogenómicos. La obtención del perfil de expresión génica no reveló cambios significativos entre los animales de control y los tratados. Se concluyó que los péptidos eran inactivos y se decidió que no se harían investigaciones adicionales sobre estos péptidos.

20 Tratamiento. Se administraron los péptidos GPA018, GPA019, GPA020, GPA022, y GPA023 (GeneProt, Ginebra, Suiza; ver, FIG. 1) en forma subcutánea a ratones CD-1 durante siete días con una dosis de 300 mcg/día. La escogencia de ratones CD-1 (una cepa cruzada de razas de Charles River Laboratories, l'Arberesle, Francia) se hizo para incrementar el peso de los órganos del ratón y, por lo tanto, el rendimiento de ARN para el análisis del microarreglo. Se utilizaron cuatro animales por grupo de tratamiento y género. Al comienzo del período de tratamiento, los animales tenían de 12 a 14 semanas de edad. El peso corporal promedio era de 42,2g (38 a 45,6 g). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar para el bienestar de los mismos.

25 Se prepararon formas de dosificación antes del inicio del período de tratamiento. Se disolvió cada producto del ensayo en el vehículo (PBS) con el propósito de lograr la concentración requerida. Se dividieron las formas de dosificación obtenidas en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se prepararon dos alícuotas para cada grupo y día. Se suministraron las alícuotas para el tratamiento dos veces cada día de tratamiento a la sala de los animales.

Tabla 1

Asignación de los animales y dosis del producto del ensayo

Tratamiento	Número de animales	Nivel de dosis ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ )	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Control	4 machos y 4 hembras	0	0
GPA018	4 machos y 4 hembras	150 x 2	15
GPA018	4 machos y 4 hembras	150 x 2	15
GPA018	4 machos y 4 hembras	150 x 2	15
GPA018	4 machos y 4 hembras	150 x 2	15
GPA018	4 machos y 4 hembras	150 x 2	15

30 Exámenes *in vivo*. Se examinaron los animales al menos dos veces al día para verificar la mortalidad, el consumo de alimento y las observaciones clínicas. Se registró el peso corporal una vez por semana.

Se recolectaron muestras de sangre de cada animal. Se congelaron a muy baja temperatura las muestras de suero (aproximadamente -80°C) hasta los análisis para det erminación de la hormona.

35 Para el muestreo del tejido, se asfixiaron los animales por medio del uso de dióxido de carbono aproximadamente 12 a 16 horas después de la última inyección. Se llevó a cabo un examen macroscópico general post mortem con el propósito de especificar la posible reducción del tamaño de los órganos principales (con particular atención a los tejidos linfoides). No se observaron cambios morfológicos relacionados con el tratamiento.

Se llevó a cabo la ultracongelación de muchos órganos en la necropsia al final del período de tratamiento. En un lapso de 15 a 20 horas después del sacrificio, se llevó a cabo todo el muestreo para ultracongelación.

Se muestrearon veintiocho tejidos, incluidos cerebro, duodeno (intestino ciego), hígado, riñón, músculo y bazo (sangre). Para este ejemplo, se utilizaron animales macho y hembra en los ensayos de riñón e hígado. Todas las demás muestras de tejido se obtuvieron únicamente de machos.

Las muestras para histopatología fueron fijadas en formalina al 10% amortiguada con fosfato. Se llevó a cabo la desmineralización de los huesos con ácido fórmico al 10%.

Las muestras para el perfil de expresión génica fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de la excisión, almacenadas en hielo seco y posteriormente en un ultracongelador aproximadamente a -80°C para su utilización posterior.

Extracción y purificación del ARN. En resumen, se obtuvo el ARN total por medio de extracción en ácido guanidinio tiocianato fenol cloroformo (Trizol®, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif., EUA) de cada sección de tejido congelado y se purificó luego el ARN total sobre una resina de afinidad (Rneasy®, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y cuantificó. Se cuantificó el ARN total por medio de la absorbancia con  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $A_{260\text{nm}}$ ) y se estimó la pureza por medio de la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Se confirmó la integridad de las moléculas de ARN por medio de electroforesis no desnaturizante en gel de agarosa. Se almacenó el ARN aproximadamente a -80°C hasta el análisis. Se mantuvo una parte de cada muestra individual de ARN para el análisis de genes críticos por medio de PCR en tiempo real.

Ensayos con GeneChip®. Todos los ensayos con GeneChip® fueron realizados de acuerdo a lo recomendado por el fabricante del sistema GeneChip (Affymetrix, Expression Analysis Technical Manual, (Affymetrix, Santa Clara, Calif., EUA, 2003). Se utilizaron el conjunto de arreglos de sondas de expresión del Genoma MG-U74Av2 (Affymetrix, Inc., San Diego, Calif., EUA).

Se sintetizó ADNc bicatenario con una cantidad de partida de aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de ARN total de longitud completa utilizando el Superscript Choice System (Invitrogen Life Technologies) en presencia de un iniciador oligonucleótido de ADN T7-(dT)24. Después de la síntesis, se purificó el ADNc por medio de extracción con fenol/cloroformil/isoamil alcohol y precipitación con etanol. Se transcribió luego el ADNc purificado *in vitro* utilizando el BioArray® High Yield RNA Transcript Labeling Kit (ENZO, Farmingdale, New York, EUA) en presencia de ribonucleótidos biotinilados de ARNc marcado con biotina. Se purificó luego el ARNc marcado sobre una resina de afinidad (Rneasy®, Qiagen), se lo cuantificó y fragmentó. Se hibridó una cantidad aproximadamente de 10  $\mu\text{g}$  de ARNc marcado aproximadamente durante 16 horas a 45°C con un arreglo de una sonda de expresión. Se lavó luego el arreglo y coloreó dos veces con estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) utilizando la GeneChip® Fluidics Workstation 400 (Affymetrix).

Se escaneó luego el arreglo dos veces utilizando un escáner láser confocal (GeneArray® Scanner, Agilent, Palo Alto, Calif., EUA) dando como resultado una imagen escaneada. Se procesó este "archivo .dat" resultante utilizando el programa MAS4 (Affymetrix) en un "archivo .cel". El "archivo .cel" fue capturado y cargado en el Affymetrix GeneChip Laboratory Information Management System (LIMS). La base de datos del LIMS se conecta con un servidor UNIX Sun Solaris a través de un sistema de archivos en red que permite descargar las intensidades promedio para todas las celdas de pruebas (archivo CEL) en una base de datos Oracle. Se convirtieron los datos sin procesar en niveles de expresión utilizando una "intensidad objetivo" de 150. Se revisó la calidad de los datos y se los cargó en el software GeneSpring® 5.0.3 (Silicon Genetics, Redwood City, Calif., EUA) para su análisis.

Como control de calidad, se llevaron a cabo hibridaciones utilizando GAPDH o sondas de acción  $\beta$ .

Análisis de datos. Se estudiaron muestras de ARN por medio del uso de Affymetrix MG-U74Av2 GeneChip® humano. Sobre tal plataforma del chip, los juegos de sondas para genes individuales contienen 20 pares de oligonucleótidos, cada uno compuesto de una "correspondencia perfecta" de 25-mer y una "no correspondencia" de 25-mer que difiere del oligonucleótido de correspondencia "perfecta" en una sola base. Después de la marcación de la sonda, hibridación, y el escaneo láser, se estima el nivel de expresión promediando las diferencias en la intensidad de la señal medidas por medio de los pares de oligonucleótidos de una sonda dada (valor AvgDiff). El software de adquisición de imágenes y traducción numérica utilizado para este estudio fue el Affymetrix Microarray Suite versión 4 (MAS5). Se almacenaron los valores numéricos y se los transfirió para el análisis en el kit de herramientas del software Silicon Genetics GeneSpring® 5.0.3.

Se utilizaron diferentes herramientas de agrupamiento y filtración en estos programas para explorar los grupos de datos e identificar cambios a nivel de transcripciones que informan sobre las funciones celulares y tisulares alteradas y que pueden ser utilizadas para establecer hipótesis de trabajo sobre los modos de acción del compuesto. Se normalizaron todos los grupos de datos con la mediana. Para identificar efectos pleiotrópicos o únicos, se aplicaron

- tipos de fuentes suministrados por Silicon Genetics. Se investigaron también los efectos pleiotrópicos en forma manual por medio del análisis de los genes con un nivel de expresión de más del 60 en al menos tres de ocho condiciones (es decir órganos) y aplicando en lo sucesivo análisis estadístico (paramétrico, se asumen las varianzas que no son iguales,  $p < 0,1$ ) para identificar genes con cambios significativos en su expresión entre animales de control y tratados.
- 5
- Para identificar cambios significativos en expresión génica en órganos individuales, se aplicó un filtro de restricción de la expresión (ADV >60 en 50% de las muestras), y se añadió un filtro estadístico como se describe más arriba.
- En algunos casos, se utilizó un filtro de cambio exponencial (suministrado por Silicon Genetics) después de la restricción de la expresión para encontrar genes con un cambio en expresión génica por encima de un cierto nivel, y luego se aplicó un filtro estadístico.
- 10
- La decisión para considerar un gen específico relevante se basa en una conjunción de cambios numéricos identificados por medio de filtración exploratoria y algoritmos estadísticos como se describe más arriba y la relación con otros genes modulados que apuntan a un tema biológico común. El peso de esa relación es evaluada por el analista a través de una revisión de la literatura científica relevante.
- 15
- Perfil de expresión génica. A pesar de una multitud de enfoques estadísticos, no se observaron cambios significativos en los patrones de expresión génica de los grupos de tratamiento. En cada análisis, el número de genes modificados fue siempre menor que el número de genes que hubieran sido encontrados por casualidad. El rango de cambio exponencial era usualmente muy pequeño, excediendo muy pocas veces las 2 veces.
- 20
- En forma muy interesante, los cambios más fuertes fueron específicos del género. La comparación de los machos de control y de las hembras de control, así como de los machos tratados versus las hembras tratadas, mostró que cambiaron aproximadamente 3 veces más genes de lo que lo hicieron los machos o las hembras de control versus los machos o las hembras tratadas. Además, las listas de genes de efectos específicos del tratamiento en hembras y en machos mostraron poco superposición.
- 25
- En los riñones tratados con GPA018 de machos y hembras combinados (ocho muestras por grupo), se observaron algunas posibles influencias sobre los genes afectados por o afectando la señalización de TGF $\beta$  (Tabla 2A y Tabla 2B). GPA018 mostró alguna similitud de secuencia con la región del terminal N de mLTBP-2 (proteína-2 que enlaza al factor de crecimiento de transformación latente de múrido). Las proteínas LTBP ayudan para que el complejo LAP (proteína asociada con latencia)-TGF $\beta$  sea secretado y enlazado con la fibrilina de la proteína estructural de la ECM (matriz extracelular) (Annes JP et al., J. Cell Sci. 116(Pt2): 217 - 24 (2003); Chen S et al., Nucl. Acids Res. 31(4): 1302 - 10 (2003); Vehivilainen P et al., J. Biol. Chem. 278(27): 24705 - 13 (2003)). Sin embargo, el nivel de cambios después del tratamiento fue muy pequeño, usualmente por debajo de 1,5 veces, y no se observaron patrones similares cuando se investigaron separadamente grupos de hembras o machos.
- 30

Tabla 2A

## GPA018 en Riñón

Gen Expresado	Comentarios y Literatura
all-espectrina	Escindida durante apoptosis inducida por TGF (Brown TL et al., J. Biol. Chem. 274(33): 23256 - 23262 (1999))
$\beta$ -espectrina	La ruptura de la $\beta$ -espectrina de ELF conduce a la ruptura de la señalización de TGF $\beta$ en ratones (Tang Y et al., Science 299(5606): 574 - 7 (2003))
$\beta$ 5-Integrina	TGF $\beta$ induce integrina (Ludbrook SB et al., Biochem. J. 369(Pt2): 311 - 8 (2003))
Integrina $\alpha(v)\beta$ 3	El gen es un receptor para la LAP de TGF $\beta$ 1 y 3 (Ludbrook SB et al., Biochem. J. 369(Pt2): 311 - 8 (2003))

(continuación)

Receptor de TGFβ tipo I (ALK-5)	La sobreexpresión reduce la expresión de integrina β5 y la expresión de LTBP1 (Ota T et al., J. Cell Physiol. 193(3): 299 - 318 (2002))
LEF	TGFβ induce la expresión de genes objetivo LEF1; réplica entre la ruta de wnt y de TGFβ (Hu MC et al., Development 130(12): 2753 - 2766 (2002); Letamendia A et al., J. Bone Joint Surg. Am. 83-A Suppl 1(Pt1): S31 - 9 (2001))
Proteína Asociada con el Dominio de Muerte Fas (DAXX)	La apoptosis inducida por TGFβ es mediada por DAXX que facilita la activación de JNK (Perlman R et al., Nature Cell Biology 3(8): 708 - 14 (2001))
Forkheadbox D2	Identificación de FOXC 1 como un gen sensible a TGFβ1 y su participación en la regulación negativa del crecimiento celular (Zhou Y et al., Genomics 80(5): 465 - 72 (2002))
Biglicano	Regulación que depende de Smad4 de la expresión del gen biglicano por TGFbeta e células tumorales pancreáticas (Chen WB et al., J. Biol. Chem. 277(39): 36118 - 28 (2002))
Proteína precursora de β-Amiloide	TGFβ1 potencia la generación de β-amiloide en astrocitos y en ratones transgénicos; induce sobreexpresión de APP (Lesne S et al., J. Biol. Chem. 278(20): 18408 - 18 (2003))
Transgelina (SM22α)	La sobreexpresión del receptor de TGFβ tipo I (ALK-5) conduce a el favorecimiento de la expresión de SM22α (Chen S et al., Nucl. Acids Res. 31(4): 1302 - 10 (2003); Ota T et al., J. Cell Physiol. 193(3): 299 - 318 (2002))
Receptor de vitamina D	La vitamina D3 induce la expresión de TGFβ2; Smad3 enlaza y activa VDR (Yang L et al., J. Cell Physiol. 188(3): 383 - 93 (2001); Aschenbrenner JK et al., T. Surg. Res. 100(2): 171 - 5 (2001))
Efrina B2	La expresión de efrina A1 se disminuye por la sobreexpresión de ALK-5 (Ota T et al., J. Cell Physiol. 193(3): 299 - 318 (2002))

Tabla 2B: GPA018 en Riñón: Genes diferencialmente expresados con relación a la señalización de TGFβ

Descripción	Valor p	FC	Tratamiento: GPA018	Tratamiento: control	ID del grupo de Sonda
receptor de vitamina D	0.019	2.30	226.194 (128.4 a 298.52)	120.65 (32.02 a 78.91)	99965_at
receptor de proteína morfogénica ósea, tipo II	0.036	2.00	87.798 (42.42 a 168.21)	47.956 (14.39 a 106.76)	99865 at
cadherina 5	0.005	-1.32	78.321 (59.21 a 109.76)	102.412 (86.02 a 120.66)	104083_at

(continuación)

Descripción	Valor p	FC	Tratamiento: GPA018	Tratamiento: control	ID del grupo de Sonda
factor 1 de enlazamiento del reforzador linfoideo	0.010	1.26	145.94 (108.53 a 171.06)	97.804 (57.08 a 155.06)	103628_at
catenina src	0.049	1.30	124.611 (109.53 a 147.6)	98.962 (48.99 a 128.24)	98151_s_at
Proteína serina quinasa dependiente de calcio / calmodulina	0.049	-1.31	88.542 (50.23 a 119.39)	113.935 (90.22 a 167.09)	102248_f_at
serina/treonina quinasa 2 que interactúa con MAP quinasa	0.048	1.29	205.875 (181.61 a 249.07)	164.699 (99.8 a 208.85)	92473_at
proteína quinasa 12 activada por mitógeno	0.039	-1.19	72.744 (52.6 a 87.22)	86.312 (69.76 a 108.47)	92323_at
candidata 2 para el desarrollo de mesodermo	0.041	1.22	238.53 (178.42 a 283.5)	196.015 (143.39 a 269.01)	95405_at
forkhead box D2	0.037	1.20	118.66 (96.56 a 152.03)	98.895 (75.88 a 129.5)	94621_at
proteína asociada al dominio de muerte de Fas	0.050	-1.21	77.96 (56.46 a 100.72)	94.31 (73.12 a 115.51)	96125_at
efrina $\beta$ 2	0.021	-1.28	75.761 (54.43 a 102.77)	95.971 (69.63 a 113.05)	160857_at
receptor 1 de tirosina quinasa	0.009	-1.32	74.769 (58.19 a 98.31)	99.618 (74.5 a 131.81)	161184_at
biglicano	0.015	-1.36	152.224 (112.82 a 207.61)	208-264 (155.91 a 280.86)	162346f_at
factor 5 asociado al receptor de Tnf	0.008	-1.39	93.96 (68.53 a 144.09)	129.381 (94.61 a 154.04)	103255_at
	0.005	1.13	5345.84 (4783.18 a 6115)	4793,84 (4472.95 a 4995.46)	93063_at
actina, beta, citoplasmática	0.002	1.57	861.716 (470.94 a 1102.93)	539.534 (368 a 641.11)	95705s_at
integrina beta 5	0.023	-1.14	192.941 (167.13 a 215.24)	219.201 (191.49 a 252.53)	161786_f_at
integrina beta 5	0.048	-1.20	348.915 (309.8 a 427.48)	422.901 (311.02 a 527.04)	100601_at

(continuación)

Descripción	Valor p	FC	Tratamiento: GPA018	Tratamiento: control	ID del grupo de Sonda
procolágeno, tipo IV, alfa 4	0.045	1.42	149.262 (124.51 a 175.51)	111.732 (54.42 a 160.81)	101774_at
espectrina beta 2	0.004	1.12	829.471 (759.59 a 928.53)	741.779 (642.34 a 791.98)	93571_at
talina	0.032	1.12	542.186 (490.64 a 593.16)	486.978 (420.91 a 561.39)	99448_at
miosina VIIa	0.042	-1.13	132.021 (116 a 166.57)	148.674 (126.49 a 166.78)	94713_at
transgelina	0.045	-1.26	158.629 (138.26 a 177.61)	205.163 (132.68 a 308.45)	93541_at

**EJEMPLO III**

## 5 Perfil de expresión génica en múltiples órganos de mono cinomólogo tratado con fgf23ctp (100 µg/día subcutáneo)

Introducción y resumen. El objetivo de este ejemplo fue el de identificar las formas de acción del péptido FGF23CTP con las posibles aplicaciones terapéuticas por medio del perfil del microarreglo en múltiples órganos en el mono. El péptido FGF23CTP (GPA006, GeneProt, Ginebra, Suiza) se deriva de un dominio único del terminal de COOH del FGF-23. En un péptido terminal único de COOH de 75-mer del FGF-23 sin homología con regiones de otros miembros de la familia del FGF. Ver, la solicitud de patente PCT WO 02/088.358, cuyo contenido se incorpora como referencia. En el cerebro se expresan preferencialmente transcritos del FGF-23 en el tálamo (Yamashita T et al., Biochem. Biophys. Res. Commu., 277: 494 - 8 (2000)). Se propusieron mutaciones en esta región de la molécula del FGF-23 como eventos causantes en un síndrome de pérdida de fosfato en la orina responsable por una forma de raquitismo dominante autosómico (Saito H et al., Am. J. Pathol. 156: 697 - 707 (2002), White KE et al., Kidney Int. 60: 2079 - 86 (2001)). Una forma paraneoplásica similar de este síndrome estaba acompañada por expresión ectópica del FGF-23 en el tejido tumoral (Shimada T et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98: 6500 - 5 (2001)). FGF-23 se expresa en el núcleo talámico ventrolateral del cerebro. FGF23CTP ha sido derivado *in silico* como un posible producto del procesamiento del factor de crecimiento de fibroblasto FGF-23 conocido por estar involucrado en síndromes de pérdida de fosfato en la orina. Se ha planteado la hipótesis de que el péptido de 75-mer podría afectar la homeostasis del fosfato.

Se suministra FGF23CTP durante dos semanas en forma subcutánea a monos cinomólogos y se encuentra que afecta rutas críticas de diferenciación celular en un análisis del perfil de expresión génica en múltiples órganos con ensayos de microarreglos humanos de alta densidad. La comparación de los cambios de expresión en dieciséis órganos diferentes indicó cambios en el nivel común de transcritos para los genes involucrados en la señalización de célula a célula de la determinación del crecimiento y linaje, en el ciclo celular y en el transporte de aminoácidos y iones. Aunque el dominio de FGF23CTP es único y no se encuentra en otros miembros de la familia del FGF, los niveles de transcritos para los componentes de la ruta de señalización del FGF se afectan en diferentes órganos. Los niveles de proteína en suero de la proteína de enlazamiento de IGF2 circulante disminuyen en los animales tratados.

30 Los genes involucrados en angiogénesis/vasculogénesis se encuentra que se ven afectados en diferentes órganos. El efecto de FGF23CTP sobre la angiogénesis se confirma en un modelo de ratón con retinopatía vascular hipóxica (ver el ejemplo VIII).

Métodos. Se administra en forma subcutánea FGF23CTP a monos cinomólogos durante dos semanas con una dosis de 100 µg/día. Al final del período de tratamiento se someten las muestras de todos los órganos a ultracongelación en la necropsia y se analizan con la formación del perfil de expresión del GeneChip®.

35 Se extrae el ARN total de estos tejidos congelados utilizando el reactivo TRIzol® (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantifica el ARN total por medio de la absorbancia con  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $A_{260\text{nm}}$ ) y se estima la pureza por medio de la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Se revisa la integridad por medio de electroforesis de desnaturalización en gel. Se almacena el ARN a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el análisis.



Se utiliza ARN total de buena calidad para sintetizar ADNc bicatenario usando el Superscript® Choice System (Technologies, Gaithersburg, Maryland, EUA). Se transcribe luego el ADNc *in vitro* (MEGAscript™ T7 Kit, Ambion) para formar ARNc marcado con biotina. Luego, se hibridan de 12 a 15 µg de ARNc marcado con los arreglos de sondas de expresión Affymetrix Human U95A Versión 2 durante 16 horas a 45°C. Se lavan luego los arreglos de acuerdo con el protocolo EukGE-WS2 (Affymetrix), y se colorea con 10 µg/ml del conjugado estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes). La señal se amplifica con anticuerpo con 2 mg/ml de BSA acetilado (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EUA), MES 100 mM, [Na+] 1 M, Tween 20 al 0,05%, Antiespumante al 0,005 % (Sigma), 0,1 mg/ml de IgG de cabra y 0,5 mg/ml de anticuerpo biotinilado y coloreado nuevamente con la solución de estreptavidina. Después del lavado, se escanean los arreglos dos veces con el escáner Gene Array® (Affymetrix).

El nivel de expresión se estima promediando las diferencias en intensidad de señal medida por medio de pares de oligonucleótidos de una sonda dada (valor AvgDiff). El software de adquisición de imágenes y de traducción numérica utilizado fue Affymetrix Microarray Suite versión 4 (MAS4).

Para identificar genes que son impactados por el tratamiento, se filtra inicialmente el grupo de datos para excluir en una primera oleada de análisis genes cuyos valores están sistemáticamente en los rangos inferiores de expresión donde el ruido experimental es alto (al menos un valor AvgDiff de 80 en una cantidad de ensayos correspondientes al número más pequeño de replicas de cualquier punto del ensayo). En una segunda ronda de selección un valor p de umbral de la prueba t (0,05) identifica genes con diferentes valores entre tratado y no tratado con base en un modelo de error de dos componentes (Global Error Model) y, donde se posible, con una corrección de reducción para ensayos con hipótesis múltiples (tasa de falso descubrimiento de Benjamini y Hochberg).

Las listas de genes seleccionados son luego comparadas con listas de genes establecidas para las rutas y componentes celulares utilizando la prueba exacta de Fisher. Se utilizan diagramas de Venn para identificar los cambios génicos que son comunes entre los órganos diferentes. Se utilizan perfiles de expresión de genes altamente relevantes para encontrar genes con cambios correlacionados en puntos individuales del ensayo, utilizando diferentes métricas de distancia (estándar, Pearson).

La decisión para considerar un gen específico relevante se basa en una conjunción de cambios numéricos identificados por medio de filtración exploratoria y algoritmos estadísticos como se describió anteriormente y la relación con otros genes modulados que apuntan a un tema biológico común.

Se aplica un filtro sobre los datos brutos de la expresión del hipotálamo rostral de FGF23CTP a partir de un valor bruto de al menos 80,0 en al menos cuatro de las ocho condiciones.

Se hace una selección sobre las condiciones del tratamiento para el hipotálamo rostral de FGF23CTP con base en diferencias estadísticamente significativas con un corte del valor p de 0,05 y una corrección de las pruebas múltiples con base en la Tasa de Falso Descubrimiento de Benjamini y Hochberg. Esta restricción probó 5134 genes. Aproximadamente 5,0% de los genes identificados se esperaría que pasaran la restricción por casualidad.

Resultados. A nivel del ARN, es claro que el compuesto afecta genes clave que controlan la diferenciación celular y la proliferación, especialmente los factores de crecimiento y los receptores del factor de crecimiento. Los genes críticamente involucrados en angiogénesis se encuentran en diferentes órganos. Existe también un efecto de múltiples órganos sobre los transcritos para componentes del punto de control de ciclización del retinoblastoma. El hipotálamo rostral muestra los cambios más pronunciados especialmente para el transporte de proteínas y la citoarquitectura.

Una comparación cruzada de órganos analizados revela que FGF23CTP afecta las mismas rutas o rutas muy relacionadas y provoca efectos celulares similares. No se observan cambios bioquímicos o clínicos de rutina en los animales tratados. Sorprendentemente, no se observa efecto sobre el metabolismo del fosfato.

Las Tablas 3 a 6 muestran que a nivel del ARN FGF23CTP afecta genes clave que controlan la diferenciación y proliferación celular, especialmente factores de crecimiento y receptores del factor de crecimiento (Tabla 3). Los genes involucrados en forma crítica en angiogénesis se encuentra que están alterados en diferentes órganos después del tratamiento con FGF23CTP (Tabla 4). También existe un efecto de múltiples órganos sobre transcritos para componentes del punto de control de ciclización del retinoblastoma (Tabla 5). El hipotálamo rostral muestra los cambios más pronunciados especialmente sobre transcritos correspondientes a proteínas involucradas en transporte y citoarquitectura (Tabla 6).

En particular, FGF23CTP afecta diferentes moléculas que se ha descrito que desempeñan un papel en la patogénesis de la proliferación maligna de células gliales y precursores: Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Hoi Sang U et al., J. Neurosurg. 82: 841 - 846 (1995); Wu CJ et al., Oncogene 19: 3999 - 4010 (2000)), Bax (Streffer JR et al., J. Neurooncol. 56: 43 - 49 (2002); Martin S et al., J. Neurooncol. 52: 129 - 139 (2001)), conexina 43 (Huang

R et al., Cancer Res. 62: 2806 - 2812 (2002); Soroceanu L et al., Glia 33: 107 - 117 (2001)), PKR (Shir A & Levitzki A, Nature Biotechnology 20: 895 - 900 (2002)), neurofibromina (NF1) (Cichowski K & Jacks T, Cell 104: 593 - 604 (2001); Gutmann, DH et al., Hum. Mol. Genet. 10: 3009 - 3016 (2001)).

5 Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento. Se encuentran que diferentes familias de factores de crecimiento y receptores relacionados del factor de crecimiento incluidos receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y otras importantes moléculas de señalización extracelular para diferenciación celular y mantenimiento, como miembros de las proteínas morfogénicas óseas (BMP), transformación del factor de crecimiento (TGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de necrosis tumoral (TNF) son impactadas en más de un órgano por el tratamiento con FGF23CTP (Tabla 3).

10

Tabla 3

## Genes para Factores de Crecimiento y Receptores

Nombre del Gen	Órgano	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
		Control	FGF23CTP
Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)			
Receptor de activina A tipo II	ROHY	24.8 (20 a 32.6)	54.9 (37.2 a 78.7)
	Adrenal	20.6 (7.8 a 34.1)	58.5 (34.3 a 72.8)
	Retina	57.4 (48.2 a 70.6)	34.1 (27.7 a 38)
Proteína morfogenética ósea 10	Riñón	74.6 (68.9 a 79.7)	138.6 (114.9 a 172.3)
	Hígado	96.4 (92.3 a 103.3)	134.1 (108.8 a 152.6)
Proteína morfogenética ósea 1	Adrenal	131.1 (81.5 a 150.6)	210.6 (147.5 a 361.8)
Factor 1 de diferenciación del crecimiento	ROHY	866 (753.5 a 911.2)	1,410.2 (1,333.2 a 1,542.9)
Proteína morfogenética ósea 2A	Duodeno	121.3 (100.4 a 146.9)	55.3 (37.9 a 80.1)
Receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo II	Adrenal	64.6 (57.9 a 69.8)	101.25 (71.2 a 156.5)
Factor-1 de estimulación de colonias	ROHY	535.7 (470 a 598.2)	802.5 (667.6 a 884.5)
	Riñón	424.3 (316.1 a 576.8)	659.75 (574.5 a 870.1)
	Médula B	1,269.2 (934.5 a 1,493.8)	981.3 (782.2 a 1,091.5)
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	ROHY	156.5 (138.4 a 167)	103.1 (88.4 a 112.1)
Factor 1 de respuesta del EGF	Nodo AV	1,141.3 (1,044.4 a 1,317.9)	1,819.7 (1,641.5 a 2,170.2)
Proteína tirosina quinasa EPHB2v	ROHY	173.5 (119.8 a 204.5)	119.1 (113.2 a 121.8)
	Hígado	52.85 (35.2 a 64.7)	82.6 (61.6 a 95.6)

(continuación)

## Genes para Factores de Crecimiento y Receptores

Nombre del Gen	Órgano	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
		Control	FGF23CTP
		Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Receptor-1 del FGF	ROHY	669.9 (637 a 699.9)	932.4 (782.6 a 1,125.6)
	Timo	224.5 (209.1 a 248.5)	153.2 (133.2 a 169.6)
	Adrenal	521.3(482.8 a 599)	624.2 (559.4 a 721.9)
Receptor HRR-1 de Farnesol	Hígado	267.7 (259.6 a 276.4)	383.3 (342.5 a 460.8)
	Duodeno	28.3 (21.3 a 36.4)	53.1 (44.6 a 67.1)
Proteína 2 para enlazamiento con el factor de crecimiento tipo insulina	Nodo AV	1,371.2 (1,134 a 1,523.8)	880.75 (707.4 a 1,226.9)
	Hígado	5'840.5 (4'269.2 a 6'849.6)	3,858.6 (3,160.1 a 5'301.8)
	Retina	1,396.8 (723.4 a 2,068.7)	807.9 (506.4 a 1,143.3)
Factor I de crecimiento tipo insulina	Músculo	157.4 (115.9 a 179.9)	107.65 (83.5 a 140.1)
	Hígado	649.675 (429.7 a 879.7)	1,055.4 (838.1 a 1,331.6)
Proteína 1 para enlazamiento con el factor de crecimiento tipo insulina	Hígado	3,238.1 (2,346.3 a 3,807.7)	1,517 (105.7 a 2,449.4)
Factor II de crecimiento tipo insulina	Nodo AV	401.275 (359.7 a 462.2)	565275 (524.7 a 619.9)
	Hígado	426.5 (401.1 a 482.9)	606.9 (554 a 687.6)
	Médula B	295.4 (251.2 a 339.8)	209.5 (183.5 a 236.8)
Neuregulina 1	Riñón	66.3 (42.7 a 105.8)	150.725 (119.4 a 193.9)
	Hipocampo	125.4 (105.1 a 133.3)	86.075 (70.7 a 97.8)
Receptor-beta del retinoide X	ROHY	136.7 (120.7 a 154.4)	106.925 (84.4 a 139.5)
Receptor-gamma del retinoide X	Músculo	253.925 (193.1 a 285.1)	580.9 (391.3 a 704-5)
Factor de crecimiento transformante $\beta$ 2	Músculo	20.85 (20 a 23.4)	58.3 (39.3 a 66.9)
Factor de crecimiento transformante $\beta$ 3	ROHY	37.9 (20 a 65.6)	88.4 (77 a 104.1)

(continuación)

## Genes para Factores de Crecimiento y Receptores

Nombre del Gen	Órgano	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
		Control	FGF23CTP
		Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Receptor-2 del factor de necrosis tumoral	ROHY	70.3 (43.2 a 92.2)	126.4 (117.8 a 136.4)
Receptor-6 de muerte relacionada con TNFR	Re atrio	100.6 (93.7 a 109.3)	144.65 (123.9 a 175.5)
	ROHY	155.1 (128.2 a 181.7)	98.8 (69.1 a 137.3)
Receptor-3 de muerte relacionada con TNFR	Músculo	119.5 (92.9 a 133.6)	82.4 (43.2 a 104.5)

ROHY: hipotálamo rostral; Médula B: médula ósea; Nodo AV: Nodo atrio ventricular cardíaco (AV)

5

Angiogénesis/vasculogénesis. Los cambios de nivel del transcritto para genes específicamente involucrados en angiogénesis/vasculogénesis se encuentran en diferentes órganos de animales tratados con FGF23CTP (Tabla 4).

Tabla 4

## Genes para Angiogénesis

Nombre del Gen	Órgano	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
		Control	FGF23CTP
		Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Factor-A de crecimiento endotelial vascular (VEGFA)	ROHY	491 (431.1 a 570.1)	326.175 (309.6 a 366.3)
	Nodo AV	170.3 (106.6 a 234.9)	363.7 (302.7 a 506.7)
VEGFB	ROHY	484 (421.6 a 535.3)	626.2 (527.4 a 776.7)
Factor de crecimiento placentario	Músculo	45.6 (20 a 78.4)	91.4 (60.8 a 112.6)
Receptor tirosina quinasa 1 de FLT	Duodeno	30.1 (20 a 60.5)	70.7 (52.3 a 80.6)
	Nodo AV	56.5 (22.7 a 76.1)	120.1 (77 a 156.4)
Receptor tirosina quinasa de FLK1	Adrenal	57.1 (49 a 62.5)	42.7 (32.1 a 51)

10

(continuación)

## Genes para Angiogénesis

Nombre del Gen	Órgano	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
		Control	FGF23CTP
		Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Receptor 6 de diferenciación endotelial	Músculo	258.6 (215.2 a 328)	181.9 (167.9 a 199.7)
	Nodo AV	161.1 (111.6 a 188)	306.9 (251.2 a 365.4)
Receptor 4 de diferenciación endotelial	Médula Ósea	261.3 (214.2 a 356.9)	494.8 (355.9 a 700.9)
	Hígado	279 (227.2 a 361)	391.7 (347.7 a 453)
Inhibidor 2 de angiogénesis específico del cerebro	Retina	27.1 (20 a 38.2)	153.2 (82.2 a 201)
Inhibidor 1 de angiogénesis específico del cerebro (MASS)	ROHY	97.8 (82.8 a 118.8)	225.1 (169.2 a 283.8)
VE-cadherina	Adrenal	63.8 (46.7 a 86.3)	110.2 (108 a 113.8)
Angiopoyetina-1	Médula Ósea	198.6 (175.4 a 221.8)	123.2 (106.3 a 151.1)
	ROHY	235.7 (204.7 a 306.9)	162.5 (154.4 a 179.6)
Tirosina quinasa TEK, receptor de angiopoyetina	Médula Ósea	91.8 (67.1 a 106.3)	52.7 (33.3 a 63.7)

ROHY: Hipotálamo rostral; Nodo AV: Nodo atrio ventricular cardíaco (AV).

Ciclización: Punto de control del retinoblastoma. Los niveles de transcritos de los genes involucrados en el control del ciclo celular, especialmente aquellos genes involucrados en la transición de la fase G1 a la S, están afectados en diferentes órganos por el tratamiento con FGF23CTP (Tabla 5). En particular, se altera la expresión de estos genes secuencia arriba o secuencia debajo de la etapa de fosforilación del producto génico del retinoblastoma (Rb), una etapa principal de control secuencia abajo para proliferación inducida por el factor de crecimiento. FGF23CTP también afecta los niveles de transcritos para quinasa 4 que depende de ciclina y las ciclinas D2, D3 y E2 involucradas en la fosforilación de Rb. Un segundo nivel de control es movilizado también con inhibidores de ciclina quinasa como p19INK4D, p21CIP1 y p27Kip1. También se afecta el inhibidor de p53 y Rb, Mdm2. Los objetivos de la proteína retinoblastoma también están involucrados: E2F1, E2F2, E2F5 y su compañero de enlazamiento Dp-2.

Tabla 5

## Ciclización Celular

Nombre del Gen	Órgano	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
		Control	FGF23CTP
		Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Quinasa 4 dependiente de ciclina	ROHY	266 (240.1 a 283.7)	197.6 (167.6 a 231.7)

## ES 2 365 852 T3

Inhibidor p57KIP2 de Cdk (KIP2)	Duodeno	233.7 (212.1 a 251.9)	138.6 (114.9 a 172.3)
	Timo	312.7 (292 a 341.1)	247.9 (227.3 a 284.2)
p19 asociado con ciclina A/CDK2 p19 (Skp1)	ROHY	1349.8 (1,306.6 a 1,420.1)	1069.6 (902.3 a 1,278)
Ciclina D2	Retina	210.2 (172.2 a 233.2)	132 (96.2 a 171.5)
	ROHY	231.8 (201.1 a 248.6)	197.1 (182.7 a 203.9)
Ciclina D3	Músculo	182.4 (157.2 a 198.2)	149.2 (135 a 162)
Quinasa 5 dependiente de ciclina	Hipocampo	213.9 (172.3 a 254.7)	118.7 (96.6 a 162.3)
Ciclina E2	Médula Ósea	407 (367.4 a 491.4)	257 (175.2 a 294.8)
Ciclina I	Duodeno	1109.9 (1035.5 a 1157.2)	900.6 (758.7 a 1054.7)
E2F-1	Riñón	94 (51.9 a 150.9)	198.5 (135.8 a 263)
E2F-4	Músculo	888 (765.7 a 981.2)	643.8 (471.5 a 765.7)
	Hipocampo	208.7 (185.7 a 221.5)	153.4 (116.7 a 228.6)
	ROHY	812 (748.4 a 859.5)	245.9 (63.2 a 581.9)
	Riñón	505.6 (432.1 a 574.8)	741.6 (652.5 a 802.8)
E2F-5	Adrenal	53.9 (49.2 a 57.6)	39.6 (33.5 a 45)
Compañero 2 de dimerización de E2F (DP2)	Médula Ósea	2091 (1617.9 a 2735.1)	1222 (1021.1 a 1387.7)
Mdm2	Médula Ósea	40.925 (33.4 a 44.3)	20
Inhibidor p 19 de Cdk	ROHY	163.6 (148.6 a 194.9)	267.8 (243.2 a 314.2)
Inhibidor 1A p21 de Cdk (Cip1)	Adrenal	106.9 (85 a 125.1)	51.75 (20 a 96.8)
Proteína de enlazamiento p53 b	Músculo	269.35 (173 a 374.7)	138.7 (97.7 a 172)
	ROHY	217.5 (210.1 a 226.3)	154.7 (143.7 a 159.9)
Retinoblastoma 1	ROHY	255.9 (248.3 a 266.1)	467.9 (361.1 a 570)
Proteína 4 de enlazamiento de retinoblastoma	ROHY	361.1 (283.4 a 398.7)	164 (131.5 a 225.4)
Respuesta de fase S	ROHY	231.5 (199.8 a 270.3)	176 (159.8 a 205.6)
(relacionada con ciclina)	Re atrio	126.75 (100.7 a 146.9)	159.1 (153.4 a 168.9)
RalGDS/AF-6	ROHY	414.9 (390.1 a 439.7)	300.5 (284 a 313.9)
(inhibidor de Ciclina D1)		438.1 (392.6 a 520.8)	354.5 (335.8 a 369.9)

ROHY: Hipotálamo rostral

Hipotálamo rostral. El Hipotálamo rostral es el órgano con los cambios más pronunciados en los niveles de transcritos en animales tratados con FGF23CTP. La Tabla 6 refleja genes de rutas definidas y acciones celulares con los cambios más significativos en este órgano. En particular, los efectos sobre genes de citoarquitectura son especialmente pronunciados en tejidos cerebrales.

5

Tabla 6

## Genes del Hipotálamo Rostral

Nombre del Gen	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
	Control	FGF23CTP
	Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
<u>Receptores</u>		
Receptor de ácido retinoico	31.2 (26.8 a 41)	110 (100.9 a 122.8)
Receptor de Colecistoquinina A	87.1 (66.6 a 119.4)	196 (172.3 a 218.3)
Dentado 1	1 417.2 (402.1 a 437.7)	70.3 (20 a 161.9)
<u>Proteína quinasas</u>		
c-ab1	214.4 (187.3 a 252.5)	119.4 (103.4 a 127)
c-yes	116.65 (107.9 a 127.8)	64.7 (50.8 a 77.4)
c-raf	404.7 (370.8 a 458.7)	327.5 (281.6 a 356.9)
Pim1	487.7 (432.9 a 557.6)	327.5 (281.6 a 356.9)
FYN	1,086.1 (1,018.4 a 1,172.4)	958.1 (891.3 a 1,007.6)
Inducible por Interferón PKR	179.475 (162 a 192.7)	128.25 (112.1 a 140.9)
TYRO3	90.45 (78.7 a 106.8)	163.1 (134.7 a 179.5)
Axl	122.8 (112.4 a 140)	60.3 (34.7 a 89.4)
TrkB	108.6 (87.5 a 127.9)	40.8 (23.6 a 59.4)
Erk3	588.5 (551.5 a 679.4)	409.5 (370.5 a 482.7)
Fosfoinositida 3-quinasa	90.3 (78.2 a 111.9)	241.5 (215.7 a 289.2)
Glicógeno sintasa quinasa 3	70.4 (66.3 a 75.3)	155.5 (127.9 a 180.1)
JNK2	137.225 (122.2 a 159.8)	79.9 (64 a 95.2)
Proteína quinasa ribosomal B (RSK-B)	49.8 (35.4 a 74.5)	120 (90.4 a 141.8)
Janus quinasa 1	106.7 (88.9 a 136.3)	43.3 (20 a 64.7)
SFRS proteína quinasa 2	396.1 (369.5 a 420.3)	205.8 (180.3 a 249.6)

(continuación)

## Genes del Hipotálamo Rostral

Nombre del Gen	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
	Control	FGF23CTP
	Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Mnb (Minicerebro)	567.4 (561.4 a 571.6)	446 (410.2 a 477.2)
<u>Otras moléculas de señalización</u>		
Fosfoinositida-3-quinasa, catalítica, delta polipéptido	90.3 (78.2 a 111.9)	241.5 (215.7 a 289.2)
Activador de proteína RAS p21	243.9 (211.5 a 270)	163 (139.4 a 198.5)
STAT1	182 (171.2 a 188.5)	119.3 (110.6 a 134.5)
Calcineurina A1	410.5 (367.6 a 486.4)	173.975 (114.5 a 239.7)
14-3-3 proteína tau	2,110 (1,964.8 a 2,211.2)	1,748.5 (1,649.5 a 1,852)
Neurofibromina	78.6 (74.5 a 88.1)	144 (126.4 a 155.8)
Fosfodiesterasa 4B 123	(110.1 a 133.3)	60.6 (46.7 a 72.3)
Fosfolipasa C	125.9 (107.4 a 136.2)	72.1 (56.8 a 81)
<u>Factores de transcripción</u>		
Factor 1 alfa inducible por hipoxia	611.5 (515.7 a 745.1)	286.5 (223 a 339.5).1)
Proteína de enlazamiento de CREB	165.4 (160 a 176.9)	93 (82.4 a 100)
Jun D	4'882.5 (4'592.6 a 5'361.6)	6'499.1 (6'353.9 a 6'745.1)
Inhibidor del enlazamiento de AND 4	140.3 (113.3 a 157.9)	67.6 (55.9 a 72.7)
Represor del gen Bmi-1 homeobox	553.7 (513.6 a 599.8)	374.7 (352.6 a 410.4)
<u>Transporte de soluto</u>		
Ca <sup>2+</sup> -ATPasa	325.1 (274.6 a 401)	174.4 (130.8 a 247.5)
Intercambiador de sodio/hidrógeno	1,062.4 (1,039.5 a 1,095.9)	785.5 (743.4 a 851.2)
Intercambiador aniónico	627.1 (555.6 a 676.3)	844.5 (760.8 a 916.2)
Na, K-ATPasa	2,032.2 (1,743.5 a 2,239.6)	1,453.2 (1,246.3 a 1,736.8)



(continuación)

## Genes del Hipotálamo Rostral

Nombre del Gen	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
	Control	FGF23CTP
	Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Transportador de ácido siálico-CMP	265.8 (241 a 329.6)	135.075 (112.8 a 159.1)
<u>Transporte vesicular</u>		
RAB1	293.5 (246.9 a 320.3)	143.9 (93.8 a 214.9)
RAB5	1,266.2 (1,146.6 a 1,349)	809.8 (745.3 a 894)
RAB11A	554.8 (544.8 a 565.4)	344.9 (284.1 a 395.4)
RAB11B	182.3 (153.2 a 207.4)	71.2 (41.8 a 110.9)
RNP24	867.4 (809.5 a 903.7)	558.2 (486.3 a 642.9)
SNARE	140 (127.2 a 158.5)	55.4 (41.2 a 69.7)
Inhibidor beta de disociación de GDP	166.6 (156.5 a 173.4)	125.8 (104.1 a 142.6)
<u>NIPSNAP2</u>		
(glioblastoma co-amplificado)	212.9 (188.1 a 226.2)	118.7 a (88.9 172)
<u>Apoptosis</u>		
Proteína Nip3 de enlazamiento de Bcl-2	1,099 (1,056.1 a 1,135.1)	794.8 (709.9 a 841.2)
BAX	30.95 (20 a 57.2)	134.4 (75.2 a 171)
<u>Citoarquitectura</u>		
Tropomiosina 2 (beta)	20	131.6 (112.4 a 150.2)
Cadena liviana reguladora de miosina	328.5 (298.3 a 374)	177.2 (153.5 a 214)
Tropomiosina 4	72 (54.7 a 86.6)	140.6 (126.5 a 166.8)

(continuación)

Genes del Hipotálamo Rostral

Nombre del Gen	Grupo de tratamiento de 2 machos y 2 hembras	
	Control	FGF23CTP
	Nivel de expresión génica después de 2 semanas (promedio y rango)	
Pinina,	181.7 (164 a 203.2)	119.7 (108 a 131.5)
Proteína asociada con desmosoma		
Conexina 43	410.4 (321.4 a 446.4)	184.5 (132.2 a 265.8)
Delta 2 catenina	239.6 (178.9 a 281.2)	118 (103.9 a 146.9)
Reticulona 4	2,343.7 (2,019.1 a 2,516.7)	1,309.2 (1,126.2 a 1,645.4)
Molécula 1 de adhesión celular neural	428 (297.1 a 524.2)	988.6 (841.6 a 1,196)
Proteína precursora de beta amiloide	400 (351.1 a 435)	191.3 (161.2 a 218.8)
Proteína de enlazamiento 2 de (cola citoplasmática)		
<u>Mielinización</u>		
Glicoproteína de mielina de oligodendrocitos OMGP	1,144 (1,037.9 a 1,260.2)	773.5 (619.7 a 986)
Mielina de glicoproteína de oligodendrocitos NPD	176.8 (139.9 a 209.4)	62.7 (25.9 a 80.7)
Esfingomielinasa	585.5 (544.2 a 637.7)	259.5 (229.5 a 281.4)

5 Como se puede observar en la Tabla 7 (listas de genes por órgano), existen genes que representan estas rutas con cambios menos pronunciados en otros órganos. Los efectos sobre los genes que codifican para moléculas de transporte y moléculas de señalización intracelular se encuentran en la mayoría de los órganos. Los efectos sobre los genes de citoarquitectura son especialmente pronunciados en tejidos cerebrales. En la Tabla 7 se muestran los ID del grupo de sondas del chip de Affymetrix, el valor p, y la descripción génica de los 602 genes seleccionados.

Tabla 7

Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

1 37316_r_at	0.001189 3'	Fuente: oy31e07.x1 Tumor paratiroideo NbHPA de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1667460 similar a WP: F48E8.2 CE01954; secuencia de ARNm.
2 32841_at	0.001189	Fuente: gen para la proteína de enlazamiento de ácido nucleico humano, cds completo.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

3 32290_at	0.005998	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564L1916 (del clon DKFZp564L1916).
4 38035_at	0.005998	hMTMR6
5 38568_at	0.005998	Fuente: ARNm para la proteína de enlazamiento p54 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
6 33683_at	0.005998	Fuente: ARNm humano para TI-227H.
7 37995_s_at	0.005998	Fuente: gen 1 FMR-1 de retardo mental X Frágil humano, extremo 3', clones BC72 y BC22.
8 821_s_at	0.005998	Fuente: ARNm alfa del receptor de folato humano (hFR), cds parcial.
9 41562_at	0.005998	putativo
10 AFFX-	0.005998	Fuente: ARNm del factor de transcripción ISGF-3 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
HUMISGF3		
A/M97935_3_at		
11 1132_s_at	0.005998	Fuente: ARNm del receptor de ácido retinoico (gamma-7) de <i>Homo sapiens</i> .
12 38363_at	0.005998	Fuente: zd27g05.s1 NbHH19W de corazón fetal de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 341912 3' similar a PIR: S47066 S47066 proteína de dedo de zinc - humana; secuencia de ARNm.
13 32037_r_at	0.005998	Fuente: ARNm de la subunidad p14 de la proteína P de ribonucleasa de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
14 31879_at	0.005998	Fuente: ARNm para proteína 3 de enlazamiento de FUSE humano (FBP3), cds parcial.
15 38102_at	0.005998	Fuente: 51f12 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
16 193_at	0.005998	Fuente: ARNm del factor TAF1132 de activación transcripcional humano, cds completo.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

17 40246_at	0.005998	secuencias que codifican: repeticiones de homología d1g (DHR): DHR1 855..1118, DHR2 1143..1403, DHR3 1563..1826; dominio SH3 1935..2132; dominio 2331..2858 relacionado con guanilato quinasa
18 40453_s_at	0.005998	Miembro de la familia de los factores de empalme de pre-ARNm de proteína SR
19 35247_at	0.005998	Fuente: PT2, 1_13_A09.r ADNc 3' de <i>Homo sapiens</i> tumor 2, secuencia de ARNm.
20 39280_at	0.005998	rico en polileucina
21 36971_at	0.005998	Similar a una proteína de <i>C. elegans</i> codificada en el cósmido 27F2 (U40419)
22 39628_at	0.005998	Fuente: wb33e07.x1 NCI_CGAP_GC6 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2307492 3' similar a SW: RAB9_HUMAN P51151 PROTEÍNA RAB-9 RELACIONADA CON RAS; secuencia de ARNm.
23 41437_at	0.005998	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564F1123  (del clon DKFZp564F1123); cds parcial.
24 39167_r_at	0.005998	Fuente: ARNm humano para la proteína 2 de enlazamiento de colágeno, cds completo.
25 40467_at	0.005998	subunidad pequeña del citocromo b del complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa)
26 33831_at	0.005998	adaptador transcripcional
27 38694_at	0.005998	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0738, cds completo.
28 34644_at	0.005998	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para beta 2- microglobulina, cds completo.
29 34763_at	0.005998	familia SMC
30 40128_at	0.005998	similar a la proteína hipotética L8167.6 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
31 33109_f_at	0.00617	putativo

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

32 36972_at	0.007286	fracción microsomal
33 36576_at	0.007579	Fuente: ARNm histons macroH2A1.2 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
34 36868_at	0.007579	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23741 de <i>Homo sapiens</i> .
35 33359_at	0.007579	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína K1AA0768, cds parcial.
36 35094_f_at	0.007579	Fuente: ARNm del receptor 4 tipo inmunoglobulina de leucocito de <i>Homo sapiens</i> (LIR-4), cds completo.
37 40354_at	0.007579	miembro de la familia de proteína de choque térmico de 110 kDa (hsp110)
38 38318_at	0.00765	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586G051 (del clon DKFZp586G051).
39 36864_at	0.007879	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína Pex3.
4032171_at	0.008176	FACTOR 5 DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTA HUMANO
41 34393_r_at	0.008176	Rab1, variante de empalme
42 1117_at	0.008176	Fuente: ARNm de citidina desaminasa (CDA) de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
43 1191_s_at	0.008176	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la subunidad p44.5 de proteasoma 26S, cds completo.
44 33705_at	0.008176	putativo
45 37409_at	0.008458	similar a serina quinasa humana SRPK1, codificada por el Número de Acceso del GenBank U09564; específico para factores de empalme ricos en serina/arginina
46 949_s_at	0.008458	Subunidad 26S de proteosoma (prosoma, macropáina), ATPasa, 6
47 35642_at	0.008458	proteína de le membrana mitocondrial externa; se enlaza con metaxina 1, una proteína relacionada que participa en importación de proteína dentro de la mitocondria

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

48 35784_at	0.008458	proteína SNARE
49 34383_at	0.008458	Fuente: ARNm para hUBP de <i>Homo sapiens</i> para proteasa específica de ubiquitina, cds completo.
50 36691_at	0.008458	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para glutamina transaminasa K.
51 36542_at	0.008458	Fuente: ARNm del intercambiador 6 de sodio-hidrógeno de <i>Homo sapiens</i> (NHE-6), gen nuclear que codifica proteína mitocondrial, cds completo.
52 40631_at	0.008458	Fuente: ARNm humano para Tob, cds completo.
53 40605_at	0.008458	clasificación nexina 4
54 37350_at	0.008704	correspondencia: proteínas Q99795 Q91665 Q91664 009052 P78310 P97792 Q91667 060939 P54900 Q61148 Q62861 000426 P06907 P25189 Q92677 P20938 P27573 P10522 P37301 correspondencia: secuencia patentada I80040 con el apoyo de GENSCAN y FGENES
55 38687_at	0.009005	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp566D193  (del clon DKFZp566D193); cds parcial.
56 36546_r_at	0.009584	El codón de inicio no está identificado. El clon de ADNc hg04325 para KIAA0542 tiene una inserción de 933 pb entre 3296 - 3297, y una inserción de 187 pb entre 3368 - 3369 de la secuencia de KIAA0542
57 39767_at	0.009584	Fuente: ARNm humano para el gen KIAA0002, cds completo.
58 36110_at	0.009584	Fuente: ARNm para proteína de enlazamiento de GTP de <i>Homo sapiens</i> (RAB5), cds completo.
59 38093_at	0.009584	Fuente: Secuencia de ARNm del clon 23722 humano.
60 37826_at	0.009584	Fuente: Secuencia desconocida de ARNm de <i>Homo sapiens</i> .
61 32232_at	0.009584	Fuente: ARNm para CI-SGDH de la subunidad de NADH-ubiquinona oxidoreductasa de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
62 39544_at	0.009584	Fuente: ARNm humano para el gen para KIAA0353, cds parcial.
63 33399_at	0.009602	Fuente: z143c04.s1 NbHPU de útero preñado de Soares  Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> ADNc IMAGE: 504678 secuencia 3' de ARNm.
64 1085_s_at	0.009679	fosfolipasa C

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

65 34931_at	0.009679	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0940, cds completo.
66 39099_at	0.009679	componente COPII; isoforma A
67 AFFX-	0.009806	***ADVERTENCIA ALU: Secuencia de consenso de la subfamilia Alu-Sq humana.
hum_alu_at		
68 35734_at	0.009806	Fuente: wo97g09.x1 NCI_CGAP_Kid11 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2463328 3', secuencia de ARNm.
69 995_g_at	0.009839	Fuente: gen hR-PTPu de <i>H. sapiens</i> para proteína tirosina fosfatasa.
7038040_at	0.01011	x SF
71_37705_at	0.01011	Fuente: ARNm humano (ard-1), cds completo.
72 40893_at	0.010187	Fuente: ARNm de la subunidad beta de succinil-CoA sintetasa específica de ATP de <i>Homo sapiens</i> , cds parcial.
73 36980_at	0.010256	Fuente: ARNm para proteína B4-2 humana, cds completo.
74 1674_art	0.010419	proteína celular yes-I
75 39989_at	0.010453	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína ragB.
76 34905_at	0.010453	Fuente: oq24f02.s1 NCI_CGAP_GC4 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> ADNc IMAGE: 1587291 3' similar a TR:Q62643 Q62643 SUBUNIDAD KA2 DEL RECEPTOR DE GLUTAMATO. [1]; secuencia de ARNm.
77 31503_at	0.010453	Fuente: 50h7 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
78 38808_at	0.010453	Fuente: ARNm humano para antígeno de Mr 110.000, cds completo.
79 39923_at	0.010453	Fuente: wo84c08.x1 NCI_CGAP_Kid11 clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2462030 3', secuencia de ARNm.
80 32695_at	0.010685	Correspondencia con isoforma 2: proteína Q99991
81 36224_g_at	0.011036	Fuente: wf12b02.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2350347 3', secuencia de ARNm.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

82 36171_at	0.011036	Fuente: th60h07.x1 NCI_CGAP_Ov23 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2122717 3' similar a SW: COACTIVADOR P15 TRANSCRIPCIONAL DE ARN POLIMERASA II ACTIVADA CON P53999 HUMANA DE P15; secuencia de ARNm.
83 39598_at	0.011036	proteína de unión con brecha (aa 1 - 283)
84 33543_s_at	0.011036	proteína asociada con desmosoma; fosfoproteína
85 429_f_at	0.011036	Fuente: gen de beta-tubulina humana (5-beta) con diez miembros de la familia Alu.
86 36326_at	0.011036	Fuente: secuencia del gen NSCL-2 humano.
87 35767_at	0.011436	Fuente: tn20b01.x1 NCI_CGAP_Brn25 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2168137 3' similar a TR: O08765 008765 GEF-2; secuencia de ARNm.
88 34819_at	0.011497	Fuente: ARNm humano para MGC-24, cds completo.
89 40861_at	0.011497	Fuente: ARNm humano para KIAA0026 gene, cds completo.
90 34302_at	0.011497	Fuente: Factor humano de iniciación de traducción eIF3 p44 subunidad ARNm, cds completo.
91 34677_f_at Fuente:	0.011497	ARNm de <i>Homo sapiens</i> para TL132.
92 32744_at	0.011881	Fuente: DU3.2-7.G08.r DU-145 ADNc 5' de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
93 38010_at	0.012279	proteína pro-apoptótica mitocondrial
94 41651_at	0.012367	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA1033, cds parcial.
95 36991_at	0.012367	miembro de la familia de la proteína SR; dominio SR: (pb. 583..1529); dominios de enlazamiento de ARN: RNP-2 (pb. 57..80) y RNP-1 (pb. 150..173)
96 33107_at	0.012863	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0898, cds parcial.
97 35297_at	0.012932	Coactivador transcripcional tipo P15



(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

98 35999_r_at	0.012932	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0781, cds parcial.
99 40864_at	0.013006	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> , clon: P02ST9.
100 41178_at	0.013006	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína ribosomal L11.
101 1030_s_at	0.013006	encontrado en el clon resistente a la camptotecina CEM/C2
102 40854_at	0.013006	precursor de la proteína II nuclear
103 39382_at	0.013006	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0517, cds parcial.
104 32823_at	0.013006	Fuente: 51a1 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
105 39748_at	0.013006	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564D016 (del clon DKFZp564D016).
106 35005_at	0.013006	Fuente: ARNm de la nucleósido difosfato quinasa tipo 6 de <i>Homo sapiens</i> NM23-H6 (NM23-H6), cds completo.
107 32781_f_at	0.013006	Fuente: zk65d06.r1 NhHPU de útero preñado de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 487691 5', secuencia de ARNm.
108 38705_at	0.013006	Fuente: qo77c11.x1 NCI_CGAP_Kid5 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1914548 3' similar al PRECURSOR DEL RECEPTOR DE ENDOTELINA B (HUMAN); secuencia de ARNm
109 35838_at	0.013006	gb:S57283 similar a la proteína humana de dedo de zinc codificada por el Número de Acceso del Gen Bank M91592
110 185_at	0.013006	Antígeno Ri paraneoplásico
111 38738_at	0.013006	Proteína tipo ubiquitina
112 36588_at	0.13006	El clon de ADNc hk05647 para KIAA0810 tiene una inserción de 142 pb en la posición 1029 de la secuencia de KIAA0810.
113 36596_r_at	0.013006	Esta secuencia proviene de la Fig. 4
114 1537_at	0.013006	Fuente: ARNm humano para el precursor del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

115 31881_at	0.013154	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína Hmob33, región no traducida 3'.
116 33440_at	0.013327	Fuente: ARNm para proteína ZEB dedo de zinc de dos manos humana, cds parcial.
117 37359_at	0.013357	Fuente: ARNm humano para el gen para KIAA0102, cds completo.
118 35681_r_at	0.013357	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0569, cds completo.
119 34381_at	0.013357	Fuente: as86g01.x1 Clon HPLRB7 de colon de Barstead de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2335632 3' similar a gb: PRECURSOR DEL POLIPÉPTIDO VIIC DE CITOCROMO OXIDASA X16S60 (HUMANO); secuencia de ARNm.
120 192_at	0.013357	Fuente: ARNm para TFIID subunidad TAFII55 humana (TAFII55), cds completo.
121 41547_at	0.013381	terminal amino similar a la proteína codificada por el Número de Acceso del GenBank AF047473; estructuralmente similar a la proteína Rael de <i>Homo sapiens</i> codificada por el Número de Acceso del GenBank U84720; similar a la proteína de <i>Mus musculus</i> codificada por el Número de Acceso del GenBank U67327; contiene el motivo de repetición WD40, también llamado rpassp, repetición G-beta; enlaza al dominio del terminal C de la BUB1 I quinasa <i>in vitro</i>
122 31850_at	0.013494	Fuente: ARNm para gamma-glutamil cisteína sintetasa humana (GCS), cds completo.
123 36660_at	0.013702	GTPasa
124 40588_r_at	0.013889	Fuente: ARNm para proteína p18 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
125 36585_at	0.014379	Fuente: ARNm del factor 4 humano de ADP-ribosilación (ARF4), cds completo.
126 39388_at	0.014587	Fuente: ok71f11.s1 NCI_CGAP_GC4 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1519437 3', secuencia de ARNm.
127 38971_r_at	0.014994	HIV-1, factor 1 beta asociado con Nef

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

128 32335_r_at	0.015192	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para poliubiquitina UbC, cds completo.
129 725_i_at	0.015192	
130 40122_at	0.015227	proteína 1 asociada con NS1
131 38908_s_at	0.015746	Región 3' no empalmada de ADN polimerasa zeta
132 35709_at	0.015746	Fuente: clon 23923 de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
133 31936_s_at	0.015746	El codón de inicio no está identificado. El clon de ADNc hh01734 para KIAA0430 tiene una supresión de 61 pb en la región de 3167 a 3227 de la secuencia de KIAA0430
134 40146_at	0.016164	ARNm humano para proteína Rap1B
135 34231_at	0.016164	enlaza la subunidad grande (ORC I L) del origen del complejo de reconocimiento (ORC)
136 38375_at	0.016327	Fuente: ARNm para esterasa D de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
137 35727_at	0.016387	Fuente: qj64d06.x1 NCI_CGAP_Kid3 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1864235 3' similar a WP:F19B6.1 CE05666 URIDINA QUINASA; secuencia de ARNm.
138 34532_at	0.016387	Fuente: clon 23705 de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
139 35969_at	0.016529	Fuente: yx67h12.s1 melanocito 2NbHM de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 266855 3', secuencia de ARNm.
140 41635_at	0.017145	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0105, cds completo.
141 35221_at	0.017213	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para la región no traducida 3' extendida alfa pur.
142 33456_at	0.017213	Fuente: ARNm para EB1 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
143 41866_s_at	0.017213	miembro de la familia del gen de la distrofina
144 39733_at	0.017293	similar al producto KIA0025 de <i>Homo sapiens</i> codificado por el Número de Acceso del GenBank D14695

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

145 35826_at	0.017369	Fuente: ARNm del factor de transcripción Tat-CT1 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
14633178_at	0.017509	similar a la proteína Jagged1 de <i>R. norvegicus</i>
147 35329_at	0.017509	similar a ORF YIL043C/CBR1/CBR5/CBR de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
148 35271_at	0.017509	una de las siete subunidades del complejo de proteína Arp2/3; proteína relacionada con actina
14939722_at	0.011509	Fuente: ARNm para N-Cor co-represor del receptor nuclear de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
150 39740_g_at	0.017509	Fuente: ARNm para NAC alfa de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
151 38086_at	0.017509	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0466, cds parcial.
152 940_g_at	0.017509	neurofibrómico 1 (neurofibromatosis, enfermedad de von Recklinghausen, enfermedad de Watson)
153 37928_at	0.017509	Fuente: af53a04.s1 Nh2HF8_9w fetal total de Soares Clon ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1035342 3' similar a gb: X59710 SUBUNIDAD A DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE ENLAZAMIENTO DE CCAAT (HUMANA); secuencia de ARNm.
154 40852_at	0.017509	similar a <i>Drosophila tudor</i>
155 35786_at	0.017509	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0476, cds completo.
156 1039_s_at	0.017509	factor de transcripción básico de hélice-bucle-hélice
157 37010_at	0.017509	Fuente: qf76b12.x1 NbHL19W de pulmón fetal de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1755935 3' similar a SW: CADENA GAMMA DEL FACTOR IIA HUMANO DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN P52657 DE T2AG; secuencia de ARNm.
158 1772_s_at	0.017509	Fuente: ARNm de la subunidad alfa de la proteína transferasa de farnesilo humana, cds completo.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

159 38485_at	0.017509	Fuente: nz14h07.s1 NCI_CGAP_GCB1 Clon de ADNc de Homo sapiens IMAGE: 1287805 3', secuencia de ARNm.
160 32752_at	0.017509	Fuente: zd65e10.s1 NbHH19W de corazón fetal de Soares Clon de ADNc de Homo sapiens IMAGE: 345546 3' similar a  SW: SUBUNIDAD B14.5A DE Q05752 NADH-UBIQUINONA OXIDOREDUCTASA DE N4AM; secuencia de ARNm.
161 37900_at	0.017509	proteína de la membrana
162 38648_at	0.017682	contiene repetición de leucina
163 33438_at	0.0178	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564D012 (del clon DKFZp564D012).
164 38277_at	0.0178	calcineurina A1
165 39601_at	0.0178	RDA32; similar a norel
166 36641_at	0.0178	similar a la isoforma alfa2 de pollo
167 33873_at	0.017874	Proteína nuclear con capacidad para enlazar ADN
168 37740_r_at	0.018039	Proteína portadora de ADP/ATP
169 32210_at	0.018039	Fuente: ARNm de fosfoglucomutasa 1 humana (PGM1), cds completo.
170 32998_at	0.019081	Fuente: ARNm del receptor de colecistoquinina A humana, cds completo.
171 38470_i_at	0.019104	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0228, cds parcial.
172 36627_at	0.019304	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína tipo hevin.
173 32183_at	0.019304	El producto génico es de 54 kDa pero migra en forma aberrante sobre geles de SDS como una proteína de 70 kDa; En células de mamífero, la proteína se co-localiza con muchos componentes de la maquinaria de empalme de premARN en el núcleo.
174 32597_at	0.019304	Fuente: ARNm p130 de <i>H. sapiens</i> para proteína de 130K.
175 33912_at	0.019346	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para enzima 1 que convierte proteína famesiladas.
176 36112_r_at	0.019346	Fuente: Gen para PR264 de <i>H. sapiens</i> .

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

177 40125_at	0.019346	Fuente: Proteína integral de la membrana de <i>Homo sapiens</i> , calnexina, (IP90) ARNm, cds completo.
178 1446_at	0.019389	subunidad C3 del proteasoma
179 38702_at	0.019389	Fuente: clon 24781 de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
180 39762_at	0.019389	Fuente: ARNm para KIAA0425 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
181 36860_at	0.01939	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA1064, cds parcial.
182 409_at	0.01939	Fuente: ARNm humano para proteína 14.3.3, una proteína reguladora de quinasa.
183 731_f_at	0.019479	
184 31526_f_at	0.019479	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para oncogén tre (clon 213).
185 36975_at	0.019479	Fuente: 34d2 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
186 41418_at	0.019479	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0821, cds completo.
187 38542_at	0.019479	Fuente: gen para fosfoproteína de nucleofosmina (NPM) de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de flaqueo 3'.
188 37994_at	0.019479	producto proteínico sin nombre
189 32574_at	0.019479	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para esfingomielinasa.
190 33094_s_at	0.019479	Fuente: wq32a03x1 NCI_GCAP_GC6 <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2472940 3' similar a TR: Q1515 QI3515 PROTEÍNA DE FILAMENTO MOLDEADA CP49. secuencia de ARNm.
191 36408_at	0.019479	Fuente: ARNm para ORCTL4 de <i>Homo sapiens</i> para transportador tipo 4 de catión orgánico, cds completo.
192 33740_at	0.019673	Fuente: clk2 quinasa de <i>Homo sapiens</i> (CLK2), genes para propina 1, cote1, glucocerebrosidasa (GBA), y metaxina, cds completo; gen para metaxina pseudógena y glucocerebrosidasa pseudógena; y trombospondina3 (THBS3), cds parcial.
193 40074_at	0.020159	polipéptido precursor (AA -29 a 315)

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

194 34829_at	0.020183	proteína nucleolar; similar a Cbf5p de levadura
195 41474_at	0.020183	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para quinesina-2.
196 35355_at	0.020183	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0890, cds completo.
197 39677_at	0.020183	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0186, cds completo.
198 39346_at	0.020223	Fuente: ARNm de p62 humana, cds completo.
199 1448_at	0.020223	subunidad C8 de proteasoma
200 32710_at	0.020223	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para canales de potasio sensibles al voltaje cerrado, subunidad beta.
201 887_at	0.020223	ORF
202 33847_s_at	0.020223	Fuente: qo19f03.x1 NCI_CGAP_Lu5 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1908989 3', secuencia de ARNm.
203 38431_at	0.020243	Fuente: ARNm para proteína quinasa humana (JNK2), cds completo.
204 37785_at	0.020243	Fuente: U69563 INIB de cerebro infantil de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> 25050, secuencia de ARNm.
205 39856_at	0.020243	Fuente: at02f03.x1 HPLRB6 de aorta de Barstead Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2353949 3' similar a gb: PROTEÍNA ROBOSOMAL M15661 60S LA4 (HUMANA); secuencia de ARNm.
206 766_at	0.020243	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la isoforma de galectina-9, cds completo.
207 37569_at	0.020243	Fuente: ARNm para proteína de enlazamiento de calcio de <i>Homo sapiens</i> (ALG- 2), cds completo.
208 34312_at	0.020243	Fuente: oy33a12.x1 NbHPA de tumor paratiroideo de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1667614 3', secuencia de ARNm.
209 40083_at	0.020243	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0625, cds parcial.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

210 40832_s_at	0.020283	gran similitud con el polipéptido 1C asociado con lámina de rata
211 1696_at	0.020317	Fuente: ARNm humano para ADN polimerasa beta, cds completo.
212 39136_at	0.020317	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para sensible 1 al estrés oxidativo, cds completo.
213 34808_at	0.020317	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0999, cds parcial.
214 33433_at	0.020449	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564F0522 (del clon DKFZp564F0522).
215 1663_at	0.020494	
216 32803_at	0.020494	expresión elevada en células en división 786-0 comparado con células confluentes 786-0
217 34454_r_at	0.020507	apolipoproteína
218 33247_at	0.020554	homóloga humana de pad1 de fisión de levadura
219 41606_at	0.020554	regulada por desarrollo
220 34478_at	0.020641	Fuente: ARNm para YPT3 de <i>H. sapiens</i> .
221 34306_at	0.020641	Fuente: ARNm para KIAA0428 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
222 36295_at	0.020641	Fuente: ARNm para proteína ZNF134 humana de dedo de zinc, cds completo.
223 35656_at	0.020641	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína RING-H2 RNF6, exón 1a alternativo.
224 36935_at	0.020832	proteína para activación de GTP-asa ras p21 (GAP)
225 37620_at	0.020832	TAF1120; contiene homología con histona H2B; subunidad TFIID
226 1848_at	0.020832	Fuente: ARNm para proteína humana relacionada con ras (Krev-1), cds completo.



(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

227 35818_at	0.021007	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para citocromo c, cds parcial.
228 39180_at	0.021107	translocada en liposarcoma
229 39792_at	0.021292	hnRNP R
230 34063_at	0.021292	Fuente: ARNm RecQ5 de <i>Homo sapiens</i> para ADN helicasa, cds completo.
231 1998_i_at	0.021292	esta secuencia es una nueva variante de empalme llamada BAX delta en la cual se suprime el exón 3 y se empalmen los exones 2 y 4 entre sí
232 33614_at	0.021292	producto proteínico sin nombre
233 36456_at	0.021292	Similitud con PRTI de <i>A. thaliana</i>
234 36926_at	0.021292	Fuente: ARNm para ERK3 de <i>H. sapiens</i> .
235 33849_at	0.021292	Fuente: ARNm del factor potenciador de células pre-B humanas (PBEF), cds completo.
236 32624_at	0.021292	fuerte similitud con 1/2 de rata tulipán
237 38974_at	0.021292	Fuente: ARNm de la subunidad reguladora de la proteína de enlazamiento de ARN de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
238 36754_at	0.021292	Fuente: gen de <i>H. sapiens</i> PACAP para el polipéptido que activa la adenilato ciclasa.
239 40637_at	0.021292	Fuente: gen hsc70 humano para proteína del cognato de choque térmico de 71 kd.
240 32565_at	0.021292	A diferencia de BAF60a y BAF60b este gen es altamente expresado en células de músculo; similar a BAF60a, BAF60b, BAF60c humano y SWP73 y SWP73b de levadura
241 36822_at	0.021292	proteína putativa para enlazamiento de ARN; similar a FUS/TLS y EWS humanas
242 38099_r_at	0.021356	Fuente: ARNm para acil-CoA sintetasa 4 (ACS4) de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

243 31536_at	0.021356	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0886, cds completo.
244 36196_at	0.021356	Fuente: ARNm para fosfofructoquinasa humana (PFKM), cds completo.
245 36459_at	0.021356	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0879, cds completo.
246 40423_at	0.021356	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0903, cds parcial.
247 32879_at	0.021356	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586L111 (del clon DKFZp586L111).
248 39389_at	0.021356	Fuente: ARNm para el antígeno CD9 humano, cds completo.
249 33368_at	0.021356	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína tipo proteasa Lon.
250 41127_at	0.021356	2 sitios potenciales de glicosilación enlazados a N en los residuos 201 y 206; codón de detención en el marco 24 pb secuencia arriba del iniciador de metionina
251 38443_at	0.021356	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23721 humano.
252 297_g_at	0.021356	
253 37392_at	0.021356	subunidad beta
254 32205_at	0.021356	proteína para interacción con PKR
255 32665_at	0.02145	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína fosfatasa 2C (beta).
256 39018_at	0.02145	GSH-transferasa; GSH-peroxidasa
257 35839_at	0.021826	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para escualeno epoxidasa, cds completo.
258 32215_i_at	0.021876	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0878, cds completo.
259 329_s_at	0.022103	

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

260 33027_at	0.022103	Fuente: 39d11 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
261 381_s_at	0.022103	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para fosfoinositida 3-quinasa.
262 38972_at	0.022103	Fuente: secuencia de ARNm del clon 24775 de <i>Homo sapiens</i> .
263 37668_at	0.022175	Fuente: Factor de empalme SF2p32 pre-ARNm humano, secuencia completa.
264 37868_s_at	0.022178	MOG-25.6kD
265 38809_s_at	0.022233	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0519, cds completo.
266 810_at	0.022455	similar al factor de intercambio Dbl y a pleckstrina
267 1612_s_at	0.022455	Fuente: ARNm de junD humana.
268 36981_at	0.022455	Fuente: secuencia de ARNm del clon 24452 de <i>Homo sapiens</i> .
269 40570_at	0.022455	Fuente: ARNm para proteína Forkhead (FKHR) de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
270 36536_at	0.022475	Fuente: ARNm desconocido del clon 24732 de <i>Homo sapiens</i> , cds parcial.
271 38801_at	0.022475	Fuente: wg46h09.x1 Soares_NSF_F8_9W_OT_PA_  P_SI Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2368193 3' similar a TR:075453 075453 PROTEÍNA ASOCIADA CON VAMP DE 33 KDA, secuencia de ARNm
272 35777_at	0.027475	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína dedo de zinc, cds completo, clon: RES4-26
273 38254_at	0.022475	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína la KIAA0882, cds parcial.
274 38075_at	0.022475	Fuente: ARNm para tr-Spl de <i>H. sapiens</i> .
275 34192_at	0.022475	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0532, cds parcial.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

276 41212_r_at	0.022485	Fuente: ARNm humano para el gen para KIAA0038, cds parcial.
277 31510_s_at	0.023142	Fuente: gen para hH3.3B de <i>H. sapiens</i> para histona H3.3.
278 32667_at	0.023142	Fuente: ARNm para colágeno alfa-5 tipo IV (COL4A5), extremo 3'.
279 41536_at	0.023264	correspondencia: proteínas P47928 P41139 Q13005
280 34387_at	0.023264	similar al producto putativo codificado en el cósmido de <i>C. elegans</i> C01C10.
281 36042_at	0.023264	Fuente: ARNm para trkB de <i>H. sapiens</i> para proteína tirosina quinasa.
282 38357_at	0.023264	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564D156 (del clon DKFZp564D156).
283 36118_at	0.023264	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para el co-activador 1e del receptor esteroideo.
284 34680_s_at	0.023336	Fuente: ARNm humano para el gen para KIAA0107, cds completo.
285 31962_at	0.023449	Fuente: ARNm para proteína L37a ribosomal de <i>Homo sapiens</i> (RPL37A), cds completo.
286 33158_at	0.023449	Fuente: ARNm para síndrome de Kallmann (KAL) de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
287 35184_at	0.023449	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0546, cds parcial.
288 35083_at	0.023449	similar a SW:GOLI_DROME Q06003 PROTEÍNA GOLIAT
289 32531_at	0.023449	proteína de unión con brecha (AA 1 - 382)
290 37038_at	0.023449	Fuente: gen PXMP1 de <i>H. sapiens</i> , exón I (y CDS unido).
291 35750_at	0.023449	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564K0222 (del clon DKFZp564K0222).

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

292 41823_at	0.023581	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína staufen, parcial.
293 1970_s_at	0.023697	Fuente: H. sapiens FGFR2 ARNm.
294 36488_at	0.023982	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para MEGF9, cds parcial.
295 33666_at	0.024001	proteína C
296 39150_at	0.024001	Fuente: U69559 1NIB de cerebro de infante de Soares Clon de ADNc 26077 de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
297 471_f_at	0.024001	isotipo clase III; beta-3
298 33118_at	0.024016	concuerta con U03056 (PID: g532974); H_LUCA14.3
299 36988_at	0.024016	Fuente: ARNm para proteína B12 humana, cds completo.
300 32039_at	0.024096	similar al antígeno beta-NAP de degeneración del cerebelo y a las subunidades beta-1-adaptina y beta-2-adaptina de complejos asociados con clatrina
301 37040_at	0.024109	El producto génico ha1225 está relacionado con alfa-glucosidasa humana.
302 36845_at	0.024145	El producto génico KIAA0136 es nuevo.
303 1636_g_at	0.024172	ABL es el proto-oncogén homólogo celular del virus de leucemia de múrido de Abelson y está asociado con la translocación cromosómica t9:22 con el gen BCR en leucemia mielógena crónica y linfoblástica aguda; empalme alternativo usando el exón 1a
304 38710_at	0.024734	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564E242 (del clon DKFZp564E242).
305 37914_at	0.024734	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0305, cds completo.
306 34355_at	0.024895	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína 2 de enlazamiento de metil-CpG.
307 1311_art	0.024965	Fuente: ARNm humano para la subunidad HsN3 del proteasoma, cds completo.
308 35294_at	0.024965	subunidad de 60 kd del autoantígeno de ribonucleoproteína
309 32313_at	0.025167	tropomiosina fibroblástica

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

310 33082_at	0.025167	Fuente: Precursor alfa 10 de la subunidad de integrina de <i>Homo sapiens</i> , ARNm, cds completo.
311 33821_at	0.025167	correspondencia: proteínas: Tr:Q9Y3M0 Tr:Q9WU14 Sw:P39540 Tr:Q9Y396
312 35232_f_at	0.025167	Fuente: oz26h05.x1 Nb2HF8_9w fetal total de Soares  Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1676505 3' similar a SW: CATR_GIALA Q24956 CALTRACTINA; secuencia de ARNm.
313 37663_at	0.025167	Fuente: Gen para DDX1 de <i>Homo sapiens</i> , CDS completo.
314 612_s_at	0.025167	2',3'-ciclico-nucleótido 3'-fosfodiesterasa (EC 3.1.4.37)
315 36164_at	0.025167	similar al componente dihidroliponamida acetiltransferasa de <i>Ratins norvegiens</i> (E2) del complejo piruvato deshidrogenasa: Número de Acceso al Swiss Prot P08461
316 38805_at	0.025167	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína TGIF.
317 07710_f_at	0.025182	Ribonucleoproteína tipo D nuclear heterogénea
318 34304_s_at	0.025556	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc  DKFZp586G1923 (del clon DKFZp586G1923).
319 34783_s_at	0.025678	similar al terminal amino con la proteína codificada por el Número de Acceso del GenBank AF047472; estructuralmente similar a la proteína Rael de <i>Homo sapiens</i> codificada por el Número de Acceso del GenBank U84720; similar a la proteína de <i>Mus musculus</i> codificada por el Número de Acceso del GenBank U67327; contiene el motivo de repetición WD40, también llamado trasp, repetición G-beta; enlaza BUB1 quinasa
320 37575_at	0.025678	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586C1723 (del clon DKFZp586C1723).
321 39755_at	0.025678	correspondencia: proteínas: Sw:P17861 Tr:O35426
322 37307_at	0.025678	subunidad alfa de la proteína G (AA 1 - 355)
323 36946_at	0.025684	gen homólogo humano de <i>Drosophila mnb</i> (minicerebro)
324 34425_at	0.025684	no contiene dominio alfa 3

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

325 40347_at	0.025788	Fuente: o139a08.s1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1525814 3' similar al elemento que contiene al elemento repetitivo L1; secuencia de ARNm.
326 32402_s_at	0.025992	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para simplekina.
327 32235_at	0.026262	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0544, cds parcial.
328 41063_g_at	0.02649	Fuente: zc52c04.r1 NbHSF de fibroblastos senescentes de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 325926 5' similar a la SW: PROTEÍNA DE ENLAZAMIENTO BMI-1 [1] DE ADN DE P25916 DE RATÓN BMI1; secuencia de ARNm.
329 33373_at	0.026577	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564O0122 (del clon DKFZp56400122).
330 34647_at	0.026577	proteína p68 (AA 1 - 614)
331 32240_at	0.026673	Fuente: ARNm humano para el gen para KIAA0072, cds parcial.
332 37324_at	0.026673	receptor putativo de transferrina (aa 1 - 760)
333 36337_at	0.02682	Fuente: wi67f11.x1 NCI_CGAP_Kid12 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2398413 3' similar a TR: O75257 075257 R31180_1; contiene el elemento repetitivo TAR1 .t1 TAR1; secuencia de ARNm.
334 33447_at	0.02682	cadena liviana del regulador de miosina
335 39373_at	0.026839	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23716 de <i>Homo sapiens</i> .
336 32844_at	0.026839	eIF4GI
337 31509_at	0.026839	Fuente: ARNm para BBCI de <i>H. sapiens</i> .
338 35246_at	0.026839	Fuente: ARNm del receptor de tirosina quinasa humana (DTK), cds completo.
339 31853_at	0.026839	proteína del grupo polycomb; homóloga de <i>Drosophila esc</i> (extra sex combs); EED
340 37619_at	0.026839	el producto génico KIAA0094 está relacionado con metionina aminopeptidasa de <i>S. cerevisiae</i> .
341 35790_at	0.026839	Fuente: ARNm homólogo de H beta 58 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.

## ES 2 365 852 T3

(continuación)

### Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

342 32730_at	0.027032	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564H142 (del clon DKFZp564H142).
343 226_at	0.027032	Fuente: ARNm de la subunidad I-alfa de proteína tipo quinasa que depende de cAMP humana (PRKAR1A), cds completo.
344 37424_at	0.027032	homólogo de la vara enrollada en espiral de a-hélice
345 38982_at	0.027032	Fuente: 53g9 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
346 32504_at	0.027032	Fuente: wu69c05.x1 NCI_CGAP_Kid3 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2525288 3', secuencia de ARNm.
347 41463_at	0.027032	Fuente: DKFZp434B0222_s1 434 (sinónimo: htes3) Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> DKFZp434B0222 3', secuencia de ARNm.
348 35759_at	0.027088	similar a la subunidad beta TCP-1 que contiene chaperonina de ratón
349 168_at	0.027139	Fuente: ARNm para adenosina quinasa humana, cds completo.
350:35140_at	0.027139	Fuente: yh11b03.s1 1NIB de cerebro de infante de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 42880 3', secuencia de ARNm.
351 36580_at	0.027139	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M141  (del clon DKFZp586M141).
352 40387_at	0.027139	similar a vzg-1 de ratón
353 38657_s_at	0.027139	cadena liviana a de clatrina
354 33110_at	0.027139	Fuente: qy22a10.x1 NCI_CGAP_Brn23 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 201 2730 3' similar a la PROTEÍNA (HUMANA) SOX-10 gb: X71136; secuencia de ARNm.
355 36948_at	0.027261	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; clon del inserto de ADNc de longitud completa EUROIMAGE 45620.
356 34354_at	0.027592	putativo
357 40779_at	0.027592	Proteína asociada con Smg GDS que tiene repeticiones de brazos y fosforiladas por tirosina quinasa Src



(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

358 39072_at	0.027634	Fuente: ARNm para MXI1 humana, cds completo.
359 1179_at	0.027634	
360 35768_at	0.027634	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0661, cds completo.
361 37373_at	0.027634	similar a uridina difosfoglucosa pirofosforilasa en hígado humano, Número de Acceso del Swiss-Prot Q07131; el 5'UTR y 3'UTR de este clon son completamente diferentes de aquellos de la forma del hígado
362 41338_at	0.027634	Fuente: wx39f10.x1 NCI_CGAP_Pit1 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2546059 3', secuencia de ARNm.
363 35837_at	0.027634	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína 1 sensible a tembladera.
364 1675_at	0.027634	proteína que activa ras p21 GTP-asa (GAP)
365 37395_at	0.027634	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para ATPasa vacuolar, cds completo.
366 41759_at	0.027634	Fuente: ARN de <i>H. sapiens</i> para proteína tipo factor de alargamiento de ARN polimerasa II.
367 36046_at	0.027634	similitud con SPAC2F3.16
368 35468_at	0.027854	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586B2023 (del clon DKFZp586B2023).
369 35403_at	0.028018	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA1094, cds completo.
370 38676_at	0.028018	Fuente: z196e07.r1 Estroma corneal de Stratagene (#937222) Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 512484 5', secuencia de ARNm.
371 1318_at	0.028018	Fuente: ARNm para RbAp48 de <i>H. sapiens</i> que codifica la proteína de enlazamiento de retinoblastoma.
372 33170_at	0.028018	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0962, cds parcial.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

373 38190_r_at	0.028018	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0645, cds completo.
374 35218_at	0.028018	proteína relacionada con apoptosis
375 41528_at	0.02862	Fuente: zd62h08.s1 NbHH19W de corazón fetal de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 345279 3', secuencia de ARNm.
376 37666_at	0.02862	Fuente: ARNm humano para la subunidad X del proteasoma, cds completo.
377 37229_at	0.02862	similar a FRAP, Mec1p, Tor1p, Tor2p, y ATM
378 38943_at	0.028882	putativo
379 1074_at	0.028882	Fuente: ARNm para proteína de enlazamiento de GTB (RAB1) de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
380 1942_s_at	0.028882	Quinasa 4 dependiente de ciclina
381 411_i_at	0.029002	Fuente: Gen 1 - 8D humano de la familia de genes inducible por interferón.
382 32669_at	0.029424	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0671, cds completo.
383 37543_art	0.029842	esta secuencia se superpone a D13631, cubre 954..4359 de esta secuencia.
384 34845_at	0.029842	el resto del gen en el clon 549K18 (AL023654)
385 38817_at	0.029842	Fuente: ARNm para la proteína acrosomal de esperma de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
386 41825_at	0.029966	Fuente: 34c6 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
387 41850_s_at	0.030352	aislada en una selección de híbrido doble para identificar proteínas celulares que interactúan con antígeno delta de hepatitis; similar al antígeno delta de hepatitis, y tiene dos regiones predichas para formar dominios de interacción de proteína enrollada en espiral

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

388 40480_s_at	0.0309	protooncogén c-syn; pertenece a la familia de la proteína tirosina quinasa de oncogenes retrovirales
389 1463_at	0.0309	Fuente: ARNm de proteína tirosina fosfatasa humana (PTPPEST), cds completo.
390 AFFX-HUMISGF3 A/M97905_MB_at	0.0309	Fuente: ARNm del factor de transcripción ISGF-3 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
39L 37774_at	0.0309	Fuente: wj88e02.x1 NCI_CGAP_Lym12 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2409914 3' similar a SW: SUBUNIDAD 5 DE PROTEÍNA BETA DE ENLAZAMIENTO DEL NUCLEÓTIDO GUANINA 014775 HUMANO DE GBB5, secuencia de ARNm.
392 38832_r_at	0.0309	M11319; secuencia 7q22 de cromosoma de <i>Homo sapiens</i> , secuencia completa.
393 33722_at	0,031224	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0548, cds parcial.
394 36107_at	0.031626	Fuente: ak04e09.s1 NbHPA de tumor paratiroideo de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1405000 3' similar a gb: M37104 ATP FACTOR 6 DE ACOPLAMIENTO DE SINTASA, PRECURSOR MITOCONDRIAL (HUMANO); secuencia de ARNm.
395 39736_at	0.031702	Proteína G25K de enlazamiento de GTP
396 38069_at	0.032016	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína de canal de cloruro CLC-7.
397 556_s_at	0.032345	Fuente: gen número 4 clase mu de glutatona transferasa (GSTM4) humana, cds completo.
398 38336_at	0.032745	El clon de ADNc hj06791 para KIAA1013 tiene una supresión de 4 pb en la posición entre 1855 y 1860 de la secuencia de KIAA1013.
399 33913_at	0.032745	Transcripto 2 asociado con HLA-B (BAT2)
400 33358_at	0.03283	Fuente: 56b8 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

401 767_at	0.032913	Fuente: clon CIT987SK-A-815A9 del Cromosoma 16 BAC humano, secuencia completa.
402 35163_at	0.033005	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA1041, cds completo.
403 1278_at	0.033089	
404 1695_at	0.033089	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína tipo ubiquitina, cds completo.
405 34648_at	0.033089	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para subunidad SSR alfa.
406 40211_at	0.033171	Fuente: Gen humano para proteína A1 del núcleo de ribonucleoproteína heterogéneo (hnRNP).
407 34085_at	0.033329	Fuente: Gen de <i>H. sapiens</i> para proteína L38 ribosomal.
408 1635_at	0.033329	ABL es el proto-oncogén homólogo celular del virus de leucemia de múrido de Abelson y está asociado con la translocación cromosómica t9:22 con el gen BCR en leucemia mielógena crónica y linfoblástica aguda; empalme alternativo utilizando el exón 1a
409 37675_at	0.033565	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína portadora de fosfato mitocondrial.
410 38110_at	0.033587	mda-9; pbp-1
411 40771_at	0.033587	correspondencia: proteínas: Sw:P26038 Tr:O35763 Sw:P26041 Sw:P26042 Sw:P26044 Sw:P35241 Sw:P26043 Sw:P15311 Sw:P31976 Sw:P26040 Tr:Q26520 Tr:Q24788 Tr:Q24796 Tr:Q94815
412 869_at	0.033639	factor IIA de transcripción general, 2 (subunidad de 12 kD)
41341203_at	0.033639	putativo
414 40426_at	0.033639	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para proteína BCL7B.
415 36032_at	0.033639	parcialmente apoyado por FGENES y GENSCAN
416 39376_at	0.033662	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0630, cds parcial.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

417 39380_at	0.033775	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0697, cds parcial.
418 40091_at	0.033775	6 repeticiones de Zinger del dedo de zinc C2H2 de 520 a 691 en la secuencia de proteína
419 33866_at	0.03399	tropomiosina (AA 1 - 248)
420 34809_at	0.03399	Fuente: yq87g03.r1 INFLS de bazo hígado fetal de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 202804 5', secuencia de ARNm.
421 39778_at	0.03402	Fuente: ARNm para N-acetilglucosaminiltransferasa I humana (GlcNAc-TI), cds completo.
422 36121_at	0.034483	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA1065, cds completo.
423 41116_art	0.034861	Fuente: wc43d09.x1 NCI_CGAP_Pr28 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2321393 3' similar a SW:YD84  SCHPO Q10409 HYPOTHETICAL 32.6 KD PROTEÍNA  C1F3.04C EN EL CROMOSOMA 1, secuencia de ARNm.
424 34781_at	0.034861	Fuente: ARNm para WS-3 humana, cds completo.
425 34812_at	0.034907	Fuente: 22f11 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm
426 32276_at	0.035041	rpl.32 (aa 1 - 135)
427 36636_at	0.035115	Fuente: ARNm para ornitina aminotransferasa humana, cds completo.
428 37674_at	0.035221	Precursor de la 5-aminolevulinato sintasa
429 41814_at	0.033359	Precursor de alfa-L-fucosidasa (EC 3215)
430 37907_at	0.035531	Proteína isla CpG
431 35195_at	0.03601	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para fosfato ciclasa.
432 35720_at	0.036032	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0893, cds completo.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

433 34600_s_at	0.036032	Fuente: ARNm homólogo de tub humana, cds completo.
434 32526_at	0.036255	Proteína hipotética FLJ14529
435 33295_at	0.036255	Fuente: gen DARC de <i>H. sapiens</i> .
436 41404_at	0.036255	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína quinasa B Ribosomal (RSK-B).
437 41170_at	0.036255	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0663, cds completo.
438 34774_at	0.036255	Fuente: ARNm para proteína tioesterasa de pelmitoilo humano, cds completo.
439 35670_at	0.036255	Fuente: gen para la isoforma alfa-III de la subunidad catalítica de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa humana, exón 23, clon lambda-NK alfa-R3-2.
440 33835_at	0.036255	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0721, cds parcial.
441 35756_at	0.036255	Fuente: ARNm para proteína GIPC que interactúa con RGS-GAIP de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
442 38679_g_at	0.036255	Fuente: zg79b05.s1 NbHH19W cardíaco fetal de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 399537 3' similar a gb:M65125_ma1 U1 Y PROTEÍNA RIBONUCLEÓTIDA NUCLEAR PEQUEÑA U2 (HUMANA); secuencia de ARNm.
443 1081_at	0.036261	ornitina descarboxilasa
444 41559_at	0.036261	Fuente: zw24f03.r1 NbHOT de tumor de ovario de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 770237 5', secuencia ARNm.
445 40587_s_at	0.03647	Fuente: ARNm para proteína p18 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
446 1884_s_at	0.03647	ciclina
447 37348_s_at	0.036478	Fuente: ak01go01.s1 NbHPA de tumor paratiroideo de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 1404720 3' similar a SW: PROTEÍNA 7 QUE INTERACTÚA CON EL RECEPTOR TIROIDEO Q15651 HUMANO TRI7; secuencia de ARNm.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

448 37759_at	0.036478	Fuente: ARNm para proteína multi-transmembrana asociada con lisosomal humana (LAPTm5), cds completo.
449 40182_s_at	0.036776	Fuente: Secuencia de ARNm del clon 24658 de <i>Homo sapiens</i> .
450 32543_at	0.036921	Fuente: ARNm para autoantígeno Calreticulina humano, cds completo.
451 32750_r_at	0.036934	proteína de enlazamiento de actina
452 117_at	0.036934	proteína de choque térmico HSP70B
453 32548_at	0.036934	Fuente: ARNm (p23) humano, cds completo.
454 41594_at	0.036934	Fuente: ARNm para proteína tirosina quinasa humana (JAK1), cds completo.
455 37732_at	0.036934	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564E1922 (del clon DKFZp564E1922).
456 41128_at	0.03697	Fuente: secuencia de ARNm del clon 24606 de <i>Homo sapiens</i> .
457 35903_at	0.037598	Fuente: ARNm para la glicoproteína oligodendrocito-mielina humana (OMGP), cds completo.
458 33809_at	0.037604	Cadena alfa-1 de la proteína reguladora Gi de enlazamiento de GTP
459 33466_at	0.037604	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23860 de <i>Homo sapiens</i> .
460 39897_at	0.037937	Fuente: yy39g07.s1 2NbHM de melanocitos de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 273660 3'; secuencia de ARNm.
461 34950_at	0.037937	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA0760, cds parcial.
462 41530_at	0.037937	Fuente: ARNm humano para 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial, cds completo.
463 34753_at	0.037937	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para gen nuevo en la región Xq28.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

464 36160_s_at	0.037937	Fuente: ARNm del receptor pi de la proteína tirosina fosfatasa humana (PTPRP), cds completo.
465 34592_g_at	0.037937	proteína ribosomal S 17
466 34752_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586G2222 (del clon DKFZp586G2222).
467 34213_at	0.038065	Fuente ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0869, cds parcial.
468 33893_r_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0470; cds completo.
469 34392_s_at	0.038065	Rab1, variante de empalme
470 38045_at	0.038065	un nuevo miembro de la familia del Armadillo que interactúa con presenilina 1 (PS1); proteína asociada con presenilina
471 38062_at	0.038065	Similar a un nucleótido guanina de <i>C. elegans</i> que libera el homólogo del factor (S4 2368)
472 38573_at	0.038065	proteína de dedo de zinc
473 32119_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586B211 (del clon DKFZp586B211).
474 31955_at	0.038065	Fuente: ARNm para fau de <i>H. sapiens</i> .
475 31899_at	0.038065	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0103, cds completo.
476 38991_at	0.038065	Fuente: HSU55980 ARNm de cerebro humano de Sanders Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> 25453 3', secuencia de ARNm.
477 39809_at	0.038065	HBP1
478 41375_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína G7b (gen G7b), localizado en la región clase III del complejo principal de histocompatibilidad.



(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

479 1356_at	0.038065	Fuente: ARNm para la proteína humana que confiere resistencia a la radiación ionizante, cds completo.
480 39009_at	0.038065	Fuente: yy66d08.r1 2NbHMSP de esclerosis múltiple de Soares  Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 278511 5', secuencia de ARNm.
481 39327_at	0.038065	similar a peroxidasa de <i>D. melanogaster</i> (U11052)
482 41449_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para epsilon-sarcoglicano.
483 40775_at	0.038065	Extreme 5' del gen más allá de este clon; correspondencia: proteína Q61500
484 36511_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0851, cds completo.
485 35833_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp4340071 (del clon DKFZp4340071).
486 35845_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína Sec24 (isoforma Sec24B).
487 36271_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA1024, cds parcial.
488 41715_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para fosfoinositida 3-quinasa.
489 41665_at	0.038065	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0824, cds parcial.
490 35342_at	0.038065	Fuente: secuencia de ARNm del clon 24416 de <i>Homo sapiens</i> .
491 41799_at	0.038065	Fuente: 48h8 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
492 36603_at	0.038065	similar al activador GCN1 de traducción de levadura (P1:A48126)
493 39766_r_at	0.038229	Fuente: tr08h04.x1 NCL_CGAP_Ov23 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2217751 3' similar a SW: POLIPÉPTIDO DE 7,0 KD DE POLIMERASAS I, II, Y III DE ARN DIRIGIDO POR ADN P53803 HUMANO DE RPCX; secuencia de ARNm.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

494 38100_at	0.038407	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para translocación de proteína-1, cds completo.
495 39441_at	0.038506	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para proteína 1 tipo lantionina sintetasa C (gen LANCL1).
496 38398_at	0.038994	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0358, cds completo.
497 33108_i_at	0.039132	putativo
498 35102_at	0.039332	Fuente: ARNm para proteína dedo de zinc de <i>Homo sapiens</i> , extremo 3'.
499 2065_s_at	0.039432	Fuente: ARNm para alfa Bax humana, cds completo.
500 34814_at	0.039631	Fuente: DKFZp434D0717_s1 434 (sinónimo: htes3)  Clon de ADNc de Homo sapiens DKFZp434D0717 3', secuencia de ARNm.
501 41436_at	0.039781	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para ZNF198 proteína.
502 33451_s_at	0.039781	Fuente: DU3.2-7.G09 DU-145 ADNc de <i>Homo sapiens</i> 3', secuencia de ARNm.
503 37489_s_at	0,039781	Fuente: ARNm de la isoforma de cerebro intercambiador 3 aniónico humana (bAE3), cds completo.
504 36650_at	0.040102	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAK0002, cds completo.
505 34849_at	0.040102	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para seril-tARN sintasa.
506 743_at	0.040122	putativo
507 1072_g_at	0.040122	Fuente: ARNm del factor de transcripción humano GATA-2 (GATA-2), cds completo.
508 1660_at	0.040122	Fuente: ARNm para carcinio epidermoide humano para enzima EZ que conjuga ubiquitina similar al producto génico sin dobleces de <i>Drosophila</i> , cds completo.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

509 428_s_at	0.040122	Fuente: Fragmento de ARN mensajero humano para la microglobulina beta-2.
510 837_s_at	0.040122	Fuente: ARNm para enzima málica (+)-dependiente de NADP citosólico de cáncer humano, cds parcial.
511 38652_at	0.040388	Fuente: secuencia de ARNm del clon 24742 de <i>Homo sapiens</i> .
512 33301_g_at	0.040401	
513 35307_at	0.040403	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para el inhibidor beta de la disociación de GDP.
514 40537_at	0.040659	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0741, cds completo.
515 40018_at	0.040659	Fuente: ARNm para KIAA0410 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
516 38993_r_at	0.040683	Fuente: 32a12 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
517 33369_at	0.040683	Fuente: P9-C4.T3.P9.D4 conorm ADNc de <i>Homo sapiens</i> 3', secuencia de ARNm.
518 38065_at	0.040683	Fuente: ARNm para HMG-2 de <i>H. sapiens</i> .
519 630_at	0.040702	Fuente: Gen de desoxicitidilato desaminasa de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
520 39026_r_at	0.040775	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23887 de <i>Homo sapiens</i> .
521 37298_at	0.040775	Fuente: ARNm para MM46 de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
522 566_at	0.040775	molécula de adhesión celular neural de 145 kda; esta secuencia viene de la Fig. 4
523 1226_at	0.041055	metaloproteínasa transmembrana/disintegrina; adamalísina; TACEA

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

524 36165_at	0.041055	Fuente: zc48b04.r1 NbHSF de fibroblastos senescentes de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 325519 5'  similar a gb: X13238 PRECURSOR DEL POLIPÉPTIDO VIC DE CITOCROMO C OXIDASA (HUMANA); secuencia de ARNm.
525 32510_at	0.041215	2-carboxibenzaldehído reductasa; miembro de la familia AKR7 de aldoceto reductasa
526 39791_at	0.041257	Fuente: ARNm para calcio-ATPasa de <i>Homo sapiens</i> (HK1), cds completo.
527 31809_at	0.041257	Fuente: ARNm para contactina de <i>H. sapiens</i> .
528 36100_at	0.041257	Fuente: ARNm para el factor de crecimiento endotelial vascular de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
529 33924_at	0.041338	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA1091, cds parcial.
530 40846_g_at	0.041338	Fuente: ARNm para el factor nuclear NF90 humano, cds completo.
531 38664_at	0.041338	Fuente: ARNm para BCNT de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
532 41283_at	0.041494	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23930 de <i>Homo sapiens</i> .
533 38042_at	0.041843	G6PD(AA 1 - 515)
534 1627_at	0.041843	
535 35152_at	0.041927	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> que codifica RAMP3.
536 33864_at	0.041927	se enlaza directamente con la proteína E1A de adenovirus tipo 5
537 32254_at	0.041979	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586L1323  (del clon DKFZp586L1323).
538 40435_at	0.041983	ADP.ATP translocasa
539 37616_at	0.041993	Fuente: ARNm para AUH de <i>H. sapiens</i> .
540 1213_at	0.042177	similar a serina quinasa humana SRPK1, codificada por el  Número de Acceso del GenBank U09564; específico para factores de empalme ricos en serina/arginina

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

541 818_s_at	0.042207	XH2; XNP; producto 1 alternativamente empalmado; contiene todos los exones; la traducción se inicia en el exón 9; gen ATRX depositado con el Número de Acceso del GenBanks U72900-U72935
542 37181_at	0.042334	Fuente: ARNm para Mpv17 de <i>H. sapiens</i> .
543 35776_at	0.042686	Fuente: ARNm de forma corta de intersectina de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
544 31820_at	0.042778	proteína de linaje celular hematopoiético (AA 1 - 486)
545 41344_s_at	0.042778	Fuente: ARNm para Pur(pur-alfa) de <i>H. sapiens</i> , cds completo.
546 1468_at	0.042778	Proteína asociada al receptor TNF tipo I
547 38306_at	0.043327	Fuente: zu44b03.r1 NbHOT de tumor de ovario de Soares Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 740813 5', secuencia de ARNm
548 34326_at	0.043502	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para beta-COP.
549 39442_at	0.043534	Homólogo de proteína relacionada con une-50
550 35619_at	0.043649	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0634, cds parcial.
551 1953_at	0.043649	Factor de crecimiento endotelial vascular
552 37580_at	0.043649	predicho; contiene al dominio SH3; miembro de la familia del gen EEN
553 33351_at	0.04411	similar a SUII
554 33752_at	0.044234	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína K1AA0850, cds completo.
555 41542_at	0.044234	Fuente: ARNm de la variante 1 (ZNF216) de empalme de la proteína 216 dedo de zinc de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
556 32853_at	0.044234	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0719, cds completo.
557 34876_at	0.044268	homólogo de gp180 de pato
558 35722_at	0.044288	similitud con Nmd2p de <i>S. cerevisiae</i>

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

559 40636_at	0.044411	Fuente: wf49b01.xl Soares_NFL_T_GBC_S1 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2358889 3' similar a TR:  O75955 O75955 FLOTILLIN-1.; secuencia de ARNm.
560 33443_at	0.044411	correspondencia: proteínas P38533 Q03933 P38530 P41154  Q00613 P38529 P38531 Q63717 P38532 Q99472
561 555_at	0.044411	proteína pequeña de enlazamiento de GTP, homólogas a SEC4 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Número de Acceso del Swiss-Prot P07560
562 38120_at	0.044659	enfermedad renal policística autosómica dominante tipo II
563 40263_at	0.045291	Fuente: ARNm para proteína desconocida de la región del clon lambda MENI de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
564 31797_at	0.046069	Fuente: secuencia de ADN humano del clon 73H22 sobre el cromosoma 6q23, secuencia completa.
56541194_at	0.046069	Fuente: PT1.3_04_C04.r tumor1 ADNc 5' de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
566 37532_at	0.0468	Fuente: gen para acil-CoA deshidrogenasa de cadena media humano (MCAD), exón 12.
567 883_s_at	0.0468	Fuente: ARNm para proteína h-pim-1 humana (h-pim-1), cds completo.
568 AFFX-HUMRGE/M 10098_5 at	0.0468	Fuente: gen de ARNr 18S humano, completo.
569 39033_at	0.047068	Fuente: HSZ78368 Cerebro fetal humano de S. Meier-Ewert  Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> 3.142 (CEPH), secuencia de ARNm.
570 33249_at	0.047068	receptor mineralocorticoide
571 36480_at	0.047068	subunidad alfa
572 36563_at	0.047068	Fuente: secuencia de ARNm del clon 23582 de <i>Homo sapiens</i> .
573 35746_r_at	0.047095	Fuente: ARNm para hnRNP-E2 de <i>H. sapiens</i> .
574 38743_f_at	0.047214	Fuente: Fragmento de ARNm humano para c-raf-1 activado  (exones 8 - 17).

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

575 41110_at	0.047214	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para la proteína tipo receptora de la movilización de calcio activada por vasopresina.
576 35187_at	0.048079	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586K1123 (del clon DKFZp586K1123).
577 41296_s_at	0.048079	Fuente: 37c5 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
578 781_at	0.048079	subunidad de enzima de modificación; subunidad beta
579 32228_at	0.048079	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0899, cds parcial.
580 35090_g_at	0.048079	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para NTAk, cds completo.
581 457_s_at	0.048079	conjugado en forma post-translacional con RanGAP1; proteína relacionada con ubiquitina; similar a UBL1 codificada por el Número de Acceso del GenBank U38784, PIC1 codificada por el Número de Acceso del GenBank U61397 y GMP1  codificada por el Número de Acceso del GenBank U72722
582 37333_at	0.048079	Fuente: ARNm de <i>H. sapiens</i> para ADN (citosina-5)-metil transferasa.
583 35683_at	0.048079	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la proteína KIAA0852, cds completo.
584 1253_at	0.048079	Fuente: ARNm para proteína quinasa humana, cds completo.
585 31807_at	6.04809	Fuente: U69190 1N1B de cerebro de infante de Soares ADNc 27655 de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm
586 430_at	0.048334	PNP
587 1280_i_at	0.048396	
588 37274_at	0.048396	biotin-amida amidohidrolasa
589 34940_at	0.048884	Fuente: we38g03.x1 NCI_CGAP_Lu24 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2343412 3', secuencia de ARNm.
590 40308_at	0.049324	Fuente: wh51h03.x1 NCI_CGAP_Kid11 Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> IMAGE: 2384309 3', secuencia de ARNm.

(continuación)

## Cambios de expresión génica a las 4 semanas en el Hipotálamo Rostral

591 41573_at	0.049324	Fuente: ARNm para SPR-2 de <i>H. sapiens</i> para la proteína de enlazamiento de caja GT.
592 34739_at	0.049324	Fuente: 18c3 Subbiblioteca cebada en forma aleatoria de ADNc de retina humana ADNc de <i>Homo sapiens</i> , secuencia de ARNm.
593 40517_at	0.049343	Fuente: ARNm humano para el gen de KIAA0372, cds completo.
594 35983_at	0.049343	Proteína humana hipotética (cds parcial); CDS  Construido a partir de la combinación de las correspondencias de BLASTX, EST y de las predicciones de Xgrail. Terminal N de proteína probablemente codificada en el cósmido de flaqueo R29942. La proteína predicha exhibe una similitud débil con la proteína hipotética PID e1226191 (AL021106) de <i>Drosophila melanogaster</i>
595 37895_at	0.049343	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para el transportador de ácido siálico de CMP, cds completo.
596 33877_s_at	0.049343	Fuente: ARNm de <i>Homo sapiens</i> para la KIAA1067, cds parcial.
597 34368_at	0.049343	similar a RPD3 d levadura, codificado por el Número de Acceso del GenBank X78454
598 41266_at	0.049343	Fuente: ARNm humano para integrina alfa 6.
599 32589_at	0.049516	Fuente: ARNm de la subunidad p150 del factor-1 de ensamblaje de cromatina humana, cds completo.
600 36907_at	0.049516	Fuente: ARNm para mevalonato quinasa de <i>Homo sapiens</i> , cds completo.
601 35703_at	0.049564	PDGF-A (AA 1 - 196)
602 31932_f_at	0.04966	Fuente: gen para el factor de transcripción 3a básico (BTF3a), cds completo.

5 Se determinaron los niveles en suero para IGFB2 y se encontró que disminuyeron, de acuerdo con los niveles disminuidos de transcrito en diferentes órganos, incluido el hígado.



Tabla 8

Determinación en suero de la proteína 2 de enlazamiento del factor de crecimiento tipo insulina

Tratamiento	conc (ng/mL)	promedio (ng/mL)
	1467	
	1742	
control	922	1583
	2201	
	1239.8	
FGF23CTP100 µg/día	987.6	893
	596.7	
	749.5	

5 Análisis. Se muestra además que la angiogénesis es inhibida por FGF23CTP en un modelo de retinopatía angioproliferativa inducida por hiperoxia (Aiello FP et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 10457 - 61(1995), Ozaki H et al., Am. J. Pathol. 156: 697 - 707 (2000)) en ratones C57/B6 (ver el Ejemplo VIII). Los componentes proliferativos de la angiopatía retinal inducida a través de una isquemia relativa por transición de ratones postnatales de condiciones hiperóxicas a condiciones normóxicas es inhibida significativamente ( $p = 0,018$ ) por medio de la inyección intravítrea del péptido FGF23CTP (GPA006).

10 En el hipotálamo rostral, además de su efecto sobre genes de angiogénesis y de ciclización, FGF23CTP afecta diferentes moléculas que han sido descritas por jugar un papel en la patogénesis de proliferación maligna de células gliales y precursoras (tumores malignos de cerebro): factor de crecimiento epitelial (EGF; Hoi Sang U et al., J. Neurosurg. 82: 841 - 6 (1995), Wu CJ et al., Oncogene 19: 3999 - 4010 (2000)), Bax (Streffer JR et al., J. Neurooncol. 56: 43 - 9 (2002); Martin et al., (2001)), conexina 43 (Huang R et al., Cancer Res. 62: 2806 - 12 (2002), Soroceanu L et al., Glia 33: 107 - 17 (2001)), PKR (Shir A & Levitzki A, Nature Biotechnology 20: 895 - 900 (2002)), NF1 (Cichowski K & Jacks T, Cell 104: 593 - 604 (2001), Gutmann DH et al., Hum. Mol. Genet. 10: 3009 - 16 (2001)).

#### EJEMPLO IV

Farmacología investigativa integrada a través del perfil de expresión génica *in vivo* en primates no humanos

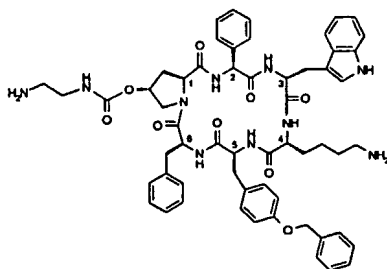
20 El método de descubrimiento de la invención ha sido validado a través de un ensayo "ciego" con monos utilizando tres péptidos de actividad farmacológica bien conocida: (1) el análogo de somatostatina SOM230, (2) la hormona que libera gonadotropina (GnRH), (3) y un factor inhibidor de leucemia (LIF). En cada caso, se llevó a cabo una prueba "ciega" con 3 polipéptidos "desconocidos". Los resultados demostraron la capacidad de los grupos de análisis de expresión génica para identificar, en cuatro meses, las actividades farmacológicas, la mayoría de las indicaciones terapéuticas y efectos secundarios, e incluso la identidad de las proteínas. Estos primeros resultados demuestran que el método de descubrimiento de la invención le proporciona en forma útil al arte con ventaja en la comprensión de los mecanismos farmacológicos y los efectos secundarios potenciales, la selección de biomarcadores y nuevas indicaciones potenciales.

30 Para la verificación de las proteínas o péptidos humanos seleccionados en monos cinomólogos, un grupo de control y cuatro grupos tratados (es decir, cada uno de los tres péptidos y el placebo) de dos machos y dos hembras son tratados durante dos semanas por medio de la administración diaria de las proteínas disueltas en suero autólogo (por ejemplo, en cada suero propio del animal) a través de la vía subcutánea. La administración de los péptidos fue blindada. La cantidad administrada de péptido fue de 100 µg/animal/día (5 - 6 mg de péptido total).

35 Se analizó el perfil de los fármacos en estos primates no humanos utilizando un perfil de expresión génica de más de 100 órganos sobre chips U95 de Affymetrix (conteniendo cada uno 1/3 del genoma humano). Además, se llevaron a cabo bioquímica extensiva y selección de química clínica (> 60 parámetros) e histopatología (aproximadamente 60 órganos).

Se utilizaron luego procedimientos de minería de datos. Se probaron los datos para responder cuatro preguntas: (1) Merece el polipéptido más investigaciones? (2) Cuáles son las rutas fisiológicas impactadas? (3) Cuáles son las indicaciones potenciales? (4)Cuál es la probabilidad de la identidad del polipéptido? Péptido 1. El péptido 1 era SOM230. SOM230 (pasireótido) tiene una estructura química ciclo[4-(NH<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O)Pro-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe] como la siguiente:

5



(I)

Aquí, Phg significa -HN-CH(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-CO- y Bzl significa bencilo. Ver, la solicitud de patentes PCT WO 02/10192. SOM230 es un análogo de somatostatina con afinidades de enlazamiento por los cinco receptores de somatostatina excepto el receptor 4 de somatostatina (SSTR4). S O M 2 3 0 ha sido desarrollado para diferentes indicaciones, incluidas aquellas descritas más arriba para otros análogos de somatostatina. Ver, Lewis I et al., J. Med. Chem. 46(12): 2334 - 44 (Junio 5, 2003); Weckbecker G et al., Endocrinology 143(10): 4123 - 4130 (2002); Kneissel M et al., Bone 28: 237 - 250 (2001); y Thomsen JS et al., Bone 25: 561 - 569 (1999), cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

10

SOM230 fue desarrollado para las indicaciones aprobadas de Sandostatin®, pero como un análogo más potente de somatostatina con una vida media en plasma *in vivo* más larga. Lewis I et al., J Med Chem 46(12): 2334 - 44 (Junio 5, 2003); Weckbecker G et al., Endocrinology 143(10): 4123 - 30 (Octubre 2002). En contraste con otros análogos, SOM230 se enlaza con todos los receptores de somatostatina excepto SSTR4. La afinidad de enlazamiento para los diferentes receptores de somatostatina era una base para definir el alcance de posibles nuevas indicaciones clínicas para SOM230. Bruns C et al., Eur J Endocrinol 143 (Suppl 1): S3 7 (2000); Bruns C et al., Eur J Endocrinol. 146(5): 707 - 16 (Mayo 2002). Además, se sugirieron otras posibles nuevas indicaciones debido a la actividad mejorada de SOM230 para la hormona de crecimiento y regulación de IGF-1 y sus diferentes efectos inhibitorios sobre secreciones de insulina y glucagón.

15

20

Después de la administración blindada del péptido 1 (SOM230), se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 9

25

Hallazgos por medio del equipo de minería de datos

Análisis	Resultados
Bioquímica/	Atrofia del timo y del bazo, aldosterona-, glucagón-, vitamina D-, PTH+,
Histopatología	Hemoglobina RBC-, calcio en la orina -, NAG+, TSH+ en machos,
Pituitaria	<u>IGFR1-</u> , GH1/2-, CSH(L)-, TSH-, CHRH2-, Prostaglandina D2 sintasa++, Inmunoglobulina--
Adrenales	IGF2-, somatostatina-, receptor de insulina +, urocortina+
Páncreas	<u>Metalotioneina 1A,1E++</u> , tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, fosfolipasaA2/1B ++, <u>18S-</u> ,
Estómago	<u>Gastrina+</u> , hipocretina+, receptor de glutamato+, GABAB-, IGFBP1+,
Timo	MHC clase II-, Ig-, FKBP12-, CD4-, defensina alfa I+,

(continuación)

Péptido 1: Conclusiones de los perfiles in vivo por medio del equipo de minería de datos

Análisis	Resultados
Médula ósea	VIP-, péptido YY-, ciclina-, GAPDH
Bazo	<u>IGF2-</u> , IGBP6-, receptor insulina-, urocortina+, Ig-, proteína ribosomal --, células Nk+
Tiroides	NPY-, ciclina-- , canal de calcio ATPasa +, receptor de somatostatina 4-,
Hígado	<u>IGF2-</u> , receptor de NMDA+, glutamato deshidrogenasa+, VIP, proteína 1 inducida por insulina, <u>STR5</u>
Riñón	Proteína portadora de soluto 9++, urocortina+, IGF2-, arrestina beta 2-, THRα+,

Los resultados subrayados en la Tabla anterior fueron identificados para investigación adicional.

5

Tabla 10

Péptido 1: Conclusiones del perfil *in vivo* por medio del equipo de minería de datos

Función/Ruta	Indicaciones potenciales
Actividad anti-crecimiento	Citosólico; cáncer
Tracto GI/pancreático función	Obesidad, regulación de la ingesta de alimentos, diabetes, pancreática regulación de la función
Inmunosupresión	Supresión de inmunidad específica, mantenimiento de inmunidad innata

Con base en estos resultados, el equipo de minería de datos hizo predicciones tales como la identidad del Péptido 1 administrado.

10

Tabla 11

Identidad predicha del péptido 1 (Análogo de Somatostatina SOM230)

Minería de datos	Predicción
1	Somatostatina, NPY,
2	IGF-1, Somatostatina, IGF-2
3	Somatostatina, IGF-1, IGF-2
4	Somatostatina, IGF-1, IGF-2
5	Secretina, IGF-1, Renina
<u>Resumen de la predicción</u>	Somatostatina, IGF-1, IGF-2

15

Con base en estos resultados, se seleccionó SOM230 para un desarrollo adicional como un análogo de somatostatina para tratar las indicaciones neuroendocrinas aprobadas para somatostatina (por ejemplo, acromegalia, tumores gastroenteropancreáticos) y también tiene potencial para indicaciones adicionales con una etiología pancreática endocrina tal como angiopatía diabética y obesidad mórbida asociada con hiperinsulinemia. Se propuso el nivel de IGF-1 en suero como un marcador sustituto. Otras indicaciones potenciales para SOM230 son por lo tanto inflamación (por ejemplo, psoriasis), dolor e inmunosupresión (por ejemplo, rechazo crónico).

Péptido 2. Después de la administración blindada del péptido 2 (hormona liberadora de gonadotropina), se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 12

Hallazgos por medio del equipo de minería de datos

Análisis	Resultados
Bioquímica	Ligero incremento en aldosterona
Riñón	Inhibidor de tiol proteasa (aldosterona + en bioquímica), metabolismo: +GAPDH, +STAT, +JAK, +TEGT
Glándula Pituitaria	<u>GH</u> -, receptor de GNRH-, Somatostatina+, <u>FSH</u> +, <u>LH</u> -, TSH-, CSH(L)-, IGF/IGFBP-/+, tubulina+,
Ovario	<u>Receptores nucleares</u> -, <u>aromatasa y estrógeno sintasa</u> +, activina A-, inhibina beta B+,
Testículo	<u>CREM</u> +
Tiroides	Ocludina+, proteína que se enlaza a la hormona tiroidea+, THR alfa-
Adrenales	Folistatina+, IGF2+, síntesis de catecolaminas+, activina A-/inhibina+
Hipotálamo	Transtiretina+, oxitocina
Médula ósea	Macrófagos+, eosinófilos+, activina A-, inhibina beta B+,
Timo	Integrina alfa6+, VAP1+, metabolismo de lípidos, proteína de enlace de selenio+,
Glándula mamaria	Inconcluso; Muestreo heterogéneo
Hígado	Activina A-, inhibina beta B+, metabolismo de lípidos+, glicolisis+, folistatina+, IDO1+, VEGF

5 Los resultados subrayados en la Tabla anterior fueron identificados para investigación adicional.

Tabla 13

Péptido 2: Conclusiones del perfil *in vivo* por medio del equipo de minería de datos

Función/Ruta	Indicaciones potenciales
Funciones del ovario y del testículo	Fertilidad, estimulación de la función reproductiva, estimulación de esteroidogénesis

Con base en estos resultados, el equipo de minería de datos hizo predicciones tales como la identidad del Péptido 2 administrado.

Tabla 14

Identidad predicha del Péptido 2 (GnRH)

Minería de datos	Predicción
1	GnRH, FSH, HCG
2	FSH, IGF1, GnRH
3	FSH, Somatotropina, LH
4	GnRH, FSH, IGF1
5	FSH, LHRH, IGF-1
<u>Resumen de la predicción</u>	FSH, GnRH, LH-(RH)

5 Con base en estos resultados, las indicaciones predichas para el Péptido 2 administrado (hormona liberadora de gonadotropina) se hicieron para indicaciones relacionadas con la hormona liberadora de gonadotropina o para indicaciones relacionadas con la hormona para la liberación de la hormona luteinizante, por ejemplo trastornos antiproliferativos (cáncer), funciones de ovario y de testículo (hipogonadismo gonadotrópico hipotalámico, control de la fertilidad y retraso o detención de la pubertad/pubertad precoz), y deficiencias en la hormona de crecimiento.

Péptido 3. Después de la administración blindada del péptido 3 (factor inhibidor de la leucemia), se obtuvieron los siguientes resultados:

10

Tabla 15

Hallazgos por medio del equipo de minería de datos

Análisis	Resultados
Bioquímica/	<u>Calcitonina</u> ++++, osteocalcina+, PTH-, fosfatasa alcalina ósea-,
Hematología	Polipéptido terminal IC-, T4+, TSH+, alfa globina1+, recuento de plaquetas+, WBC
Hígado	C/EBP delta+, JunB+, NFIL3+, CREM, quiescina Q6+, BTG2+, TCR-, BCL6+, antileucoproteinas+, selectina P+, VCAM+, efrina A1+, <u>Osteopontina</u> +, <u>calcitonina</u> +, TIMP-1, inhibidor de plasminógeno+, IL1R1, colesterol hidrolasa+, receptor de LDL, fosfolipasa AII tipo II+
Riñón	C/EBP delta+, JunB+, NFIL3+, CREM, inmunoglobulina-, MCP1+, receptor de manosa +, BCR+, VCAM+, <u>efrina A2</u> ±, osteopontina+, estaniocalcina+, <u>TIMP-1</u> ±, ±, uroquinas+, ILR1+, receptor de LDL, fosfolipasa AII tipo II +
Tiroides	C/EBP delta+, JunB+, NFIL3+, CREM, STAT3+, CXCR4+, secuencia de leucemia mieloide+, Ig-, efrinaA1+, osteopontina+, TIMP-1+, haptoglobina, fibronectina+, fosfolipasa A2 tipo II A+, PDGF+
Músculo esquelético	JunB, haptoglobina, fosfolipasa A2 tipo IIA+
Bazo	JunB+, inhibidor 3 de STAT, calgranulina B+, CD5+, BCR+, efrina A1 exostosas+, TIMP-1 +, fibronectina+, ILR1+, receptor de LDL +
Adrenales	C/EBP delta+, JunB+, NFIL3+, CREM, BCR+, TIMP-1+, uroquinas+, IL1R1+, receptor de LDL

Pituitaria C/EBP delta+, JunB+, NFIL3+, TCR-, BCL6+" antileucoproteinasas+, efrina A1+, osteopontina+, quitinasa 3-tipo 1+, TIMP-1, inhibidor del activador de plasminógeno, metalotioneina+, haptoglobina+, IL1R1+

Los resultados subrayados fueron identificados para investigación adicional.

Tabla 16

Péptido 3: Conclusiones del perfil *in vivo* por medio del equipo de minería de datos

Función/Ruta	Indicaciones potenciales
Metabolismo óseo del Ca <sup>++</sup>	Osteoartritis, Osteoporosis
Inflamación	
Inmunosupresión	Trasplante
Factores de crecimiento de diferenciación vascular	Angiogénesis

5 Con base en estos resultados, el equipo de minería de datos hizo predicciones tales como la identidad del Péptido 2 administrado.

Tabla 17

Identidad predicha del Péptido 3 (LIF)

Minería de datos	Predicción
1	TGFβ2, IL-6, IFN gamma
2	TGFβ2, IL-6, Calcitonina
3	VIP
4	PDGF, GMCSF, Serotonina
5	LIF, IL3, TGFβ2
6	Oncostatina M, TGFβ2, IL3

Resumen de la predicción IL-6, IL-3, TGFβ2, LIF/Oncostatina

10 Con base en estos resultados, las acciones predichas para el Péptido 3 administrado sería incrementar las plaquetas, las células mieloides y los megacariocitos; incrementar las proteína en la fase aguda (tales como la Proteína Reactiva C (CRP) y la haptoglobina); disminuir la lipogenicidad (con indicaciones terapéuticas para tratamiento de la obesidad y el riesgo cardiovascular); disminuir la transaminasa, la albúmina y la lactato deshidrogenasa (LDH); y disminuir la fosfatasa alcalina, la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (con indicaciones terapéuticas para tratar la osteoartritis y la osteoporosis).

15 En resumen, las tres preguntas que se plantearon a la minería de datos podrían ser respondidas casi completamente por medio de la minería de datos. Se identificó que valía la pena una investigación adicional de los tres polipéptidos. Todas las rutas fisiológicas conocidas que son impactadas por estos tres polipéptidos administrados fueron descubiertas (por ejemplo fracturas de huesos por LIF, tracto gastrointestinal por SOM230). Ocho % de sus indicaciones potenciales conocidas fueron descubiertas y algunas nuevas fueron identificadas.

**EJEMPLO V**

20 Perfil de expresión génica inducida por SOM230 en monos

Introducción y resumen. Los ensayos de expresión génica de microarreglos fueron llevados a cabo utilizando tejidos de monos tratados con SOM230 con dosis sub-terapéuticas durante 14 días. Los ensayos fueron analizados para identificar los modos de acción de SOM230 con las posibles relaciones con aplicaciones terapéuticas. Para una descripción de SOM230, ver el ejemplo anterior.

- 5 Todos los tejidos de los monos examinados (tiroides, grasa parda, pituitaria, páncreas, hígado, riñón, bazo) demostraron cambios en los genes regulados por el enlazamiento de la somatostatina 14 natural (SST-14) y la somatostatina 28 (SST-28) con receptores de somatostatina (SSTR). Los perfiles de los transcritos reflejaron las acciones conocidas de la somatostatina sobre la hormona de crecimiento/el factor 1 de crecimiento tipo insulina (GH/IGF-1), glucagón/ejes de insulina y sobre la proliferación celular. Sin embargo, el compuesto afectó
- 10 significativamente los niveles de transcritos de otros genes relacionados tales como el del factor 2 de crecimiento tipo insulina (IGF-2) en la pituitaria y los riñones. Este podría ser un candidato a marcador biológico (biomarcador) de la eficacia del fármaco con tal de que el cambio en la biosíntesis de la proteína se viera fácilmente reflejado en un tejido accesible como la sangre. Otros efectos conocidos de la somatostatina y agonistas sobre los factores de crecimiento, células del sistema inmune y las funciones cardiovasculares y renales también se reflejaron por los
- 15 cambios en los perfiles de estas clases de genes después de SOM230.

Origen del tejido y procesamiento. Los monos cinomólogos hembra y macho recibieron SOM230 en forma subcutánea (100 µg/animal/día) o el vehículo durante 14 días. El día 15, todos los animales fueron sacrificados y los tejidos para extracción de ARN fueron inmediatamente ultracongelados y mantenidos a -80° C hasta su procesamiento.

20

Tabla 18

Origen de los tejidos utilizados para los análisis

Muestra de tejido	Animal o muestra no.	Sexo	Tejido/órgano	Compuesto	Dosis(µg/animal/día)
x547e	W62405	Macho	Grasa parda	SOM230	100
x548e	W62406	Macho	Grasa parda	SOM230	100
x549e	W62425	Hembra	Grasa parda	SOM230	100
x550e	W62426	Hembra	Grasa parda	SOM230	100
x673e	W62401	Macho	Grasa parda	Control	0
x675e	W62421	Hembra	Grasa parda	Control	0
x676e	W62422	Hembra	Grasa parda	Control	0
x857e	W62501*	Macho	Grasa parda	Control	0
x858e	W62502*	Macho	Grasa parda	Control	0
x859e	W62551*	Hembra	Grasa parda	Control	0
x860e	W62552*	Hembra	Grasa parda	Control	0
d32e	W62551	Hembra	Riñón	Control	0
d35e	W62502	Macho	Riñón	Control	0
d37e	W62552	Hembra	Riñón	Control	0
d45e	W62501	Macho	Riñón	Control	0

(continuación)

Origen de los tejidos utilizados para los análisis

Muestra de tejido	Animal o muestra no.	Sexo	Tejido/órgano	Compuesto	Dosis( $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{día}$ )
x407e	W62401	Macho	Riñón	Control	0
x408e	W62402	Macho	Riñón	Control	0
x409e	W62421	Hembra	Riñón	Control	0
x410e	W62422	Hembra	Riñón	Control	0
x521e	W62405	Macho	Riñón	SOM230	100
x522e	W62406	Macho	Riñón	SOM230	100
x523e	W62425	Hembra	Riñón	SOM230	100
x524e	W62426	Hembra	Riñón	SOM230	100
x401e	W62401	Macho	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	Control	0
x402e	W62402	Macho	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	Control	0
x403e	W62421	Hembra	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	Control	0
x404e	W62422	Hembra	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	Control	0
x517e	W62405	Macho	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	SOM230	100
x518e	W62406	Macho	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	SOM230	100
x519e	W62425	Hembra	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	SOM230	100
x520e	W62426	Hembra	Lóbulo lateral izquierdo del hígado	SOM230	100
x529e	W62405	Macho	Páncreas	SOM230	100
x530e	W62406	Macho	Páncreas	SOM230	100
x531e	W62425	Hembra	Páncreas	SOM230	100
x532-2e	W62426	Hembra	Páncreas	SOM230	100
x641e	W62401	Macho	Páncreas	Control	0



(continuación)

Origen de los tejidos utilizados para los análisis

Muestra de tejido	Animal o muestra no.	Sexo	Tejido/órgano	Compuesto	Dosis( $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{día}$ )
x642e	W62402	Macho	Páncreas	Control	0
x645e	W62421	Hembra	Páncreas	Control	0
x646e	W62422	Hembra	Páncreas	Control	0
x413e	W62401	Macho	Glándula pituitaria	Control	0
x414e	W62402	Macho	Glándula pituitaria	Control	0
x415e	W62421	Hembra	Glándula pituitaria	Control	0
x513-2e	W62405	Macho	Glándula pituitaria	SOM230	100
x514e	W62406	Macho	Glándula pituitaria	SOM230	100
x515e	W62425	Hembra	Glándula pituitaria	SOM230	100
x516e	W62426	Hembra	Glándula pituitaria	SOM230	100
x425e	W62401	Macho	Bazo	Control	0
x426e	W62402	Macho	Bazo	Control	0
x427e	W62421	Hembra	Bazo	Control	0
x428e	W62422	Hembra	Bazo	Control	0
x525e	W62405	Macho	Bazo	SOM230	100
x526e	W62406	Macho	Bazo	SOM230	100
x527e	W62425	Hembra	Bazo	SOM230	100
x528e	W62426	Hembra	Bazo	SOM230	100
d33e	W62501	Macho	Tiroides	Control	0
d40e	W62551	Hembra	Tiroides	Control	0
d43e	W62502	Macho	Tiroides	Control	0
d48e	W62552	Hembra	Tiroides	Control	0
x443e	W62401	Macho	Tiroides	Control	0
x445e	W62421	Hembra	Tiroides	Control	0
x446e	W62422	Hembra	Tiroides	Control	0

(continuación)

## Origen de los tejidos utilizados para los análisis

Muestra de tejido	Animal o muestra no.	Sexo	Tejido/órgano	Compuesto	Dosis( $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{día}$ )
x505e	W62425	Hembra	Tiroides	SOM230	100
x506e	W62426	Hembra	Tiroides	SOM230	100
x507e	W62405	Macho	Tiroides	SOM230	100
x508e	W62406	Macho	Tiroides	SOM230	100

- 5 El perfil de expresión del ARN fue realizado por medio del arreglo de la sonda de expresión génica HG-U95A (Affymetrix; Santa Clara, Calif., EUA), que contiene más de 12.600 grupos de sondas que interrogan principalmente genes humanos de longitud completa y también algunos grupos de sondas de control. Los ensayos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se obtuvo el ARN total por medio de extracción con guanidinio ácido tiocianato-fenol-cloroformo (TRIzol®, Invitrogen Life Technologies, San Diego, Calif., EUA) a partir de cada sección congelada de tejido. Se purificó luego el ARN total sobre una resina de afinidad (Rneasy®, Qiagen) y se lo cuantificó. Se sintetizó ADNc bicatenario con una cantidad de partida de aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de ARN total de longitud completa utilizando el Sistema de Escogencia Superscript® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif., EUA) en presencia de un iniciador oligonucleótido de ADN T7-(dT)<sub>24</sub>. Después de la síntesis, se purificó el ADNc por medio de extracción con fenol/cloroformo/isoamil alcohol y precipitación con etanol. El ADNc purificado fue luego transcrito *in vitro* utilizando el BioArray® High Yield ARN Transcript Labelling Kit (ENZO, Farmingdale, New York, EUA) en presencia de ribonucleótidos biotinilados de ARNc marcado con biotina. El ARNc marcado fue luego purificado sobre una resina de afinidad (Rneasy®, Qiagen), cuantificado y fragmentado. Se hibridó una cantidad aproximadamente de 10  $\mu\text{g}$  de ARNc marcado durante 16 horas a 45°C a un arreglo de sonda de expresión. Se lavó luego el arreglo y se lo tiñó dos veces con estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes) utilizando la Estación de Trabajo 400 Fluidics de GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, Calif., EUA). El arreglo fue luego escaneado dos veces utilizando un escáner láser confocal (GeneArray® Scanner, Agilent, Palo Alto, Calif., EUA) dando como resultado una imagen escaneada. Este "archivo .dat" resultante fue procesado utilizando el programa MAS4 (Affymetrix) hasta un "archivo .cel". El "archivo .cel" fue capturado y cargado en el Affymetrix GeneChip® Laboratory Information Management System (LIMS). La base de datos del LIMS está conectada con un servidor UNIX Sun Solaris a través de una red del sistema de archivo que permite que las intensidades promedio de todas las células de las sondas (archivo CEL) sean descargadas en una base de datos de Oracle (NPGN). Los datos sin procesar fueron convertidos a niveles de expresión utilizando una "intensidad objetivo" de 150. Se evaluaron los datos para control de calidad y se los cargó en el software GeneSpring® versión 4.2.4 (Silicon Genetics, Calif., EUA) para análisis.
- 30 Sobre el chip humano HGU95Av2 de Affymetrix, los grupos de sondas para genes individuales contienen 20 pares de oligonucleótidos, cada uno compuesto de una "correspondencia perfecta" de 25-mer y una "no correspondencia" de 25-mer que difiere de la correspondencia "perfecta" de oligonucleótidos en una sola base. Después de la marcación de la sonda, hibridación, y del escaneo láser, se estimó el nivel de expresión promediando las diferencias en intensidad de señal medidas por medio de pares de oligonucleótidos de una sonda dada (valor AvgDiff). Se calcularon los cambios de plegamiento y las direcciones para genes seleccionados, a partir de las diferencias de los valores AvgDiff entre los controles y los tratados.

Para identificar genes que fueron impactados por SOM230, se filtraron inicialmente los grupos de datos para excluir en una primera fase del análisis, genes cuyos valores estuvieran sistemáticamente en los rangos de expresión más bajos donde el ruido experimental es alto (al menos 80 en un número de ensayos correspondientes al número más pequeño de replicas de cualquier punto del ensayo). En una segunda ronda de selección un valor p de umbral de 0,05 (con base en una prueba t) identificó las diferencias entre tratados y de control con base en modelo de error de dos componentes (Global Error Model) y, siempre que sea posible, con una reducción de la corrección para probar múltiples hipótesis (tasa de falsos descubrimientos de Benjamini y Hochberg). La decisión de mantener o rechazar un gen específico se basó en la conjunción de cambios numéricos identificados por medio de algoritmos comparativos y estadísticos y la relación con otros genes modulados que apuntan a un tema biológico común. El peso de esta relación fue evaluado por medio del análisis a través de una revisión de la literatura científica relevante.

- 5 Para el análisis de los ensayos descritos aquí: (1) El incremento y la disminución en expresión se refieren al nivel de expresión del ARN a menos que específicamente se establezca otra cosa. (2) Si hubieran múltiples grupos de sondas que representen al mismo gen, el grupo de sondas diseñado para el objetivo sentido fue el favorecido. (3) Los cambios en expresión génica indicaron que una ruta, una actividad celular o componente representado por un gen individual podría ser impactado. La comprensión de las implicaciones funcionales depende de la información disponible sobre el contexto biológico de cambio de nivel del transcripto (función génica, variación fisiológica, otros cambios génicos, tejido, compuesto). RT-PCR se utiliza para identificar el grado de cambio absoluto en los niveles de ARNm, pero este método en general no añade más información sobre la relevancia de los cambios de nivel del transcripto.
- 10 Entre los 12.600 genes por chip, se encontró que aproximadamente 100 genes reflejan la firma del compuesto en un tejido particular. Por claridad, dividimos en diferentes clases y subdividimos, con muchas superposiciones, en categorías funcionales en la siguiente Tabla.

Tabla 19

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL			
1) Fosfatidil inositol y rutas relacionadas/PKC, fosfolipasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IP-4-fosfatasa, tipo 1, isoforma b ↓x2</li> <li>• PI-3-quinasa, catalítica, α polipéptido ↓x3</li> <li>• PI-3-quinasa, catalítica, δ polipéptido ↓x2</li> <li>• 1-PI-4-fosfato 5-quinasa isoforma C ↓x1.5</li> <li>- Proteína de transferencia de PI, β ↓x 2.5</li> <li>• PLCγ1 ↓1.5</li> <li>• Inhibidor de PKC ↑x2</li> <li>• Receptor de IP3, tipo 1 ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• subunidad reguladora de PI-3-quinasa, polipéptido 2 (p85 β) ↓x3.5</li> <li>• PI glicano, clase F ↓x2</li> <li>• PLCβ4 ↑x2</li> <li>• PI glicano, clase L ↑x3.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IP-1-fosfatasa ↑x2.5</li> <li>• PI-4-quinasa, catalítica, α polipéptido ↑x1.5</li> <li>• PL A2, grupo IVC (citósólico, independiente de calcio) ↑x1.5</li> </ul>

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
2) <i>Otras rutas que dependen de calcio/ calcineurina/ calmodulina y proteínas asociadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína quinasa I que depende de calcio/ calmodulina</li> </ul> <p>↑x2.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de la proteína 2 que modifica la actividad del receptor (calcitonina)</li> </ul> <p>↑x3.5</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína quinasa I que depende de calcio/calmodulina</li> </ul> <p>↓x3.5</p>	
3) <i>Rutas y proteína adaptadoras relacionadas con Ras/MAPK quinasa/ ERK quinasa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rab geranilgeraniltransferasa, subunidad α ↓x1.5</li> <li>• Proteína que activa la GTPasa de Rab3, sin subunidad catalítica ↓x2</li> <li>• Proteína adaptadora de SHB (una proteína homóloga 2 de Src) ↓x2.5</li> <li>• MAPKKK5 ↑x2</li> <li>• Geraniltransferasa de Rab, subunidad β ↑x2</li> <li>• RAB 5C, miembro de la familia del oncogén RAS ↑x3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Familia del gen homólogo Ras, miembro G (rho G)</li> <li>• MAPKAPK 3</li> <li>• MAPKK1</li> <li>• MAPK 8</li> <li>• RAB6, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• Complejo 3 de proteína relacionada con el adaptador, subunidad σ1</li> <li>• Proteína nuclear relaciona con Ras</li> <li>• Aceptor 1 de Rab (prenilada)</li> <li>• RAB 2, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• Proteína 2 que activa a la GTPasa que contiene al motivo IQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína rica en ácido glutámico que se enlaza al dominio SH3</li> <li>• MAPKAPK 3</li> <li>• GTPas tipo Ras</li> <li>• Proteína 8 que interactúa con RaP2</li> </ul>
4) <i>Ruta JAK/STAT y quinasas relacionadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• STAT 1, 91kD ↓x2</li> <li>• JAK 1 ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• JAK 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• STAT 5B</li> <li>• STAT 1, 91kD</li> </ul>

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
5) <i>Proteína tirosina fosfatasas/otras fosfatasas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfatasa 8 de especificidad dual ↓x3 x3</li> <li>• Fosfatasa y homólogo de tensina (mutada en múltiples cánceres avanzados 1) ↓x3.5</li> <li>• PTP, receptor tipo, T ↑x2</li> <li>• PP 1, subunidad 5 reguladora (inhibidora) ↑x3.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PP 2, subunidad reguladora B (B56), γ isoforma ↑x1.5</li> <li>• PP 5, subunidad catalítica ↑x2.5</li> <li>• PP MAP-5 de especificidad dual ↑x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• STAT 2 PTP δ</li> <li>• PP 1, subunidad 8 reguladora (inhibidora)</li> <li>• PP 2A, subunidad B' catalítica</li> <li>• PP 1A (anteriormente 2C), dependiente del magnesio, α isoforma</li> <li>• PP 2A, subunidad B' reguladora</li> <li>• Fosfatasa 8 de especificidad dual</li> </ul>
6) <i>Otras proteínas quinasas y proteínas asociadas de enlazamiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de enlazamiento de Arg PTK- ↓x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo PTK 9 (proteína relacionada con A6)</li> <li>• Proteína 1 de anclaje de PTK A quinasa (PRKA)</li> <li>• Subunidad reguladora de la proteína quinasa R1-β que depende de cAMP</li> <li>• Proteína S6 quinasa ribosomal, 90kD, polipéptido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína quinasa (que depende de c AMP, catalítica), inhibidor γ</li> <li>• Proteína quinasa serina/treonina</li> <li>• Receptor PTK</li> <li>• Serina/treonina quinasa 11 (síndrome de Peutz-Jeghers)</li> <li>• Tirosina quinasa</li> <li>• Proteína S6 quinasa ribosomal, 90kD, polipéptido 3</li> </ul>
7) <i>Adenilato/guanilato ciclasas y rutas relacionadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenilil ciclasa soluble ↓x2</li> </ul>		

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
RECEPTORES CELULARES DE SUPERFICIE			
1) <i>Receptores acoplados a la proteína G y proteínas de enlace relacionadas / proteínas G</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de enlace miento a GTP ( proteína G), polipéptido q ↓x1.5</li> <li>• Proteína de enlace a GTP tipo-1 ↓x3</li> <li>• Receptor 49 acoplado a la proteína G ↓x2</li> <li>• Receptor acoplado a la proteína G, familia C, grupo 5, miembro B ↑x2</li> <li>• Proteína 11 de enlace a GTP ↑x2.5</li> <li>• Receptor 2 huérfano tipo tirosina quinasa ↑x2</li> <li>• Proteína de enlace a ATP(GTP) ↑x1.5</li> <li>• Receptor 9 acoplado a la proteína G ↑x2.5</li> <li>• Regulador de señalización 9 de la proteína G ↑x2</li> <li>-SSTR3 ↑x3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína G que interactúa con el polipéptido 3 de actividad inhibitoria α ↓x5</li> <li>• Receptor 1 acoplado a la proteína G ↓x2.5</li> <li>• Proteína de enlace al nucleótido guanina ( proteína G), β polipéptido 3 ↑x2.5</li> <li>• SSTR3↑x6.5</li> <li>• Diferenciación endotelial, Receptor acoplado a la proteína G esfingolípida, 5 ↑x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor 39 acoplado a la proteína G</li> <li>• Receptor 49 acoplado a la proteína G</li> <li>• Receptor 3 acoplado a la proteína G</li> <li>• Regulador de señalización 10 de la proteína G</li> <li>• Proteína de enlace a GTP</li> <li>• SSTR2 ↓x1.5</li> </ul>

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
2) Factores de crecimiento, sus receptores y proteína de enlace relacionadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FGFR 2 ↓x2</li> <li>• EGFRBP 2 ↓x1.5</li> <li>• Tirosina quinasa 1 relacionada con Fms (receptor del factor de permeabilidad VEGF/vascular) ↓x1.5</li> <li>• Catenina (proteína asociada a cadherina), α1 (102 kD) ↓x1.5</li> <li>• PDGFβ ↓x2</li> <li>• Proteína 10 enlazada a GFR ↑x 1.5</li> <li>• Factor 2 de respuesta al butirato (factor 2 de respuesta a EGF) ↑x3</li> <li>• VEGF B ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tirosina quinasa 1 relacionada con Fms (receptor del factor de permeabilidad VEGF/vascular) ↓x4.5</li> <li>• Sustrato 15 de la ruta del receptor EGF ↓x2</li> <li>• CSF 1 (macrófago) ↓x2</li> <li>• Cadherina 13, H-cadherina (corazón) ↓x2</li> <li>• Cadherina F1B ↓x4</li> <li>• Célula endotelial GF 1 (derivada de plaquetas) ↓x2</li> <li>• Proteína 1 de enlace a la quinasa activada por TGF β ↑x2.5</li> <li>• Receptor CSF 3 (granulocito) ↑x3</li> <li>• TGF β3 ↑x2.5</li> <li>• Cadherina 5, VE-cadherina (epitelio vascular) ↑x3</li> <li>• Factor de crecimiento inducible del nervio VGF ↑x2</li> <li>• IL 3 (CSF, múltiple) ↑x2</li> <li>• Precursor IL 7R ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Smad 3 ↓x1.5</li> <li>• Proteína G-CSF ↓x2</li> <li>• PDGFR α ↑x2.5</li> <li>• PDGFR, α polipéptido ↑x1.5</li> </ul>
3) Receptor de glutamato y proteínas de enlazamiento relacionadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GLUR 2, precursor ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GLUR, metabotrópico 1 ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de GLUR, Isoforma flip ↑x3</li> </ul>

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
<p>PROTEÍNA TRANSPORTADORAS QUE DEPENDEN DE ATP</p> <p><i>Canales de iones y rutas relacionadas</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de K+, subfamilia K, miembro 3 (TASK) ↓x4</li> <li>• Canal de K + dependiente del voltaje, subfamilia relacionada con Shab, miembro 1 ↓x2</li> <li>• ATPasa, que intercambia H+/K+, α polipéptido ↓x5</li> <li>• ATPasa, que transporta Na+/K+, α2 (+)polipéptido ↑x2.5</li> <li>• ATPasa, que transporta Na+/K+, polipéptido β3 ↑x2.5</li> <li>• ATPasa, músculo cardíaco que transporta Ca++, de contracción lenta 2 ↑x1.5</li> <li>• ATPasa putativa que transporta Ca++ ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de Ca++, depende del voltaje, subunidad α1H ↑x3</li> <li>• Canal de K+ que rectifica interiormente activado por la proteína G ↑x3.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de K + dependiente del voltaje, subfamilia tipo KQT, miembro 3 ↓x2.5</li> <li>• Canal de Ca++, dependiente del voltaje, subunidad α 1F ↓x4.5</li> <li>• Canal de Na + dependiente del voltaje, tipo I, β polipéptido ↑x2</li> </ul>
<p>BIOLOGÍA CELULAR/  FUNCIONES ESPECIALIZADAS</p> <p>1) <i>Neuromoduladores/ neuromoduladores y rutas relacionadas</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor colinérgico, nicotínico, β polipéptido 4 ↓x2</li> <li>• Receptor colinérgico, muscarínico 3 ↓x3</li> <li>• Receptor cerebral canabinoide 1 ↑x2</li> <li>• GABA-B R 1, precursor de isoforma ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de dopamina D3 ↑x2.5</li> <li>• Adrenérgico, β-3-, receptor ↑x2.5</li> </ul>	



(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
2) <i>Secreciones pancreáticas/gastrointestinales y rutas relacionadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de colecistoquinina ↓x4.5</li> <li>• Receptor de gastrina ↓x2</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Tipo quimotripsina ↑x3.5</li> <li>• Receptor del péptido que libera gastrina ↓x5</li> </ul>
	3) <i>Hormonas y rutas relacionadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IGF-2 ↓x1.5</li> <li>• Factor 1 de transcripción de tiroides ↑x2.5</li> <li>• Receptor de glucagón ↑x7</li> <li>• IGFBP, subunidad lábil al ácido ↑x3.5</li> <li>• Adrenomedulina ↑x2.5</li> <li>• ANP (precursor B del péptido natriurético atrial) ↑x2</li> <li>• SSTR3 ↑x3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interactuador 10 de THR ↓x3</li> <li>• Interactuador 12 de THR ↓x1.5</li> <li>• IGF-1 ↓x1.5</li> <li>• Proteína 4 de enlace a IGF ↓x2</li> <li>• IRS (sustrato receptor de insulina) 2 ↑x2.5</li> <li>• Receptor T3 ↑x2</li> <li>• SSTR3 ↑x6.5</li> <li>• Oxitocina, prepro-(neurofina I) ↑x2.5</li> <li>• FSHR ↑x2.5</li> </ul>
4) <i>Citoesqueleto y proteínas asociadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trombospondina-p50 ↓x2</li> <li>• Antígeno CD36 ↓x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de protección (filamento de actina), tipo gelsolina ↓x2.5</li> <li>• Complejo 2/3 de proteína relacionada con actina, subunidad 1A (41 kD) ↓x2.5</li> </ul>	
5) <i>Enzimas</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de la subunidad del factor XIIIAl de coagulación ↓x5</li> </ul>	

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
INMUNIDAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor 2 asociado con TNFR ↓x4</li> <li>• Subfamilia TNFR, miembro 14; mediador de la entrada del herpesvirus ↓x2.5</li> <li>• IFNR2 (α, β y ω) ↓x2.5</li> <li>• CC quemoquinas STCP-1 ↑x1.5</li> <li>• Gen estimulado por IFN ↑x3.5</li> <li>• Proteína 30 γ-inducible por IFN (IP30) ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína 30 γ-inducible de IFN (IP30) ↓x3.5</li> <li>• Gen relacionado con Pentaxina, rápidamente inducido por IL-1 ↓x7.5</li> <li>• Proteína 1 transmembrana inducida por IFN i ↑x2.5</li> <li>• Proteína asociada con el receptor tipo 1 de TNF ↓x2</li> <li>• IL 5R, α ↑x2.5</li> <li>• Proteína 2 de enlace al antígeno CD2 (cola citoplasmática) ↑x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antagonista del receptor de IL 1 ↓x2</li> <li>• Receptor b4 de LT (receptor de quemoquina tipo 1) ↓x1.5</li> <li>• Ligando independiente de fosfotirosina p62B para la isoforma de células B del dominio Lck SH2 ↓x2</li> <li>• Factor 3 regulador de IFN ↑x5</li> </ul>
CICLO CELULAR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caja Forkhead O3A ↓x1.5</li> <li>• Ciclina F ↓x2</li> <li>• Factor de enlace con el núcleo, dominio enano, α subunidad 2; translocada a, 1; ciclina relacionada con D ↑x3</li> <li>• Respuesta en fase S (relacionada con ciclina) ↑x2</li> <li>• Ciclo de división celular 25B ↑x5</li> <li>• Ciclina D3 ↑x2.5</li> <li>• Cdk12C (p18, inhibe CDK4) ↑x2</li> <li>• Cdk12D (p19, inhibe CDK4) ↑x1.5</li> <li>• Caja Forkhead H1 ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transición de fase G1 a S ↓x1.5</li> <li>• Polos adicionales del husillo, S. cerevisiae, homólogo de ↓x2.5</li> <li>• PCNA ↓x2.5</li> <li>• Glicoproteína tipo 3 de folistatina ↑x3</li> <li>• Ciclina T2 ↑x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclina T2 ↓x2</li> <li>• Ciclina D1 ↑x2</li> <li>• Cdk1 1C ↑x2</li> </ul>

(continuación)

Perfil de expresión génica con SOM230

CLASE	PITUITARIA	GRASA PARDA	PÁNCREAS
APOPTOSIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atanógeno asociado a BCL2 ↑x2</li> <li>• Antagonista de BCL2 de muerte celular ↑x2</li> <li>• Bax ,γ↑x1.5</li> <li>• BCL2/proteína 3 que interactúa con el adenovirus E1B de 19 kD ↑x1.5</li> <li>• Muerte celular programada 6 ↑x1.5</li> <li>• Proteína amplificada de neuroblastoma ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuroblastoma ↓x2.5</li> <li>• Proteína de enlace a ARN relacionada con apoptosis de neuroblastoma ↓x3</li> <li>• Tirosina quinasa asociada apoptosis ↑x3.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BCL2/proteína 1 que interactúa con adenovirus E1B de 19 kD, isoforma BNIP1-a ↓x1.5</li> <li>• Proteína de enlace a ARN relacionada con apoptosis de neuroblastoma ↓x3</li> </ul>

5

Tabla 20

Perfil de expresión génica con SOM230 (Continuación)

CLASE	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	TIROIDES
TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL				
1) <i>Fosfatidil inositol</i> y rutas relacionadas/PKC, fosfolipasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PI-3- quinasa, catalítica, α polipéptido ↓x3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de transferencia de PI, β ↓x1.5</li> <li>• 1- PI-4-fosfato 5-quinasa isoforma C ↓x2</li> <li>• PLA2 ↑Fosfolipasa D1 específica de glicosilfosfatidilinositol ↓x1.5</li> <li>• PKC, τ ↓x1.5</li> <li>• PLC, ,γ1 (anteriormente subtipo 148) ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PI-3-quinasa, catalítica, α polipéptido ↓x2.5</li> <li>• PI-3- quinasa, clase 3 ↑x2 x2</li> <li>• PKC, enlazamiento de proteína αT x2</li> <li>• IP-4- fosfatasa, tipo 1, isoforma b ↑x2</li> <li>• PI-3-quinasa, clase 2,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de IP3 tipo 3 ↓x1.5</li> <li>• PLC, ,γ1 (anteriormente subtipo 148) ↓x2</li> <li>• PIP 5- fosfatasa tipo IV ↓x3</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustrato PKC 80K-H ↑x1.5</li> <li>• PLA2, grupo IIA (plaquetas, fluido sinovial) ↑x5.5</li> <li>• Proteína de transferencia de PI ↑x3.5</li> <li>• Proteína de enlazamiento γ de Nck, Ash y PLC</li> <li>• NAP4 ↑x3.5</li> <li>• DAG quinasa, α (80kD) ↑x3</li> <li>• DAG quinasa, δ (130 kD) ↑x1.5</li> <li>• IP 5-fosfatasa ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>β polipéptido ↑x1.5</li> <li>• Fosfatidil inositol glicano, clase B ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DAG 1 quinasa, α (80kD) ↓x4</li> </ul>
<p>2) Otras rutas que dependen de calcio/ calcineurina/ calmodulina y proteínas asociadas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PP 3 (anteriormente 2B), subunidad catalítica, β isoforma (calcineurina A β) ↓x2</li> <li>• Calmodulina 3 (fosforilasa quinasa, δ) ↓x1.5</li> <li>• Proteína quinasa 2 que depende de calcio/ calmodulina β ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína quinasa 2 que depende de calcio/ calmodulina, β ↑x3</li> <li>• Calmodulina 2 (fosforilasa quinasa, δ) ↑x2</li> <li>• Precursor de la proteína 1 que modifica la actividad del receptor (calcitonina) ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático, dependiente de calcineurina 1 ↓x5</li> <li>• Calmodulina I (fosforilasa quinasa, δ) ↑x2</li> <li>• Calmodulina 2 (fosforilasa quinasa, δ) ↑x1.5</li> <li>• Proteína quinasa que depende de calcio/ calmodulina (CaM quinasa) II β ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína asociada con FKBP ↓x2.5</li> <li>• PK IV que depende de calmodulina (CaM-quinasa IV) ↓x7.5</li> <li>• PK IV que depende de calcio/ calmodulina ↓x7.5</li> <li>• Proteína 1 que enlaza al elemento sensible a c-AMP ↓x2</li> <li>• Proteína quinasa 1 que depende de calcio/ calmodulina ↓x2</li> </ul>

Perfil de expresión génica con SOM230 (Continuación)

CLASE	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	TIROIDES
3) <i>Rutas y proteína adaptadoras relacionadas con Ras/MAPK quinasa/</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína 1 supresora de Ras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Familia I del dominio de asociación de Ras (RaIGDS/AF-6)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor de intercambio del nucleótido guanina de Rho/rac (GEF) 2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Familia del gen homólogo Ras, miembro B</li> </ul>
<i>ERK quinasa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína 4 de activación de GTPasa de Rho</li> <li>• MAPKK 5</li> <li>• Proteína 5 que activa la GTPasa de Rho</li> <li>• RAB4, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• Factor que interactúa con RAB</li> <li>• Homólogo del oncogén viral RAS (r-ras)</li> <li>• RAP2A, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• Inhibidor de disociación de GDP de rho humano</li> <li>• MAPKK 1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibidor de disociación GDP de Rho (GDI) <math>\gamma</math></li> <li>• Geranilgeranil-transferasa Rab, subunidad <math>\alpha</math></li> <li>• MAPK 10</li> <li>• RAB13, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• Familia del gen homólogo de Ras, miembro G (rho G)</li> <li>• RAB2, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• MAPK 1</li> <li>• C-src tirosina quinasa</li> <li>• MAPK 14</li> <li>• Proteína 1 que activa GTPasa de Rho</li> <li>• MAPKK 1</li> <li>• Proteína de enlazamiento de ATP(GTP)</li> <li>• Factor que interactúa con RAB</li> <li>• MAPK 6</li> <li>• KAPKK 5</li> <li>• RAB 30, miembro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geranilgeranil-transferasa Rab</li> <li>• Inhibidor 2 de la disociación de GDP de rho humano (IEF 8120)</li> <li>• Adaptador transmembrana que interactúa con SHP2</li> <li>• Activador de la proteína p21 de RAS (proteína de activación GTPasa)1</li> <li>• Tipo proteína rica en ácido glutámico que enlaza al dominio SH3</li> <li>• shc neuronal</li> <li>• MAPKK 1</li> <li>• MAKKK 5</li> <li>• RAB11B, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• GTPasa</li> <li>• RAB5B, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• MAPKAPK 2</li> <li>• MAPK 6</li> <li>• Sustrato I de la toxina botulínica C3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína que activa la GTPasa de Ras</li> <li>• Proteína 2 que enlaza al dominio SH3</li> <li>• Proteína quinasa 1 que contiene la espiral enrollada, asociada con Rho</li> <li>• Tipo RAD54 (<i>S. cerevisiae</i>)</li> <li>• RAB6, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• RAB5A, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• MAPKK 4</li> <li>• Proteína rica en ácido glutámico que enlaza al dominio SH3</li> <li>• MAPK 8</li> <li>• Proteína adaptadora con homología de pleckstrina y dominios de homología 2 de src</li> <li>• Adaptador transmembrana que interactúa con SHP2</li> <li>• Familia del gen homólogo de Ras, miembro H</li> <li>• Proteína 8 que</li> </ul>

	de la familia del oncogén RAS		relacionada con Ras isoforma Rac 1b	interactúa con RaP2
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAB 4, miembro de la familia del oncogén RAS</li> <li>• MAPKK 13</li> <li>• MAP/ERK quinasa quinasa 4, isoforma a</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAB1, miembro de la familia del oncogén ras</li> <li>• RAP1A, miembro de la familia del oncogén ras</li> <li>• MAPKKKK</li> <li>• Proteína 2 que libera guanil de RAS (calcio y DAG-</li> <li>• Regulado por Grb2)</li> <li>• Aglomerante 2 asociado con Grb2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAB5C,</li> <li>miembro del aglomerante 2 asociado con la familia del oncogén RAS</li> </ul>
4) Ruta JAK/STAT y quinasas relacionadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• STAT 2, 113kD</li> <li>• STAT 5B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• STAT 1, 91kδ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• JAK 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• JAK 1</li> <li>• STAT 6, inducido por IL-4</li> <li>• Inhibidor de proteína de STATX</li> <li>• STAT 1, 91kδ</li> <li>• STAT 3</li> <li>(factor de respuesta de fase aguda)</li> </ul>

## Perfil de expresión génica con SOM230 (Continuación)

CLASE	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	TIROIDES
5) <i>Proteína tirosina fosfatasas/otras fosfatasas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PP 1, subunidad reguladora 7</li> <li>• PP 1A (anteriormente 2C), que depende de Mg, <math>\alpha</math> isoforma</li> <li>• PTP</li> <li>• PP 2A, subunidad reguladora B' (PR 53)</li> <li>• PP</li> <li>2A, subunidad reguladora - <math>\beta</math></li> <li>• PTP, no receptora tipo 1</li> <li>• PTP tipo IVA, miembro 3</li> <li>• PP5, subunidad catalítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTP</li> <li>• PP 2 (anteriormente 2A), subunidad reguladora A (PR 65), <math>\alpha</math> Isoforma</li> <li>• PP2A subunidad - <math>\alpha</math></li> <li>• PTP, no receptora tipo 1</li> <li>• PTP, sustrato 1 tipo no receptora</li> <li>• PP 6, subunidad catalítica</li> <li>• PTP, tipo receptora, C</li> <li>• PP 1, subunidad 5 reguladora (inhibidora)</li> <li>• PTP, tipo receptora, polipéptido f (PTPRF), proteína de interacción (liprina), <math>\alpha 1</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfatasa 8 de especificidad dual</li> <li>• Subunidad 1 objetivo de miosina fosfatasa</li> <li>• Fosfatasa 9 de especificidad dual</li> <li>• PTP, no receptora tipo 1</li> <li>• PP 1, subunidad 8 reguladora (inhibidora)</li> <li>• PTP, tipo receptora, N</li> <li>• PTP tipo IVA, miembro 3</li> <li>• PP 5, subunidad catalítica</li> <li>• PTP <math>\sigma</math></li> <li>• Serina/treonina quinasa 14 <math>\alpha</math></li> <li>• Serina/treonina quinasa</li> <li>• Proteína quinasa, activada por AMP, subunidad <math>\gamma</math> 1 no catalítica</li> <li>• Proteína quinasa, que depende de cAMP, catalítica inhibidora <math>\alpha</math></li> <li>• Tirosina (Y) quinasa 1A regulada por fosforilación de especificidad dual</li> <li>• Isoforma I de tirosina (Y) quinasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTP <math>\sigma</math></li> <li>• Fosfatasa y homólogo 2 de tensina</li> <li>• PP 5, subunidad catalítica</li> <li>• PTP, no receptora tipo 6</li> <li>• PP 1A (anteriormente 2C), dependiente de Mg, <math>\alpha</math> isoforma</li> <li>• PTP, tipo receptora, C</li> <li>• PTP, tipo receptora, N</li> <li>• Fosfatidil fosfatasa ácida tipo 2A</li> <li>• PTP, tipo receptora, A</li> <li>• Serina quinasa</li> <li>• Serina/treonina quinasa 25</li> <li>• Proteína serina/treonina quinasa</li> <li>• Quinasa relacionada con Ste-20</li> <li>• Proteína quinasa S6 ribosomal, 90 kD, polipéptido 3</li> <li>• Serina/treonina quinasa</li> </ul>
6) <i>Otras proteínas quinasas y proteínas asociadas de enlazamiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de tirosina quinasa</li> <li>• Proteína quinasa</li> <li>• Serina/treonina quinasa 3</li> <li>• Proteína quinasa tipo SNF1</li> <li>• Serina/treonina quinasa 9</li> <li>• Quinasa asociada a la membrana</li> <li>• Proteína Ser-Thr quinasa relacionada con la proteína quinasa de distrofia miotónica</li> <li>• Proteína quinasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína quinasa, dependiente de cAMP, catalítica, inhibidora <math>\alpha</math></li> <li>• Tirosina quinasa 2</li> <li>• Proteína quinasa</li> <li>• Proteína tirosina quinasa 2 PTK2</li> <li>• Proteína quinasa S6 ribosomal, 90 kD, polipéptido 3</li> <li>• Proteína quinasa, que depende de cAMP, catalítica, <math>\gamma</math></li> <li>• Proteína serina treonina quinasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serina/treonina quinasa 14 <math>\alpha</math></li> <li>• Serina/treonina quinasa</li> <li>• Proteína quinasa, activada por AMP, subunidad <math>\gamma</math> 1 no catalítica</li> <li>• Proteína quinasa, que depende de cAMP, catalítica inhibidora <math>\alpha</math></li> <li>• Tirosina (Y) quinasa 1A regulada por fosforilación de especificidad dual</li> <li>• Isoforma I de tirosina (Y) quinasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serina quinasa</li> <li>• Serina/treonina quinasa 25</li> <li>• Proteína serina/treonina quinasa</li> <li>• Quinasa relacionada con Ste-20</li> <li>• Proteína quinasa S6 ribosomal, 90 kD, polipéptido 3</li> <li>• Serina/treonina quinasa</li> </ul>

que depende de cAMP

- Subunidad reguladora RI-β
- Proteína quinasa S6 ribosomal, 90 kD, polipéptido 4
- Serina/treonina quinasa 25
- Tirosina quinasa 3 relacionada con Fms

2 regulada por fosforilación de especificidad dual

- Serina/treonina quinasa 19

13 (aurora/tipo IPL1)

- Proteína tirosina quinasa
- Quinasa asociada con la membrana
- Isoforma I de tirosina (Y) quinasa 2 regulada por fosforilación de especificidad dual

7) Adenilato/guanilato ciclasas y rutas relacionadas

• Receptor A del péptido natriurético/guanilato ciclasa A (receptor A del péptido atrio natriurético)

↑x2

• Receptor A del péptido natriurético/guanilato ciclasa A (receptor A del péptido atrio natriurético)

↑x6

- Proteína asociada a la adenilil ciclasa
- ↑x1.5

• Precursor del polipéptido que activa la adenilato ciclasa ↓

x1.5

## RECEPTORES CELULARES DE SUPERFICIE

1) Receptores acoplados a la proteína G y proteínas de enlazamiento relacionadas / proteínas G

• Proteína de enlazamiento del nucleótido guanina

(proteína G), β polipéptido 1

• Receptor 20 acoplado a la proteína G

• Receptor 9 acoplado a la proteína G

• Receptor 39 acoplado a la proteína G

• Receptor de quinasa acoplado a la proteína G

• Receptor 15 acoplado a la

• Receptor 12 acoplado a la proteína G

• Receptor de quinasa acoplado a la proteína G

• Receptor 35 acoplado a la proteína G

• Receptor 3 acoplado a la proteína G

• Receptor 39 acoplado a la proteína G

• Regulador de la señalización 6 de la proteína G

• Precursor del

• Proteína 11 de enlazamiento del nucleótido guanina

• Proteína de enlazamiento del nucleótido guanina

(proteína G), B polipéptido 3

• Receptor 56 acoplado a la proteína G

• Regulador de la señalización 9 de la proteína G

• Proteína de enlazamiento del nucleótido guanina

(proteína G), α

• Proteína de enlazamiento del nucleótido guanina

(proteína G), α 15 (clase Gq)

• Proteína G de interacción α que inhibe la actividad del polipéptido 3

• Regulador de señalización de la proteína G

• Proteína 11 de enlazamiento del nucleótido guanina

• Receptor 3 acoplado a la proteína G

• Receptor de



<p>proteína G</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de enlazamiento del nucleótido guanina (proteína G)</li> <li>, β polipéptido 2</li> <li>• Receptor 35 acoplado a la proteína G</li> <li>• SSTR 3 ↑x3</li> <li>• SSTR 2 ↑x2</li> </ul>	<p>receptor tipo 1 del factor II de coagulación (trombina)</p>	<p>11 (clase Gq)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor 35 acoplado a la proteína G</li> <li>• Receptor de angiotensina tipo 1 ↑x1.5</li> <li>• SSTR2 ↑x2</li> <li>• Inhibidor de disociación de GDP</li> </ul>	<p>quinasa 1 acoplado a proteína G</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor para detección de Ca<sup>++</sup> (hipercalcemia hipocalciúrica 1, hiperparatiroidismo neonatal severo)</li> <li>• Receptor acoplado a la proteína G, familia C, grupo 5, miembro B</li> <li>• Proteína 11 de enlazamiento del nucleótido guanina</li> <li>• Isoforma b del receptor de 5-hidroxi-triptamina 7</li> <li>• Desarrollo mentalmente regulado</li> <li>• Proteína 2 de enlazamiento con GTP</li> <li>• Factor I relacionado con diferenciación endotelial ↑</li> </ul>	
<p>2) Factores de crecimiento, sus receptores y proteína de enlace relacionadas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína 7 enlazada a GFR ↑x2</li> <li>• Proteína 14 enlazada a GFR ↑x2</li> <li>• Receptor CSF-1, anteriormente homólogo T x2.5 del oncogén del sarcoma viral felino de Mc Donough (v-fms)</li> <li>• Precursor R de IL-7 ↑x2</li> <li>• PDGFF, α polipéptido ↑x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tirosina quinasa 1 relacionada con Fms (VEGF/receptor del factor de permeabilidad vascular) ↓x1.5</li> <li>• Proteína 2 enlazada a GFR ↓x2.5</li> <li>• GF derivado de hueso ↑x3</li> <li>• Factor 1 de diferenciación de crecimiento ↑x3</li> <li>• TGF, β1 ↓x1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EGF (β-urogastrona) ↓x2</li> <li>• Proteína inducida por TGF ↑x1.5</li> <li>• VEGF ↑x1.5</li> <li>• PDGF α polipéptido ↑x2.5</li> <li>• PDGFR, α polipéptido ↑x1.5</li> <li>• TGF β receptor III (betaglicano, 300 kD)</li> <li>• ↓x1.5</li> <li>HGF activador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• COL1A1 y transcritos de fusión PDGFB ↓x6</li> <li>• Módulo tipo Egf que contiene, la secuencia tipo 1 del receptor de la hormona tipo micina ↓x5</li> <li>PDGFR α</li> <li>↓x3</li> <li>• Tirosina quinasa relacionada con</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TGF, <math>\beta 1 \uparrow \times 1.5</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TGF<math>\beta</math>R III (betaglicano, 300 k<math>\delta</math>) <math>\downarrow \times 2</math></li> <li>• EGF (<math>\beta</math>-urogastrona) <math>\downarrow \times 2.5</math></li> <li>• EGFR (homólogo del oncogén viral de leucemia eritoblástica aviar (v-erb-b)) <math>\uparrow \times 2</math></li> <li>• Factor 2 de respuesta al butirato (factor 2 de respuesta a EGF) <math>\uparrow \times 2</math></li> <li>• FGFR 2 (quinasa expresada por bacterias, receptor del factor de crecimiento de queratinocitos, displasia craneofacial) <math>\uparrow \times 2</math></li> <li>• Proteína 1 que enlaza a la quinasa activada por TGF<math>\beta</math> <math>\uparrow \times 2.5</math></li> <li>• GCSF <math>\uparrow \times 3.5</math></li> <li>• Repeticiones tipo EGF y dominios 3 tipo discoidina I <math>\downarrow \times 15</math></li> <li>• PDGFR, <math>\alpha</math> polipéptido <math>\uparrow \times 2</math></li> <li>• PDGF, <math>\alpha</math> polipéptido <math>\uparrow \times 1.5</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibidor precursor <math>\uparrow</math> <math>\times 1.5</math></li> </ul>	<p>Fms</p> <p>1 (VEGF/receptor del factor de permeabilidad vascular) <math>\downarrow \times 2</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína T asociada con PDGF <math>\times 2</math></li> <li>• PDGFR <math>\beta</math> <math>\uparrow \times 2</math></li> <li>• Cadherina 13, H-cadherina (corazón) <math>\uparrow \times 2</math></li> </ul>
<p>3) Receptor de glutamato  y proteínas de enlazamiento relacionadas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de glutamato, precursor metabotrópico 2 <math>\downarrow \times 3</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de glutamato, metabotrópico 4 <math>\uparrow \times 1.5</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de glutamato, precursor metabotrópico 2 <math>\downarrow \times 3.5</math></li> </ul>	

Perfil de expresión génica con SOM230 (Continuación)

CLASE	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	TIROIDES
<p>PROTEÍNA TRANSPORTADORAS QUE DEPENDEN DE ATP</p> <p><i>Canales de iones y rutas relacionadas</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• familia del portador de soluto 6 (transportador del neurotransmisor, creatina), miembro 8 ↓x3</li> <li>• Canal de Na<sup>+</sup>, no dependiente del voltaje 1, β (síndrome de Liddle) ↓x2</li> <li>• Canal de Ca<sup>++</sup>, dependiente del voltaje, subunidad αH ↑x2</li> <li>• Canal de K<sup>+</sup> dependiente del voltaje, subfamilia relacionada con Shaw, miembro 3 ↑x2.5</li> <li>• Familia del portador de soluto 9 (intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) factor 1 regulador de la isoforma 3 ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de Ca<sup>++</sup>, dependiente del voltaje, tipo P/Q, subunidad alfa 1A ↓x2.5</li> <li>• ATPasa, intercambiador de H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, beta polipéptido ↓x2</li> <li>• familia del portador de soluto 9 (intercambiador de sodio/ hidrógeno), factor regulador 1 de la isoforma 3 ↑x11.5</li> <li>• familia del portador de soluto 11 (simportadores de Na<sup>+</sup>/fosfato), miembro 1 ↑x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de K<sup>+</sup> dependiente del voltaje, subfamilia relacionada con Shaker, miembro 3 ↓x3</li> <li>• familia del portador de soluto 9 (intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) factor regulador 1 de la isoforma 3 ↑x10.5</li> <li>• ATPasa, transportador de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, β1 polipéptido ↑x2.5</li> <li>• Canal activado por Ca<sup>++</sup> de gran conductancia de K<sup>+</sup>, subfamilia M, β miembro 1 ↑x2.5</li> <li>• Canal de Ca<sup>++</sup>, dependiente del voltaje, α2/δ subunidad 2 ↑x1.5</li> <li>• Canal de Ca<sup>++</sup>, dependiente del voltaje, α2/δ subunidad 1 ↑x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de K<sup>+</sup> dependiente del voltaje, subfamilia relacionada con Shaker, miembro 3 ↓x4.5</li> <li>• ATPasa, que transporta Ca<sup>++</sup>, músculo cardíaco, de contracción rápida 1 ↓x4.5</li> </ul>
<p>BIOLOGÍA CELULAR/  FUNCIONES ESPECIALIZADAS</p>				

## Perfil de expresión génica con SOM230 (Continuación)

CLASE	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	TIROIDES
1) <i>Neuromediadores/ neuromoduladores y rutas relacionadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• péptido <math>\delta</math> que índice sueño, inmunoreactor <math>\uparrow</math>x2.5</li> <li>• Receptor opioide, <math>\delta 1</math> <math>\uparrow</math>x2.5</li> <li>• Receptor GABA (A), <math>\gamma 2</math> precursor <math>\uparrow</math>x2</li> <li>• Tipo acetilserotonina</li> <li>• O-metil transferasa <math>\downarrow</math>x3</li> <li>• LIF (factor de diferenciación colinérgica) <math>\uparrow</math>x2</li> <li>• Receptor de dopamina D2 <math>\uparrow</math>x4.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor GABA (A), <math>\gamma 2</math> precursor <math>\uparrow</math>x4</li> <li>• Receptor de dopamina D2 <math>\uparrow</math>x3.5</li> <li>• Proteína asociada con el receptor GABA(A) <math>\uparrow</math>x1.5</li> <li>• Receptor de dopamina D3 <math>\uparrow</math>x2</li> <li>• Péptido <math>\delta</math> que induce sueño, inmunoreactor <math>\uparrow</math>x2.5</li> <li>• Receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 6 <math>\uparrow</math>x2.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de dopamina D4 <math>\downarrow</math>x2</li> <li>• Receptor adrenérgico <math>\alpha</math>-2C <math>\downarrow</math>x2</li> <li>• Quinasa 1 del receptor <math>\beta</math> adrenérgico <math>\uparrow</math>x3</li> <li>• Receptor del polipéptido inhibidor gástrico <math>\uparrow</math>x2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor GABA (A), <math>\gamma 2</math> precursor <math>\downarrow</math>x1.5</li> <li>• Receptor canabinoide 1 del cerebro <math>\downarrow</math>x2</li> <li>• Receptor 1 GABA (B), precursor de la isoforma a <math>\uparrow</math>x2.5</li> <li>• Receptor canabinoide 2 (macrófago) <math>\uparrow</math>x3</li> <li>• Fosfatidil Etanolamina N-metiltransferasa <math>\uparrow</math>x2</li> <li>• Adrenérgico, <math>\alpha</math>-2C-, receptor <math>\downarrow</math>x2.5</li> <li>• Receptor de colepolipéptido inhibidor gástrico <math>\downarrow</math>x3</li> <li>• Receptor del polipéptido 1 inhibidor gástrico <math>\downarrow</math>x2</li> <li>• TSHR <math>\downarrow</math>x2</li> <li>• IGF-1 <math>\downarrow</math>x 1.5</li> <li>• Familia del portador de soluto 21 (transportador PG), miembro 2 <math>\uparrow</math>x2</li> </ul>
2) <i>Secreciones pancreáticas/ gastrointestinales y rutas relacionadas</i>				
3) <i>Hormonas y rutas relacionadas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor 1B de angiotensina <math>\downarrow</math>x1.5</li> <li>• Factor I de enlazamiento de ADN del receptor glucocorticoide <math>\downarrow</math>x4.5</li> <li>• Receptor de insulina <math>\downarrow</math>x3</li> <li>• THR, a (homólogo del oncogén viral de leucemia)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor 1 del promotor de insulina, factor de transcripción del homeodominio <math>\downarrow</math>x1.5</li> <li>• IGF-2 <math>\downarrow</math>x2.5</li> <li>• Precursor de globulina que enlaza al corticosteroide <math>\uparrow</math>x2</li> <li>• Proteína 15 que interactúa con THR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTHR 1 <math>\downarrow</math>x2.5</li> <li>• Receptor 1B de vasopresina arginina <math>\uparrow</math>x2</li> <li>• IGFBP6 <math>\uparrow</math>x2.5</li> <li>• IGF-1 <math>\uparrow</math>x1.5</li> </ul>	

eritroblástica aviar (v- erb-a)) ↑x1.5

↑x1.5

- IGFBP2 ↑x2

- Vasopresina arginina (neurofisisina II, hormona antidiurética, diabetes insípida, neurohipofiseal) ↑x2
- Receptor 2 de vasopresina arginina ↑x2.5
- THR sulfo transferasa ↑x2.5
- Receptor-1 de movilización de calcio inactivado por vasopresina
- Receptor de glucagón ↑x5

1 ↓x2

- Isoforma beta del receptor hormonal tipo 2 de liberación de corticotropina

↑x1.5

- IGF-2 ↓x2
- IGF-1 ↑x2.5
- IGFBP2 ↑x1.5
- Proteína asociada con THR, subunidad de 240kδ ↓x1.5
- Proteína de enlazamiento de THR ↑x1.5
- PG-endoperóxido sintasa 1 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa) ↓

x3.5

- Adrenomedulina ↑

x1.5

- SSTR 3 ↑x3
- SSTR 2 ↑x2

Perfil de expresión génica con SOM230 (Continuación)

CLASE	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	TIROIDES
4) <i>Citoesqueleto y proteínas asociadas</i>	• Precursor VWF ↑x2		• Vasodilatador estimulado por fosfoproteína ↑x2	• Precursor VWF ↑x2
5) <i>Enzimas</i>				• Trombo-espondina 2 ↑x2  • Proteína pro-plaquetaria básica  (incluye proteína plaquetaria básica, β-tromboglobulina, péptido III activador d tejido conectivo, neu) 2 ↑x3.5
<b>INMUNIDAD</b>				
	• TNF, proteína 3 α-inducida  ↓x1.5	• Enzima convertidora de TNF-α  ↓x2	• Proteína quinasa que depende de ARN inducible por IFN  ↑x2.5	• Receptor LTB4  (receptor de quemoquina tipo 1) ↓ x1.5
	• IRF5 ↑x2	• Proteína estimuladora de IFN, 15 kDa ↓x2	• TNF (cachectina) ↑x2	• Quinasa de célula T inducible por IL2
	• Receptor putativo de quemoquina; proteína de enlazamiento de GTP  ↑x2	• Regulador 2 de desarrollo relacionado con IFN ↓x1.5	(ligando)  • Superfamilia de TNF (ligando), miembro 13 ↑x2.5	↓ x12  • P56lck ↓ x18
	• Superfamilia TNFR, miembro 12 ↑x2	• Proteína quinasa que depende de ARN inducible por IFN  ↑x4	• Receptor tipo 1 de IL 1 ↑x2	• RAG1 ↓ x18
		• IL2 R, precursor de cadena γ, ↑x2.5	• Transcripto sensible a IFN <sub>γ</sub>  ↑x2	• Transcripto sensible a IFN <sub>γ</sub>  ↓ x1.5
		• Factor 5 regulador de IFN ↑x2.5	• LTb4 (receptor de quemoquina tipo 1) ↑x3	• Proteína 1A del dominio SH2, enfermedad de Duncan  (síndrome activo linfoproliferador) ↓ x7.5
		• Tirosina quinasa a-gammaglobulinemia de Bruton ↑x1.5	• Receptor putativo de quemoquina; proteína de enlazamiento de GTP	• Antígeno CD2
		• Tirosina quinasa B linfoide		

	<p>↑x3.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transcripto sensible a IFN.γ</li> </ul> <p>↑x1.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Superfamilia de INF (ligando),</li> </ul> <p>miembro 10 ↑x1.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de cierre de leucina inducida por IFN</li> </ul> <p>↑x15</p>	<p>↑x2.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor 2 de IFN.γ ↑ receptor 2 ↑</li> </ul> <p>x1.5</p> <p>(transductor 1 de IFN.γ)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Superfamilia de TNFR</li> </ul> <p>superfamilia,</p> <p>miembro 12 ↑x.15</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-8 receptor tipo - TCR ζ cadena</li> </ul> <p>B ↑ x1.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor 2 regulador de IFN ↑ x3.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antígeno CD2 (p50), receptor de glóbulos rojos de oveja</li> </ul> <p>↓x7.5- precursor de cadena ζ de TCR</p> <p>↓</p> <p>x5.5 • RAG2 ↓ x5</p>
<p>INMUNIDAD</p> <p>(Continuación)</p>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molécula de activación linfocítica de señalización ↓ x4.5</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ligando Flt3</li> </ul> <p>↓ x4.5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína tirosina quinasa específica de linfocito</li> </ul> <p>↓ x4</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quemoquina (motivo C-X-C), receptor 4</li> </ul> <p>(fusina)</p> <p>↓x3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor 7 de transcripción</li> </ul> <p>(célula T específica, caja HMG)</p> <p>↓ x 16.5</p>

- receptor IL9 ↓ x2
- RANTES ↑ x10.5
- Proteína 2 de enlazamiento del antígeno CD2 (cola citoplasmática)  
↑ x3.5
- Proteína 30 inducible por IFN $\gamma$   
↑ x3.5
- Proteína 27 inducible por IFN $\alpha$   
↑ x3
- Superfamilia de TNF (ligando), miembro 10  
↑ x2

CICLO CELULAR

• Cdk (tipo CDC2) ↓ x2	• Cdk1 2D (p19, inhibe CDK4)	• Ciclina I ↓ x1.5	• Cdc tipo 5 (controlador de la división celular relacionada con colinesterasa) ↓ x2
• Específica para detención del crecimiento 6 ↑ x1.5	↓ x2.5	• Proteína 1A asociada con la quinasa de la fase S (p19A) ↑ x2	• Cdk (tipo CDC2) ↓ x9
• Cdk 5, subunidad reguladora 2 (p39) ↑ x1.5	• Cdk tipo-2 ↓ x2	• Cdk 6 ↑ x3	• Cdk 5, subunidad reguladora I (p35) ↓ x5
	• Cdk5, Subunidad reguladora 1 ↑ x2.5	• Cdk5, subunidad reguladora 1 (p35) ↑ x2	• Específica para detención del crecimiento 1 ↓ x2.5
• CDC37 (ciclo de división celular 37, <i>S. cerevisiae</i> , homólogo) ↑ x1.5	• CdkilA (p21/Cip1) ↑ x6	• Ciclina D2 ↑ x1.5	• Ciclina B2 ↓ x2.5
	• Cdk tipo-2 ↓ x2	• Proteína 1A asociada con la quinasa de la fase S	



- Cdk1 1A (p21, = Cip 1) ↑ x5
- Cdk 2 ↑ x1.5
- Folistatina tipo 1 ↑ x1.5

APOPTOSIS

- |   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contiene al dominio efector de muerte ↓ x3.5</li> <li>• Fas/Apo-1/CD95 ↑ x1.5</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• BCL2 tipo 1 ↓ x3.5</li> <li>• Rb I (incluido osteosarcoma) ↓ x2</li> <li>• Proteína 6 ↑ asociada con muerte ↓ x2.5</li> <li>• Proteína para enlazamiento de Rb ↑ x2.5</li> <li>• Rb tipo 2 (p130) ↑ x3</li> <li>• Quinasa serina/treonina activada por Fas ↑ x1.5</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína para enlazamiento de Rb ↑ x2</li> <li>Caspasa 8, Cisteína proteasa relacionada con apoptosis x2.5</li> <li>• TNF (cachectina) ↑ x2</li> <li>• Superfamilia de TNF (ligando), miembro 13 ↑ x2.5</li> <li>• Componente 3 de enlazamiento de Bcl-2 ↑ x2.5</li> <li>• Proteína asociada con muerte ↑ x1.5</li> <li>• Proteína para enlazamiento de la proteína tumoral p53 ↑ x1.5</li> <li>• Proteína 8 para enlazamiento de Rb ↑ x1.5</li> <li>• Muerte celular programada 10 ↑ x1.5</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Componente 3 de enlazamiento de Bcl-2</li> </ul> |
|---|---|--|---|

Estos resultados muestran que se afectaron diferentes rutas de transducción de señal. Ellas incluyen la ruta de fosfatidilinositol/PKC/fosfolipasas/calciocalcineurina-calmodulina, la ruta que depende de Ras/MAPK quinasa/ERK quinasa, la ruta JAK/STAT, y adenilato/guanilato ciclasas con sus rutas dependientes. Los cambios para los receptores de las superficies de la célula incluían numerosos receptores acoplados a la proteína G, receptores para factores de crecimiento y receptores de glutamato. Los cambios en las proteínas de transporte que dependen de

ATP involucraron canales iónicos y proteínas asociadas. Los compuestos también afectaron neuromediadores/neuromoduladores, secreciones pancreáticas y gastrointestinales, hormonas, proteínas del citoesqueleto y enzimas/catalizadores.

- 5 Los ejemplos de genes que reflejan diferentes rutas de señalización de SSTR en la pituitaria se muestran en la Tabla 21. Los genes seleccionados a partir de los listados de genes primarios fueron producidos por medio de una sucesión de algoritmos estadísticos y de filtración (prueba t: valor p: 0,05). Los valores numéricos corresponden al AvgDiff (ver más arriba) del grupo relevante de sondas para cada ensayo con el rango de valores observados entre paréntesis. De interés particular en este análisis fueron los cambios de nivel del transcrito para moléculas que se saben que están estrechamente asociadas con el enlazamiento de los péptidos naturales, SST-14 y SST-28, con los SSTR.
- 10

Tabla 21

Ejemplos de genes que reflejan diferentes rutas de señalización de SSTR en la pituitaria

GENES	CONTROL	SOM230 (0,1 mg/animal/día 14)
<b>TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL</b>		
1) Fofatidil inositol y rutas relacionadas/PKC, fosfolipasas		
• IP-4-fosfatasa, tipo 1, isoforma b	296 (241 a 342)	177 (107 a 232)
• PI-3-quinasa, catalítica, $\delta$ polipéptido	91 (45 a 146)	34 (20 a 67)
• PI-3-quinasa, catalítica, $\alpha$ polipéptido	72 (26 a 135)	21 (20 a 24)
• Proteína de transferencia PI, $\beta$	125 (93 a 187)	42 (34 a 50)
• Inhibidor de PKC	2,351 (2,135 a 2,755)	3,333 (2,339 a 3,878)
• PLC, $\gamma$ 1 (anteriormente subtipo 148)	111 (100 a 131)	40 (20 a 63)
• Inhibidor de PKC	2,351 (2,1345 a 2,755)	3,332 (2,339 a 3,878)
2) Rutas relacionadas con Ras/MAPK quinasa/ERK quinasa y proteínas adaptadoras		
• MAPKKK5	171 (148 a 207)	278 (221 a 351)
• Rab geranilgeraniltransferasa, $\alpha$ subunidad	164 (152 a 173)	104 (70 a 172)
• Rab geranilgeraniltransferasa, $\beta$ subunidad	230 (187 a 250)	284 (246 a 374)
• Proteína adaptadora de SHB (una proteína de homología 2 de Src)	112 (43 a 190)	38 (20 a 55)
• RAB 5C, miembro de la familia del oncogén RAS	72 (20 a 138)	162 (109 a 212)
3) Proteínas tirosina fosfatasas/otras fosfatasas		
• Fosfatasa 8 de especificidad dual	493 (344 a 625)	170 (67 a 238)

(continuación)

Ejemplos de genes que reflejan diferentes rutas de señalización de SSTR en la pituitaria

GENES	CONTROL	SOM230 (0,1 mg/animal/día 14)
<b>TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL</b>		
• Fosfatasa y homólogo de tensina (mutada en múltiples cánceres avanzados 1)	129 (58 a 228)	36 (20 a 63)
• PTP, tipo receptor, T	58 (41 a 78)	101 (48 a 129)
• PP 1, subunidad 5 reguladora (inhibidora)	20	75 (60 a 90)
4) Adenilato/guanilato ciclasas y rutas relacionadas		
• Adenilil ciclasa soluble	54 (51 a 57)	22 (20 a 27)
<b>RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR</b>		
1) Receptores acoplados a la proteína G		
• SSTR3	22 (20 a 24) 22 (20 a 24)	57 (20 a 90) 57 (20 a 90)
2) Receptor de glutamato y proteínas de enlazamiento relacionadas		
• Precursor de GLUR 2	42 (20 a 86)	59 (20 a 177)
<b>PROTEÍNAS DE TRANSPORTE QUE DEPENDEN DE ATP</b>		
Canales iónicos y rutas relacionadas		
ATPasa, que transporta Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , β3 polipéptido	292 (246 a 353)	610 (335 a 949)
ATPasa, que transporta Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , α2 (+) polipéptido	86 (52 a 130)	184 (69 a 325)
ATPasa, que intercambia H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , α polipéptido	128 (50 a 245)	20
Canal de K <sup>+</sup> , subfamilia K, miembro 3 (TASK)	132 (69 a 188)	26 (20 a 43)
Canal de K <sup>+</sup> que depende del voltaje, subfamilia relacionada con Shab, miembro 1	66 (20 a 112)	22 (20 a 31)
ATPasa putativa que transporta Ca <sup>++</sup> 101 (84 a 112)	61 (38 a 98)	101 (84 a 112)

(continuación)

Ejemplos de genes que reflejan diferentes rutas de señalización de SSTR en la pituitaria

GENES	CONTROL	SOM230 (0,1 mg/animal/día 14)
<b>TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL</b>		
<b>CICLO CELULAR</b>		
Factor de enlazamiento del núcleo, dominio runt, $\alpha$ subunidad 2; translocada a, 1; ciclina relacionada con D	225 (113 a 343)	491 (251 a 677)
Caja de Forkhead O3A	497 (447 a 553)	257 (186 a 324)
Caja de Forkhead H1	225 (113 a 343)	117 (251 a 677)
Ciclina F	198 (171 a 229)	74 (48 a 132)
Ciclina D3	187 (173 a 201)	338 (202 a 446)
Respuesta de la fase S (relacionada con ciclina)	91 (88 a 97)	129 (111 a 148)
Ciclo de división celular 25B	40 (20 a 67)	162 (134 a 187)
Inhibidor 2C de Cdk (p18, inhibe CDK4)	81 (58 a 99)	184 (140 a 229)
Inhibidor 2D de Cdk (p19, inhibe CDK4)	198 (171 a 229)	99 (83 a 118)
<b>APOPTOSIS</b>		
Atanógeno asociado con BCL2	216 (207 a 231)	318 (235 a 409)
Antagonista de BCL2 de muerte celular	44 (33 a 47)	69 (42 a 89)
Bax gamma	258 (207 a 297)	326 (221 a 448)
BCL2/proteína 3 que interactúa con adenovirus E1B de 19kD	342 (288 a 401)	458 (388 a 526)
Muerte celular programada 6	504 (443 a 547)	635 (513 a 747)
Proteína amplificada de neuroblastoma	178 (149 a 210)	237 (201 a 258)

- 5 Los efectos sobre la hormona de crecimiento/factor-1 de crecimiento tipo insulina (GH/IGF-1) y los ejes de glucagón/insulina (Macaulay VM, Br J Cancer 65: 311 - 20 (1992); Pollak MN & Schally AV, Proc Soc Exp Biol Med 217: 143 - 52 (1998) se reflejaron en los cambios de nivel del transcripto en diferentes órganos. Los resultados se muestran en la Tabla 22. Además del cambio esperado en el nivel del transcripto IGF- 1, hubo un efecto sobre el factor-2 de crecimiento tipo insulina (IGF-2) también (en la pituitaria y los riñones) que podría ser útil como un
- 10 marcador biológico de la actividad de SOM230 si se refleja en la sangre. Los genes fueron seleccionados como anteriormente en la Tabla 21.

Tabla 22

Genes que reflejan los efectos de SOM230 sobre los ejes de GH/IGF y glucagón/insulina en diferentes tejidos

ÓRGANOS/GENES	CONTROL	SOM230 (0,1 mg/animal/día 14)
<b>PITUITARIA</b>		
IGF-2	126 (40 a 179)	70 (20 a 150)
GR	20	109 (51 a 215)
IGFBP, subunidad lábil al ácido	30 (20 a 49)	83 (20 a 110)
SSTR3	22 (20 a 24)	57 (20 a 90)
<b>GRASA PARDA</b>		
IGF-1	548 (279 a 810)	389 (315 a 449)
IGFBP 4	1410 (916 a 2173)	763 (429 a 1058)
IRS 2	48 (20 a 84)	146 (80 a 222)
SSTR3	25 (20 a 52)	194 (87 a 248)
<b>PÁNCREAS</b>		
IGF-1	20	89 (20 a 298)
SSTR2	258 (205 a 366)	156 (120 a 210)
<b>RIÑÓN</b>		
IR	654 (187 a 1,187)	196 (163 a 265)
IGF-2	117 (47 a 176)	49 (20 a 39)
IGF-1	65 (24 a 103)	25 (20 a 39)
IGFBP2	375 (211 a 625)	563 (457 a 655)
SSTR 3	31 (20 a 69)	82 (33 a 120)
SSTR 2	74 (20 a 153)	126 (93 a 158)
<b>HÍGADO</b>		

(continuación)

Genes que reflejan los efectos de SOM230 sobre los ejes de GH/IGF y glucagón/insulina en diferentes tejidos

ÓRGANOS/GENES	CONTROL	SOM230 (0,1 mg/animal/día 14)
Factor 1 promotor de insulina, factor de transcripción del homeodominio	89 (58 a 160)	42 (23 a 52)
IGF-2	701 (403 a 961)	269 (224 a 291)
IGFBP2	2,722 (1,321 a 3,363)	4,476 (3,191 a 5,422)
GR	44 (20 a 82)	80 (70 a 360)
BAZO		
IGFBP6	495 (130 a 982)	1,043 (853 a 1,155)
IGF-1	72 (42 a 103)	85 (52 a 125)
SSTR2	56 (20 a 83)	93 (87 a 95)
TIROIDES		
IGF-1	91 (20 a 179)	58 (20 a 114)

- 5 Otros genes de interés afectados por SOM230 fueron los niveles de transcrito de los factores de crecimiento (PDGF, FGF, EGF, TGF $\beta$ ), sus receptores y factores de angiogénesis (PDGF, VEGF, trombospondina) involucrados en el crecimiento y esparcimiento de tumor (Woltering EA et al., *New Drugs* 1.5: 77 - 86 (1997)). También se reportó que fueron cambiados los genes para somatostatina y genes análogos involucrados en inmunidad, es decir citoquinas (IL-1, TNF, IFN), reguladores de la génesis y función de células T y B cell (antígeno CD2, receptor de IL-2, tirosina quinasa de linfocito B, quinasa de células T inducible por IL-2, p56lck, RAG1, precursor de la cadena  $\zeta$  de TCR, RAG2, ligando FLT 3) (van Hagen PM et al. *Eur J Clin Invest* 24: 91 - 9 (1994)), así como genes involucrados en el control de la presión arterial y diuresis, es decir el péptido natriurético atrial y su receptor guanilil ciclasa A, arginina vasopresina y su receptor (Aguilera G et al., *Nature* 292: 262 - 3 (1981); Aguilera G et al., *Endocrinology* 111: 1376 - 84 (1982); Ray C et al., *Clin Sci (Lond)* 84: 455 - 60 (1993); Cheng H et al., *Biochem J* 364: 33 - 9 (2002)). Un gen específico involucrado en el control del almacenamiento de grasa es el receptor adrenérgico  $\beta$ 3 en grasa parda (Bachman E et al., *Science* 297: 843 - 45 (2002)).

Los productos proteicos de los genes anteriores son útiles como marcadores sustitutos de la actividad biológica de SOM230, especialmente los hallazgos para IGF-2 en la pituitaria y los riñones.

- 20 En conclusión, el perfil génico de tejidos de mono tratados con SOM230 a nivel subterapéutico es un enfoque sensible para identificar rutas efectoras y de señalización conocidas para somatostatina. El hallazgo de señales transcripcionales claras para este agonista argumenta a favor de una comparación con cambios de expresión génica inducidos por Sandostatin®.

#### EJEMPLO VI

Calcitonina de salmón y pts893, estudios farmacogenómicos exploratorios en monos; análisis de expresión génica de microarreglos

- 25 Las calcitoninas son reguladores endógenos de homeostasis de calcio y pueden ser utilizadas como agentes contra la reabsorción para el tratamiento de trastornos asociados con hipercalcemia. Diferentes calcitoninas, incluida por ejemplo la calcitonina de salmón y de anguila, se encuentran comercialmente disponibles y son comúnmente empleadas en el tratamiento por ejemplo de la enfermedad de Paget y osteoporosis. Ver, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.733.569 y 5.759.565, cuyos contenidos se incorporan como referencia. Ver también, las
- 30 Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.719.122, 5.175.146, y 5.698.6721, y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 003015815. Una versión de calcitonina (Miacalcin®) se encuentra disponible como un aerosol nasal. La información relacionada con la administración del aerosol nasal Miacalcin® (calcitonina de salmón) se encuentra disponible en la Información sobre Prescripción de Miacalcin® (Novartis, Noviembre 2002).

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido de 84 aminoácidos. La hormona paratiroidea regula la remodelación ósea y la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>. La hormona paratiroidea es también un activador paracrino conocido de diferenciación y actividad de osteoclastos. PTS893 es un análogo de la hormona paratiroidea endógena, en la cual se eliminan ciertos sitios de inestabilidad química en fragmentos del terminal N de la hormona paratiroidea haciendo sustituciones apropiadas de aminoácidos en residuos particulares lo que resulta en fragmentos estables y biológicamente activos de la hormona paratiroidea. PTS893 [SDZ PTS 893; Leu8, Asp10, Lys11, Ala16, Gln18, Thr33, Ala34 de la PTH humana 1-34 [hPTH (1 - 34)]] es un análogo paratiroideo de 34 aminoácidos que mejora la masa ósea y las propiedades biomecánicas. Kneissel M et al., Bone 28: 237 - 50 (Marzo 2001); Stewart AF et al., J. Bone Miner. Res. 15(8): 1517 - 25 (Agosto 2000); Thomsen JS et al., Bone 25(5): 561 - 9 (Noviembre 1999). Los fragmentos del terminal N de hormonas paratiroideas humanas incluyen muteínas de hPTH (1-34)OH y muteínas de hPTH(1 - 38)OH. PTS893 incluye al menos las primeras 27 unidades de aminoácidos del terminal N de la hormona paratiroidea. Los derivados preferidos de la hormona paratiroidea son aquellos que contienen al menos una unidad de aminoácido reemplazada en una o más de las siguientes posiciones de la secuencia de la hormona paratiroidea: 8 - 11, 13, 16 - 19, 21, 22, 29 a 34, particularmente 8 - 11, 16 - 19, 33 y/o 34. Estos compuestos exhiben propiedades deseables formadoras de hueso tanto *in vivo* como *in vitro* que son iguales o están por encima del nivel de las PTH naturales y sus fragmentos del terminal N. Ver, la Patente Europea EP 0 672 057; la solicitud de patente PCT publicada WO 94/02510; Kneissel M et al., Bone 28: 237 - 50 (Marzo 2001); Stewart AF et al., J Bone Miner Res 15(8): 1517 - 25 (Agosto 2000); Thomsen JS et al., Bone 25(5): 561 - 9 (Noviembre 1999).

Introducción y resumen. El propósito de este Ejemplo fue evaluar los cambios de expresión génica en monos cinomólogos después de un tratamiento subcutáneo de dos semanas con calcitonina de salmón (sCT) a razón de 50 µg/animal/día y PTS893 a razón de 5 µg/animal/día para elucidar los mecanismos de acción que median sus efectos así como la identificación de biomarcadores de indicaciones terapéuticas. Este Ejemplo se cree que es el primer análisis que describe en forma global los mecanismos moleculares de acción de la calcitonina de salmón y un análogo de hormona paratiroidea por medio del análisis del perfil génico en múltiples órganos en primates. Este análisis también se cree que es el primer análisis del perfil génico que describe los mecanismos moleculares de acción de remodelación ósea mediada por hormonas por parte de la calcitonina de salmón y PTS893.

En este Ejemplo, se encontró que tanto la calcitonina de salmón como PTS993 tienen efectos moduladores sobre genes que afectan la regulación directa, autocrina, paracrina y endocrina de las funciones mesenquimales de la célula tales como la transformación de las betas del factor de crecimiento (TGF-β), de los factores de crecimiento tipo insulina (IGF), de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ambos compuestos también regulan la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular. La calcitonina de salmón también regula el receptor de estrógeno y el factor esteroideogénico, mientras que PTS893 produjo un fuerte favorecimiento de la expresión sobre receptores nucleares de la familia del receptor esteroideo/tiroideo. Estos datos soportan por lo tanto el papel de la calcitonina como un agente anabólico.

Además, la calcitonina de salmón y PTS893 también influenciaron algunos aspectos de la mineralización de la matriz extracelular, ya que se observaron cambios en amelogenina, dentina y ectonucleótido pirofosfatasas.

Además, PTS893 mostró un efecto sobre la mediación de la activación paracrina de la diferenciación y actividad del osteoclasto, a través de citoquina y el ligando RANK.

Ninguna de las diferencias significativas en el perfil de expresión génica fue atribuible al hecho de la administración de calcitonina de salmón y PTS893 en combinación, con respecto a la terapia única.

Por lo tanto, el análisis de perfil génico en este Ejemplo permitió la reconstrucción de las rutas involucradas en la traducción de la señal de la calcitonina y la hormona paratiroidea, activadas por la estimulación del receptor enlazado a la proteína G y su influencia sobre el ciclo celular, como se indica por medio de los cambios observados en las ciclinas.

Animales. Se llevó a cabo un tratamiento subcutáneo de dos semanas con calcitonina de salmón (sCT), PTS893 o una combinación de los dos, cada uno de los cuales se disolvió en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene 9% de suero autólogo. Se utilizó un solvente como vehículo para el grupo de control.

Los animales utilizados en este análisis fueron monos cinomólogos (*Macaca fascicularis*), suministrados por el Centre de Recherches Primatologiques, Port Louis, Mauritius. Se utilizaron dos animales, por grupo y por sexo. Al comienzo del período de tratamiento, los animales tenían al menos 24 meses de edad, con un peso corporal de aproximadamente 3 kg. Se mantuvieron los animales bajo condiciones estándar para el bienestar de los mismos. Se examinaron los animales diariamente en cuanto a mortalidad, consumo de alimento y observaciones clínicas. Se registró el peso corporal una vez por semana. Las dosis fueron de 0 µg/animal/día (como control), 50 µg/animal/día de calcitonina de salmón y 5 µg/animal/día de PTS893.

Exámenes *In vivo*. No se observaron cambios histopatológicos significativos. No se observaron cambios relevantes diferentes a una disminución del peso corporal en el rango de 8 a 12% en el grupo de calcitonina de salmón. Se observe también una disminución en el consume de alimento, aunque no siempre consistente con la disminución en el peso corporal.

5

Tabla 23

Consumo de alimento - Machos

Control											
Día	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5
Animal no. W62S01	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Animal no. W62S02	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	25
Día	6	7	8	9	10	11	12	13	14		Prom.
Animal no. W62S01	75	100	100	100	100	100	100	25			91.7
Animal no. W62S02	100	75	75	100	100	100	75	100	50		91.7
Ambos animales											91.7
Calcitonina de salmón											
Día	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5
Animal no. W62503	50	75	50	75	100	75	75	25	50	100	100
Animal no. W62504	50	75	75	75	100	75	50	25	100	75	100
Día	6	7	8	9	10	11	12	13	14		Prom.
Animal no. W62503	75	100	100	100	100	75	75	25			70.8
Animal no. W62504	75	75	75	100	100	75	75	25	75	75	75.0
Ambos animales											72.9
PTS893											
Día	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5
Animal no. W62505	50	100	100	100	75	100	100	100	100	100	100
Animal no. W62506	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Día	6	7	8	9	10	11	12	13	14		Prom.
Animal no. W62505	100	100	100	100	100	100	100	50	75		87.5
Animal no. W62506	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	91.7
Ambos animales											89.6



5 Los animales a los cuales se les suministró calcitonina de salmón presentaron una disminución en el peso corporal en el rango entre 8 y 12%, que puede ser atribuido a una disminución en el consumo de alimento. Se había descrito previamente un efecto anoréctico para la calcitonina de salmón que actúa a través de receptores de amilina Eiden S et al., J. Physiol. 541(pt3): 1041 - 1048 (2002); Lutz TA et al., Peptides 21 (2): 233 - 8 (2000). Sin embargo, no se observaron signos de toxicidad aquí. Los cambios hormonales y lipídicos observados en este Ejemplo están más probablemente relacionados con una consecuente adaptación metabólica.

No se observaron cambios relevantes en los electrocardiogramas (ECG) o en la presión arterial.

Tabla 24

Presión arterial

Número del animal	Sexo	Compuesto administrado	Semana 1 (mm Hg)	Semana 2 (mm Hg)	Diferencia (mm Hg)
W62501	Macho	Control	121	98	-23
W62501	Macho	Control	90	29	-61
W62502	Macho	Control	86	107	21
W62502	Macho	Control	26	34	8
W62503	Macho	Calcitonina de salmón	135	99	-36
W62503	Macho	Calcitonina de salmón	61	40	-21
W62504	Macho	Calcitonina de salmón	102	79	-23
W62504	Macho	Calcitonina de salmón	56	35	-21
W62505	Macho	PTS893	76	87	11
W62505	Macho	PTS893	18	22	4
W62506	Macho	PTS893	106	101	-5

(continuación)

## Presión arterial

Número del animal	Sexo	Compuesto administrado	Semana 1 (mm Hg)	Semana 2 (mm Hg)	Diferencia (mm Hg)
W62506	Macho	PTS893	53	33	-20
W62551	Hembra	Control	96	76	-20
W62551	Hembra	Control	27	26	-1
W62552	Hembra	Control	102	93	-9
W62552	Hembra	Control	26	36	10
W62553	Hembra	Calcitonina de salmón	98	82	-16
W62553	Hembra	Calcitonina de salmón	50	25	-25
W62554	Hembra	Calcitonina de salmón	92	44	-48
W62554	Hembra	Calcitonina de salmón	26	30	4
W62555	Hembra	PTS893	92	70	-22
W62555	Hembra	PTS893	43	42	-1
W62556	Hembra	PTS893	78	87	9
W62556	Hembra	PTS893	24	28	4

5 *Muestreo de sangre.* Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de la recolección de sangre pero tuvieron acceso libre al agua. Se tomaron las muestras de sangre de una vena periférica. Los análisis estándar de química clínica y hematología fueron realizados una vez durante el análisis previo y al final del período de tratamiento. Las muestras de sangre fueron recolectadas de cada animal en los mismos intervalos descritos para las investigaciones de química clínica. Se ultracongelaron las muestras de suero (aproximadamente a -80°C) hasta la determinación de los análisis para la hormona.

10 Determinaciones de la hormona y de química clínica. Se observó una ligera anemia en todos los animales del estudio, incluidos los controles. Esto fue atribuido al muestreo repetido de sangre y no se consideró que fuera relevante.

Tabla 25

## Hematología - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
WBC	G/l	10.0	11.1	12.9	6.1	11.2	6.3
RBC	T/l	7.3	6.5	6.4	6.8	6.5	6.2
HB	g/dl	12.9	11.9	11.7	13.1	12.3	11.9
PCV	l/l	0.44	0.40	0.44	0.42	0.41	0.41
MCV	fl	60	61	68	61	63	66
MCH	Pg	17.8	18.2	18.1	19.3	19.0	19.0
MCHC	g/dl	29.8	29.6	26.8	31.5	30.1	28.9
PLAT	G/l	316	371	266	458	500	547
N	G/l	6.46	4.93	3.65	2.09	6.77	1.24
E	G/l	0.01	0.14	0.20	0.10	0.10	0.10
B	G/l	0.02	0.03	0.06	0.02	0.02	0.00
L	G/l	3.05	5.45	8.44	3.60	3.65	4.51
M	G/l	0.46	0.51	0.54	0.33	0.64	0.46

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
WBC	G/l	7.7	11.8	8.0	11.5	9.5	8.8
RBC	T/l	6.3	5.9	5.6	6.9	6.0	5.4
HB	g/dl	12.6	11.7	11.2	13.6	11.5	10.3
PCV	l/l	0.40	0.39	0.39	0.43	0.37	0.36
MCV	fl	64	66	70	62	62	67
MCH	Pg	20.2	19.9	20.2	19.7	19.2	19.2
MCHC	g/dl	31.4	30.3	29.0	32.0	31.3	28.7
PLAT	G/l	351	396	302	247	330	389

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
N	G/l	3.36	4.11	1.90	3.93	3.31	3.04
E	G/l	0.02	0.10	0.13	0.16	0.09	0.01
B	G/l	0.02	0.04	0.03	0.08	0.04	0.03
L	G/l	4.00	6.79	5.38	6.55	5.57	4.92
M	G/l	0.30	0.73	0.57	0.76	0.45	0.76

Hematología - Machos							
PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
WBC	G/l	10.4	8.4	8.8	9.1	15.0	11.9
RBC	T/l	7.6	6.4	6.8	6.5	5.9	5.8
HB	g/dl	13.6	11.3	11.7	13.2	11.9	11.8
PCV	l/l	0.43	0.38	0.43	0.40	0.40	0.41
MCV	fl	57	60	63	62	67	70
MCH	Pg	18.0	17.7	17.3	20.4	20.2	20.3
MCHC	g/dl	31.5	29.3	27.5	33.1	30.2	29.2
PLAT	G/l	325	456	330	459	589	452
N	G/l	4.45	1.77	2.88	4.80	8.73	6.51
E	G/l	0.21	0.30	0.19	0.03	0.08	0.07
B	G/l	0.00	0.02	0.04	0.02	0.03	0.03
L	G/l	5.07	5.91	5.37	3.99	5.30	4.86
M	G/l	0.62	0.39	0.27	0.27	0.83	0.46

d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación

d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación

Tabla 26

## Hematología - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
WBC	pg/ml	8.2	13.7	10.0	10.1	9.1	10.4
RBC	nmol/l	6.5	6.2	5.8	6.7	6.2	5.8
HB	pg/ml	12.8	11.8	11.3	13.1	11.7	11.4
PCV	mU/l	0.42	0.43	0.41	0.42	0.42	0.41
MCV	pg/ml	64	69	71	63	68	70
MCH	ng/ml	19.7	19.1	19.4	19.5	18.9	19.5
MCHC	pg/ml	30.6	27.7	27.4	30.9	27.7	27.9
PLAT	nmol/l	463	445	468	286	292	275
N	nmol/l	4.45	5.86	3.53	6.69	3.13	4.23
E	mU/l	0.03	0.13	0.12	0.01	0.15	0.19
B	pg/ml	0.03	0.07	0.04	0.02	0.03	0.03
L	pg/ml	3.40	7.09	5.91	3.14	5.39	5.34
M	nmol/l	0.27	0.51	0.39	0.25	0.39	0.59

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación

Tabla 27

## Hematología - Hembras

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
WBC	pg/ml	7.0	9.5	12.0	8.3	17.0	13.3
RBC	nmol/l	6.5	6.2	5.2	7.0	6.6	5.7
HB	pg/ml	12.3	11.5	10.1	13.8	12.7	11.0
PCV	mU/l	0.40	0.40	0.33	0.45	0.44	0.37

# ES 2 365 852 T3

(continuación)

## Hematología - Hembras

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
MCV	pg/ml	61	64	64	65	68	65
MCH	ng/ml	19.1	18.6	19.5	19.8	19.4	19.5
MCHC	pg/ml	31.2	29.0	30.3	30.6	28.7	29.9
PLAT	nmol/l	549	594	451	304	356	229
N	nmol/l	3.45	3.83	5.41	3.13	9.82	6.16
E	mUI/l	0.03	0.36	0.73	0.03	0.04	0.06
B	pg/ml	0.02	0.03	0.03	0.01	0.07	0.05
L	pg/ml	3.26	4.61	5.18	4.79	6.21	6.58
M	nmol/l	0.25	0.63	0.69	0.30	0.82	0.39

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
WBC	pg/ml	10.1	18.4	13.2	14.3	12.3	10.1
RBC	nmol/l	6.9	6.2	5.9	6.7	6.4	5.9
HB	pg/ml	13.4	11.7	11.3	12.9	12.1	11.3
PCV	mUI/l	0.44	0.41	0.40	0.43	0.43	0.39
MCV	pg/ml	63	67	67	64	68	66
MCH	ng/ml	19.3	18.9	19.3	19.3	19.0	19.2
MCHC	pg/ml	30.6	28.2	28.6	30.2	28.1	29.2
PLAT	nmol/l	501	525	496	213	382	309
N	nmol/l	5.34	10.8	6.36	9.05	5.49	4.18
E	mUI/l	0.00	0.12	0.21	0.26	0.49	0.29
B	pg/ml	0.00	0.06	0.03	0.03	0.04	0.04

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
L	pg/ml	3.92	6.29	5.81	4.40	5.87	5.21
M	nmol/l	0.80	1.12	0.82	0.54	0.44	0.37

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación

- 5 Entre los ensayos estándar de química clínica llevados a cabo, se observaron disminuciones entre ligeras y moderadas en fósforo y/o magnesio y una disminución entre moderada y marcada en triglicéridos en los grupos administrados de calcitonina de salmón y PTS893.

Tabla 28

Química clínica - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
Na+	mmol/l	154	151	153	152	153	148
K+	mmol/l	4.05	5.31	4.26	4.09	4.05	4.51
Cl-	mmol/l	109	113	108	107	110	111
Ca++	mmol/l	2.57	2.47	2.69	2.72	2.52	2.75
LPHOS	mmol/l	2.21	1.93	2.76	1.88	1.69	1.99
Mg++	mmol/l	1.09	0.91	0.95	0.88	0.79	1.14
GLUC	mmol/l	3.85	4.51	4.68	3.44	5.30	6.13
UREA	mmol/l	9.7	4.9	5.0	7.6	6.1	5.2
CREAT	p.mol/l	85	60	75	65	55	57
TOT.BIL.	p.mol/l	6.0	2.0	2.0	7.0	3.0	4.0
PROT	g/l	89	80	88	90	83	85
A/G		1.89	1.57	1.45	1.62	1.53	1.50
COL.	mmol/l	3.30	3.20	3.50	3.30	3.40	3.10

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Química clínica - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
HDL-COL.	mmol/l	1.49	1.45	1.70	1.54	1.45	1.49
LDL-COL.	mmol/l	1.63	1.62	1.84	1.56	1.93	1.49
TRIG	mmol/l	0.94	0.36	0.43	0.65	0.36	0.45
ALP	IU/l	1559	1241	1313	1463	1423	1493
BAP-E	IU/l	543	439	457	452	476	464
ASAT	IU/l	22	22	25	30	26	26
ALAT	IU/l	22	32	30	29	41	37
CK	IU/l	150	45	127	74	67	102
LDH	IU/l	392	585	549	421	518	592
GGT	IU/l	128	92	111	89	71	75
ALB	%	65	61	59	62	61	60
A1-GLOB	%	1.90	2.70	2.50	1.90	2.10	2.30
A2-GLOB	%	7.60	8.30	7.90	8.20	8.90	8.50
B-GLOB	%	16	18	19	18	19	19
G-GLOB	%	9.2	9.9	10.9	9.6	9.3	10.2
ALB	g/l	58	49	52	56	50	51
A1-GLOB	g/l	1.70	2.20	2.20	1.70	1.70	2.00
A2-GLOB	g/l	6.80	6.60	7.00	7.40	7.40	7.20
B-GLOB	g/l	14	14	17	17	16	16
G-GLOB	g/l	8.2	7.9	9.6	8.6	7.7	8.7



ES 2 365 852 T3

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
Na+	mmol/l	151	145	148	154	142	144
K+	mmol/l	4.24	4.90	4.34	4.85	5.15	4.48
Cl <sup>-</sup>	mmol/l	107	104	104	113	106	101
Ca <sup>++</sup>	mmol/l	2.66	2.68	2.91	2.71	2.54	2.73
I. FOS.	mmol/l	2.05	1.67	2.06	2.10	1.73	1.94
Mg <sup>++</sup>	mmol/l	0.97	0.68	0.73	0.99	0.71	0.72
GLUC	mmol/l	3.57	3.58	4.29	3.70	4.98	6.19
UREA	mmol/l	7.9	1.3	2.9	6.6	3.3	2.9
CREAT	p.mol/l	78	57	62	64	50	56
TOT. BIL.	p.mol/l	5.0	2.0	1.0	3.0	2.0	2.0
PROT	g/l	87	82	87	91	83	89
A/G		1.76	1.68	1.42	1.42	1.26	1.05
COL.	mmol/l	3.30	3.60	3.70	3.80	3.90	3.40
HDL-COL.	mmol/l	1.49	2.09	2.44	1.46	1.48	1.39
LDL-COL.	mmol/l	1.21	1.28	1.26	1.87	2.51	1.83
TRIG	mmol/l	0.96	0.24	0.27	0.92	0.22	0.68
ALP	IU/l	1488	1023	1226	857	587	626
BAP-E	IU/l	508	363	302	311	188	180
ASAT	IU/l	28	31	28	24	17	24
ALAT	IU/l	38	39	43	48	24	31
CK	IU/l	124	56	119	75	45	173
LDH	IU/l	439	400	427	356	384	519
GGT	IU/l	105	80	75	121	75	69
ALB	%	64	63	59	59	56	51
A1-GLOB	%	1.60	2.00	2.40	1.90	2.80	3.60

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
A2-GLOB	%	8.00	8.80	8.80	8.70	8.70	7.80
B-GLOB	%	18	18	20	19	21	24
G-GLOB	%	8.3	8.5	9.7	12.0	12.1	13.6
ALB	g/l	56	51	51	54	46	46
A1-GLOB	g/l	1.40	1.60	2.10	1.70	2.30	3.20
A2-GLOB	g/l	7.00	7.20	7.70	7.90	7.20	6.90
B-GLOB	g/l	16	15	18	17	17	21
G-GLOB	g/l	7.2	7.0	8.4	10.9	10.0	12.1
PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
Na+	mmol/l	151	151	152	151	149	149
K+	mmol/l	5.13	4.00	4.27	4.72	4.76	4.12
Cl-	mmol/l	110	107	110	112	106	106
Ca++	mmol/l	2.81	2.39	2.59	2.64	2.45	2.51
I. FOS.	mmol/l	2.59	1.68	2.22	2.12	1.12	1.77
Mg++	mmol/l	1.04	0.71	0.77	0.97	0.70	0.76
GLUC	mmol/l	5.09	4.76	5.42	3.88	5.26	4.96
UREA	mmol/l	11.6	3.7	6.4	15.0	4.9	5.8
CREAT	p.mol/l	86	66	79	77	63	70
TOT. BIL.	p.mol/l	5.0	2.0	1.0	7.0	2.0	1.0
PROT	g/l	81	74	81	88	86	89
A/G		1.89	1.70	1.76	1.58	1.28	1.40
COL.	mmol/l	3.20	3.30	3.10	2.50	2.50	2.60

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
HDL-COL.	mmol/l	1.49	1.49	1.61	1.24	1.25	1.38
LDL-COL.	mmol/l	1.39	1.73	1.51	1.27	1.22	1.38
TRIG	mmol/l	0.96	0.30	0.63	0.49	0.39	0.35
ALP	IU/l	1703	1494	1768	1414	1363	1486
BAP-E	IU/l	523	532	564	445	423	497
ASAT	IU/l	24	18	24	25	27	29
ALAT	IU/l	32	30	27	23	19	20
CK	IU/l	111	82	148	86	73	125
LDH	IU/l	367	400	528	354	432	464
GGT	IU/l	133	99	105	112	85	91
ALB	%	66	63	64	61	56	59
A1-GLOB	%	2.20	2.80	2.60	2.40	3.60	2.80
A2-GLOB	%	8.80	8.90	8.70	7.30	8.30	7.50
B-GLOB	%	17	18	19	19	22	20
G-GLOB	%	6.9	6.9	6.3	9.8	10.5	10.9
ALB	g/l	53	47	52	54	48	52
A1-GLOB	g/l	1.80	2.10	2.10	2.10	3.10	2.50
A2-GLOB	g/l	7.10	6.60	7.10	6.40	7.10	6.70
B-GLOB	g/l	14	14	15	17	19	18
G-GLOB	g/l	5.6	5.1	5.1	8.6	9.0	9.7

d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.  
d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

Tabla 29

## Química clínica - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
Na+	mmol/l	152	148	155	148	150	148
K+	mmol/l	4.16	4.23	4.92	3.82	4.11	5.27
Cl-	mmol/l	110	105	111	109	106	108
Ca++	mmol/l	2.64	2.61	2.61	2.48	2.44	1.80
I. FOS.	mmol/l	1.98	2.61	2.28	1.84	1.98	1.84
Mg++	mmol/l	1.00	0.97	1.03	0.88	0.84	0.31
GLUC	mmol/l	3.65	8.39	3.86	2.79	3.86	3.60
UREA	mmol/l	11.0	8.3	8.2	11.3	6.9	6.3
CREAT	p.mol/l	73	77	62	67	60	50
TOT. BIL.	p.mol/l	4.00	2.00	3.00	5.00	1.00	2.00
PROT	g/l	85	80	80	83	83	77
A/G		1.77	1.67	1.55	1.68	1.39	1.27
COL.	mmol/l	3.20	2.80	3.00	3.70	3.40	3.50
HDL-COL.	mmol/l	1.63	1.44	1.49	1.75	1.82	1.80
LDL-COL.	mmol/l	1.55	1.25	1.90	1.57	1.28	1.66
TRIG	mmol/l	0.64	0.54	0.57	0.83	0.48	0.50
ALP	IU/l	1037	1088	1187	1332	1298	1182
BAP-E	IU/l	310	369	346	432	419	379
ASAT	IU/l	27	33	31	21	22	23
ALAT	IU/l	44	52	46	16	19	20
CK	IU/l	69	169	81	83	68	87
LDH	IU/l	420	520	481	474	471	516
GGT	IU/l	104	95	102	84	67	66
ALB	%	64	63	61	63	58	56

# ES 2 365 852 T3

(continuación)

## Química clínica - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
A1-GLOB	%	1.90	2.60	3.40	2.00	2.60	3.50
A2-GLOB	%	8.00	7.60	7.70	7.00	8.10	7.70
B-GLOB	%	17	18	18	15	18	18
G-GLOB	%	9.4	9.2	9.9	12.9	13.2	14.8
ALB	g/l	54	50	49	52	48	43
A1-GLOB	g/l	1.60	2.10	2.70	1.70	2.20	2.70
A2-GLOB	g/l	6.80	6.10	6.20	5.80	6.70	5.90
B-GLOB	g/l	14	14	15	13	15	14
G-GLOB	g/l	8.0	7.4	7.9	10.7	11.0	11.4
Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
Na+	mmol/l	145	147	147	145	143	147
K+	mmol/l	3.51	3.73	4.62	3.89	4.07	4.95
Cl-	mmol/l	106	104	107	100	96	107
Ca++	mmol/l	2.62	2.77	2.57	2.73	2.91	2.68
I.FOS.	mmol/l	1.62	1.48	1.81	1.97	1.75	1.83
Mg++	mmol/l	0.87	0.63	0.76	0.91	0.77	0.80
GLUC	mmol/l	3.84	4.88	4.98	4.11	5.31	4.04
UREA	mmol/l	10.3	6.6	5.0	10.0	6.3	5.9
CREAT	p.mol/l	81	71	61	88	77	65
TOT. BIL.	p.mol/l	3.00	2.00	2.00	6.00	5.00	2.00
PROT	g/l	88	90	80	91	95	83
A/G		1.46	1.45	1.30	1.48	1.42	1.26

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
COL.	mmol/l	2.70	2.80	2.20	3.30	4.00	3.00
HDL-COL.	mmol/l	1.04	1.11	0.96	1.46	1.99	1.66
LDL-COL.	mmol/l	1.61	1.51	1.46	1.13	1.93	1.42
ALP	IU/l	1197	965	842	1132	877	890
BAP-E	IU/l	416	326	304	344	325	294
ASAT	IU/l	24	21	25	20	18	20
ALAT	IU/l	21	24	19	19	14	19
CK	IU/l	99	72	107	76	64	77
LDH	IU/l	286	423	429	319	372	363
GGT	IU/l	88	63	54	82	72	62
ALB	%	59	59	57	60	59	56
A1-GLOB	%	2.70	2.70	3.10	2.20	2.20	3.10
A2-GLOB	%	6.50	6.10	6.80	8.00	7.70	7.80
B-GLOB	%	21	23	21	15	17	17
G-GLOB	%	10.8	8.6	12.4	14.9	14.6	16.3
ALB	g/l	52	54	45	54	56	46
A1-GLOB	g/l	2.40	2.40	2.50	2.00	2.10	2.60
A2-GLOB	g/l	5.70	5.50	5.40	7.30	7.30	6.50
B-GLOB	g/l	18	21	17	14	16	14
G-GLOB	g/l	9.5	7.7	9.9	13.6	13.9	13.5

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

ES 2 365 852 T3

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayos	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
Na+	mmol/l	153	151	152	150	148	149
K+	mmol/l	4.82	4.54	4.63	3.85	3.81	4.31
Cl-	mmol/l	107	109	111	108	107	114
Ca++	mmol/l	2.77	2.61	2.20	2.64	2.62	2.35
I.PHOS	mmol/l	2.11	1.31	1.51	2.10	1.60	1.50
Mg++	mmol/l	0.96	0.65	0.59	0.90	0.74	0.66
GLUC	mmol/l	3.57	4.18	3.59	3.22	4.45	3.52
UREA	mmol/l	8.2	8.7	6.3	8.4	6.6	6.8
CREAT	p.mol/l	77	62	58	68	63	58
TOT.BIL.	p.mol/l	5.00	1.00	2.00	5.00	2.00	2.00
PROT	g/l	89	87	78	84	83	76
A/G		1.64	1.62	1.65	1.84	1.78	1.50
CHOL	mmol/l	2.90	2.70	2.80	2.70	2.40	2.70
HDL-CHOL	mmol/l	1.31	1.48	1.51	1.12	0.99	1.25
LDL-CHOL	mmol/l	1.69	1.12	1.71	1.62	1.28	1.58
TRIG	mmol/l	0.59	0.27	0.25	0.67	0.34	0.47
ALP	IU/l	1535	1223	1332	1638	1307	1313
BAP-E	IU/l	457	350	426	456	390	400
ASAT	IU/l	23	18	25	24	20	25
ALAT	IU/l	35	25	32	33	19	21
CK	IU/l	84	65	175	63	144	172
LDH	IU/l	468	465	557	309	313	358
GGT	IU/l	85	71	70	103	85	83
ALB	%	62	62	62	65	64	60
A1-GLOB	%	2.30	2.50	2.50	1.90	2.10	2.70

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayos	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
A2-GLOB	%	7.50	8.00	8.30	7.50	7.50	8.10
B-GLOB	%	18	19	18	17	17	20
G-GLOB	%	9.7	8.4	8.7	8.8	9.1	8.7
ALB	g/l	55	54	49	55	53	46
A1-GLOB	g/l	2.10	2.20	2.00	1.60	1.70	2.10
A2-GLOB	g/l	6.70	7.00	6.50	6.30	6.20	6.20
B-GLOB	g/l	16	17	14	14	14	16
G-GLOB	g/l	8.6	7.3	6.8	7.4	7.6	6.6

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

- 5 No se observaron cambios relevantes en los ensayos estándar de análisis de orina realizados.

Tabla 30

Análisis de orina - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	-6	-5	13	-6	-5	13
VOLUMEN	ml	15	10	77	22	130	30
CREAT	µmol/l	18000	17000	5460	7920	2480	5160
NTx	nM BCE	-	9954	3425	-	11979	3167
CTx	µg/l	-	21592	6810	-	27169	5323
D-PYR	nmol/l	-	2345	1110	-	2904	1461
LDH	IU/L	6.0		nd	8.0		8.0
NAG	IU/l	3.5		1.5	3.2		1.6



(continuación)

Análisis de orina - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	-6	-5	13	-6	-5	13
Na+	mmol/l	163		43	87		77
K+	mmol/l	258		67	125		75
Cl-	mmol/l	132		43	52		59
Ca <sup>2+</sup>	mmol/l	5.15		16.80	15.95		15.50
I.FOS.	mmol/l	11.10		1.05	11.30		8.90
Mg <sup>2+</sup>	mmol/l	2.75		7.50	7.85		6.25
Na/Crea	mM/mM	9.10		7.90	11.00		14.90
K/Crea	mM/mM	14.30		12.20	15.80		14.50
Cl/Crea	mM/mM	7.40		7.90	6.50		11.40
Ca/Crea	mM/mM	0.29		3.08	2.01		3.00
Pho/Crea	mM/mM	0.62		0.19	1.43		1.73
Mg/Crea	mM/mM	0.20		1.40	1.00		1.20
LDH/crea	IU/mM	0.33		nd	1.01		1.55
NAG/crea	IU/mM	0.19		0.28	0.40		0.31
NTx/Crea	nME/mM		586	627		4830	614
CTx/Crea	µg/µm		1270	1247		10955	1032
Pyr/Crea	nM/mM		138	203		1171	283

d-6, d-5 y d13 indican día -6, día -5 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

ES 2 365 852 T3

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	-6	-5	13	-6	-5	13
VOLUMEN	ml	62	38	68	37	10	54
CREAT	µmol/l	4300	7840	4620	13600	17360	4400
NTx	nM BCE	-	6023	5186	-	16067	3790
CTx	µg/l	-	11618	10088	-	26370	6130
D-PYR	nmol/l	-	1733	1083	-	5113	1476
LDH	IU/L	9.0		7.0	13.0		17.0
NAG	IU/l	2.7		1.4	4.2		7.2
Na+	mmol/l	22		14	119		15
K+	mmol/l	65		78	134		76
Cl-	mmol/l	10		55	64		68
Ca2+	mmol/l	0.90		18.25	3.70		23.40
I.FOS.	mmol/l	4.35		2.50	5.33		3.00
Mg2+	mmol/l	1.40		7.05	7.55		9.80
Na/Crea	mM/mM	5.20		3.10	8.70		3.40
K/Crea	mM/mM	15.10		16.90	9.90		17.20
Cl/Crea	mM/mM	2.20		11.80	4.70		15.30
Ca/Crea	mM/mM	0.21		3.95	0.27		5.32
Pho/Crea	mM/mM	1.01		0.54	0.39		0.68
Mg/Crea	mM/mM	0.30		1.50	0.60		2.20
LDH/crea	IU/mM	2.09		1.52	0.96		3.86
NAG/crea	IU/mM	0.63		0.30	0.31		1.64
NTx/Crea	nME/mM		768	1123		926	861

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	-6	-5	13	-6	-5	13
CTx/Crea	p.g/p.m.		1482	2184		1519	1393
Pyr/Crea	nM/mM		221	234		295	336

PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	-6	-5	13	-6	-5	13
VOLUMEN	ml	14	14	48	58	34	130
CREAT	μmol/l	16160	16160	7840	9940	16120	3840
NTx	nM BCE	-	5403	4871	-	8757	2102
CTx	μg/l	-	11865	9365	-	20108	3705
D-PYR	nmol/l	-	1660	1676	-	2278	782
LDH	IU/L	7.0		14.0	9.0		19.0
NAG	IU/l	23.4		2.9	7.1		2.6
Na+	mmol/l	174		111	59		35
K+	mmol/l	86		107	125		69
Cl-	mmol/l	22		117	50		48
Ca2+	mmol/l	5.10		7.55	3.50		13.10
I.PHOS	mmol/l	74.40		0.10	3.86		0.17
Mg2+	mmol/l	11.25		8.70	2.95		5.25

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	-6	-5	13	-6	-5	13
Na/Crea	mM/mM	10.80		14.10	6.00		9.10
K/Crea	mM/mM	5.30		13.60	12.60		17.90
Cl/Crea	mM/mM	1.40		15.00	5.00		12.60
Ca/Crea	mM/mM	0.32		0.96	0.35		3.41
Pho/Crea	mM/mM	4.60		0.01	0.39		0.04
Mg/Crea	mM/mM	0.70		1.10	0.30		1.40
LDH/crea	IU/mM	0.43		1.79	0.91		4.95
NAG/crea	IU/mM	1.45		0.37	0.71		0.68
NTx/Crea	nME/mM		334	621		543	547
CTx/Crea	µg/µm.		734	1195		1247	965
Pyr/Crea	nM/mM		103	214		141	204

d-6, d-5 y d13 indican día -6, día -5 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

d-6, d-5 y d13 indican día -6, día -5 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

5

Tabla 31

Análisis de orina - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	-8	-7	13	-8	-7	13
VOLUMEN	ml	21	21	43	18	53	53
CREAT	p.mol/l	16420	16420	9560	14300	6700	5380
NTx	nM BCE	-	9248	7824	-	5053	4695
CTx	p.g/l	-	19280	17916	-	12014	10557
D-PYR	nmol/l	-	2500	2748	-	1397	2159

(continuación)

## Análisis de orina - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	-8	-7	13	-8	-7	13
LDH	IU/L	10.0		15.0	9.0		25.0
NAG	IU/l						
Na+	mmol/l	110		44	140		64
K+	mmol/l	82		122	124		87
Cl-	mmol/l	24		73	72		56
Ca2+	mmol/l	2.90		16.10	11.90		19.50
I.FOS	mmol/l	88.2		7.7	20.3		3.5
Mg2+	mmol/l	2.35		7.20	9.00		5.45
Na/Crea	mM/mM	6.70		4.60	9.80		11.90
K/Crea	mM/mM	5.00		12.80	8.70		16.20
Cl/Crea	mM/mM	1.50		7.60	5.10		10.50
Ca/Crea	mM/mM	0.18		1.68	0.83		3.63
Pho/Crea	mM/mM	5.37		0.81	1.42		0.64
Mg/Crea	mM/mM	0.10		0.80	0.60		1.00
LDH/crea	IU/mM	0.61		1.57	0.63		4.65
NAG/crea	IU/mM	1.17		0.44	0.72		0.65
NTx/Crea	nME/mM		563	818		754	873
CTx/Crea	p.g/p.m.		1174	1874		1793	1962
Pyr/Crea	nM/mM		152	288		209	401

ES 2 365 852 T3

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	-8	-7	13	-8	-7	13
VOLUMEN	ml	11		58 67	32	-14	49
CREAT	µmol/l	10780	6920	4800	11260	13380	4200
NTx	nM BCE	-	4624	3465	-	7393	2812
CTx	µg/l	-	6983	5392	-	13411	5631
D-PYR	nmol/l	-	2762	1644	-	2016	1110
LDH	IU/L	14.0		6.0	6.0		36.0
NAG	IU/l	10.2		2.8	1.2		2.7
Na+	mmol/l	98		40	156		32
K+	mmol/l	104		53	172		57
Cl-	mmol/l	31		63	156		65
Ca2+	mmol/l	3.00		17.55	3.50		12.70
I.FOS	mmol/l	25.4		5.1	10.8		5.8
Mg2+	mmol/l	3.35		5.40	3.80		4.85
Na/Crea	mM/mM	9.10		8.30	13.90		7.60
K/Crea	mM/mM	9.60		11.10	15.20		13.50
Cl/Crea	mM/mM	2.90		13.20	13.80		15.40
Ca/Crea	mM/mM	0.28		3.66	0.31		3.02
Pho/Crea	mM/mM	2.35		1.05	0.96		1.38
Mg/Crea	mM/mM	0.30		1.10	0.30		1.20
LDH/crea	IU/mM	1.30		1.25	0.53		8.57
NAG/crea	IU/mM	0.95		0.58	0.11		0.64
NTx/Crea	nME/mM		668	722		553	670

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	-8	-7	13	-8	-7	13
CTx/Crea	µg/µm.		1009	1123		1002	1341
Pyr/Crea	nM/mM		399	343		151	264
PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
VOLUMEN	ml	14		15 52	39	69	42
CREAT	µmol/l	19160	18240	5620	14060	7600	8060
NTx	nM BCE	-	10499	2514	-	4818	5679
CTx	µg/l	-	21919	3813	-	8877	11236
D-PYR	nmol/l	-	2963	1356	-	1377	2036
LDH	IU/L	11.0		10.0	18.0		9.0
NAG	IU/l	0.5		1.2	5.9		5.1
Na+	mmol/l	145		71	118		146
K+	mmol/l	302		150	164		70
Cl-	mmol/l	119		101	53		133
Ca2+	mmol/l	11.50		20.05	6.60		12.35
I.FOS	mmol/l	0.2		0.1	7.6		2.9
Mg2+	mmol/l	7.35		6.90	4.00		5.90
Na/Crea	mM/mM	7.60		12.60	8.40		18.10
K/Crea	mM/mM	15.80		26.80	11.70		8.60
Cl/Crea	mM/mM	6.20		18.00	3.70		16.50
Ca/Crea	mM/mM	0.60		3.57	0.47		1.53

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
Pho/Crea	mM/mM	0.01		0.02	0.54		0.36
Mg/Crea	mM/mM	0.40		1.20	0.30		0.70
LDH/crea	IU/mM	0.57		1.78	1.28		1.12
NAG/crea	IU/mM	0.03		0.21	0.42		0.63
NTx/Crea	nME/mM		576	447		634	705
CTx/Crea	µg/µm.		1202	679		1168	1394
Pyr/Crea	nM/mM		163	241		181	253

d-8, d-7 y d13 indican día -8, día -7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

d-8, d-7 y d13 indican día -8, día -7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

d-8, d-7 y d13 indican día -8, día -7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

- 5 El grupo de calcitonina de salmón presentó disminuciones moderadas en somatomedina en suero (S.MED, ver las Tablas 32 y 42).

Tabla 32

Hormonas - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
ACTH	pg/ml	91	63	87	117	136	150
CORTISOL	nmol/l	2183	1415	1328	1378	1020	1348
ALDOST	pg/ml	316	433	484	501	644	622
INSULINA	mU/l	26.0	33.0	37.0	12.0	30.0	9.0
GLUCAG	pg/ml	791	486	704	577	353	585
C-PEPTI	ng/ml	n/a	5.20	5.50	n/a	3.60	1.60



ES 2 365 852 T3

(continuación)

Hormonas - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
GASTRINA	pg/ml	n/a	105	93	n/a	147	148
T3	nmol/l	1.34	2.61	2.94	2.19	2.73	2.50
T4	nmol/l	56	61	44	57	68	48
TSH	mUI/l	0.17	0.18	0.42	0.00	0.05	0.04
IPH	pg/ml	103	75	108	174	173	155
CT	pg/ml	5.9	4.6	4.8	16.4	15.0	13.1
VD25-H	nmol/l	49	47	54	76	71	58
VD1-25dh	pmol/l	n/a	-	-	n/a	-	-
OSTEO	ng/ml	n/a	26	34	n/a	41	40
CTx	nmol/l	10	15	20	17	19	20
ICTP	ng/ml	18	13	19	26	16	15
PICP	ng/ml	n/a	311	395	n/a	610	495
G.H.	ng/ml	13.8	7.0	16.2	15.2	3.6	17.2
S.STA	pg/ml	n/a	-	-	n/a	-	-
S.MED	ng/ml	n/a	888	1185	n/a	793	689
PROLACT	ng/ml	0.0	3.3	3.6	21.6	22.5	22.5
TESTO	nmol/l	10.5	8.4	n. s.	7.9	4.7	n. s.
ESTR	nmol/l	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
PROG	pmol/l	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

(continuación)

## Hormonas - Machos

Control							
Animal no.		W62501			W62502		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.							
Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62503			W62504		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
ACTH	pg/ml	98	87	87	115	78	73
CORTISOL	nmol/l	2316	979	1611	1578	1523	1709
ALDOST	pg/ml	983	1058	819	465	987	977
INSULINA	mU/l	13.0	14.0	17.0	4.0	10.0	22.0
GLUCAG	pg/ml						
C-PEPTI	ng/ml	n/a	1.70	1.80	n/a	1.20	2.30
GASTRINA	pg/ml	n/a	83	88	n/a	128	136
T3	nmol/l	1.06	2.35	2.51	1.48	1.65	1.90
T4	nmol/l	53	64	47	62	79	65
TSH	mUI/l	0.99	1.12	1.03	0.14	0.41	0.40
IPH	pg/ml	213	75	78	99	62	71
CT	pg/ml	6.7	4.0	2.4	5.1	2.5	4.9
VD25-H	nmol/l	63	50	49	62	44	45.
VD1-25dh	pmol/l	n/a	-	-	n/a	-	-
OSTEO	ng/ml	n/a	33	41	n/a	27	30
CTx	nmol/l	12	26	38	18	22	24
ICTP	ng/ml	21	15	15	22	21	20
PICP	ng/ml	n/a	284	363	n/a	361	439
G.H.	ng/ml	11.5	1.7	16.2	14.6	13.6	15.7
S.STA	pg/ml	n/a	-	-	n/a	-	-
S.MED	ng/ml	n/a	268	332	n/a	307	384

ES 2 365 852 T3

PROLACT	ng/ml	8.1	8.6	4.6	0.0	0.0	6.6
TESTO	nmol/l	8.5	3.6	n. s.	9.5	7.3	n. s.
ESTR	nmol/l	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
PROG	pmol/l	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
ACTH	pg/ml	96	101	83	115	88	91
CORTISOL	nmol/l	1662	1156	1299	1506	1432	1212
ALDOST	pg/ml	265	380	592	141	471	651
INSULINA	mU/l	16.0	22.0	14.0	12.0	38.0	10.0
GLUCAG	pg/ml	858	656	786	694	497	739
C-PEPTI	ng/ml	n/a	2.90	2.10	n/a	4.40	2.40
GASTRINA	pg/ml	n/a	84	78	n/a	98	94
T3	nmol/l	2.48	3.47	3.55	1.38	2.76	2.43
T4	nmol/l	84	90	68	59	80	56
TSH	mUI/l	0.22	0.40	0.15	0.00	0.07	0.03
IPH	pg/ml	123	96	78	71	62	55
CT	pg/ml	6.1	4.0	4.6	10.4	7.8	7.6
VD25-H	nmol/l	77	62	50	88	62	50
VD1-25dh	pmol/l	n/a	-	-	n/a	-	-
OSTEO	ng/ml	n/a	43	55	n/a	32	42
CTx	nmol/l	19	20	31	12	12	16
ICTP	ng/ml	28	23	22	18	16	18
PICP	ng/ml	n/a	420	500	n/a	774	706
G.H.	ng/ml	13.4	15.8	12.1	8.5	11.6	14.0
S.STA	pg/ml	n/a	-	-	n/a	-	-
S.MED	ng/ml	n/a	749	914	n/a	828	867

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62505			W62506		
Ensayo	Unidades	d-6	d7	d13	d-6	d7	d13
PROLACT	ng/ml	7.1	15.7	7.5	7.5	5.5	2.2
TESTO	nmol/l	11.8	10.5	n. s.	5.3	3.7	n. s.
ESTR	nmol/l	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
PROG	pmol/l	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

d-6, d7 y d13 indican día -6, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

5

Tabla 33

Hormonas - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
ACTH	pg/ml	146	276	121	58	60	101
CORTISOL	nmol/l	1983	1546	827	1894	837	818
ALDOST	pg/ml	244	953	312	149	90	199
INSULINA	mU/l	8.0	12.0	7.0	2.0	29.0	21.0
GLUCAG	pg/ml	729	779	583	818	507	514
C-PEPTI	ng/ml	n/a	2.40	1.40	n/a	3.30	2.30
GASTRINA	pg/ml	n/a	84	102	n/a	90	92
T3	nmol/l	2.22	2.95	3.40	2.04	3.09	3.23
T4	nmol/l	78	67	59	51	50	49
TSH	mU/l	0.14	0.27	0.49	0.15	0.54	0.50
IPH	pg/ml	155	149	129	145	129	112
CT	pg/ml	4.70	3.90	4.10	11.50	11.60	11.20
VD25-H	nmol/l	64	59	51	80	78	70

(continuación)

## Hormonas - Hembras

Control							
Animal no.		W62551			W62552		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
VD1-25dh	pmol/l	n/a	-	-	n/a	-	-
OSTEO	ng/ml	n/a	37	39	n/a	34	39
CTx	nmol/l	11	26	28	12	16	20
ICTP	ng/ml	21	23	22	19	16	15
PICP	ng/ml	n/a	864	503	n/a	339	298
G.H.	ng/ml	8.5	13.4	1.7	7.0	12.0	4.5
S.STA	pg/ml	n/a	-	-	n/a	-	-
S.MED	ng/ml	n/a	696	839	n/a	1173	1527
PROLACT	ng/ml	4.30	8.30	5.90	2.90	0.00	0.00
TESTO	nmol/l						
ESTR	nmol/l	58	64	61	48	45	60
PROG	pmol/l	3.40	3.50	1.70	2.70	1.10	1.40

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
ACTH	pg/ml	72	129	97	157	233	141
CORTISOL	nmol/l	1536	1220	1202	1222	1705	1128
ALDOST	pg/ml	185	948	523	155	1073	457
INSULINA	mU/l	12.0	8.0	9.0	20.0	18.0	24.0
GLUCAG	pg/ml	585	295	258	619	594	303
C-PEPTI	ng/ml	n/a	1.60	1.00	n/a	1.50	2.20
GASTRINA	pg/ml	n/a	83	84	n/a	91	84

ES 2 365 852 T3

(continuación)

Calcitonina de salmón							
Animal no.		W62553			W62554		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
T3	nmol/l	1.17	1.68	1.51	1.43	1.51	2.00
T4	nmol/l	58	76	60	61	87	60
TSH	mUI/l	0.81	1.31	1.16	0.08	0.34	0.41
IPH	pg/ml	59	47	58	145	82	53
CT	pg/ml	3.10	6.40	4.90	7.00	3.60	2.30
VD25-H	nmol/l	61	43	40	72	56	60
VD1-25dh	pmol/l	n/a	-	-	n/a	-	-
OSTEO	ng/ml	n/a	21	25	n/a	35	35
CTx	nmol/l	12	21	25	17	34	28
ICTP	ng/ml	28	28	24	29	30	24
PICP	ng/ml	n/a	115	142	n/a	240	287
G.H.	ng/ml	6.3	15.2	8.6	5.1	17.9	13.1
S.STA	pg/ml	n/a	-	-	n/a	-	-
S.MED	ng/ml	n/a	374	297	n/a	204	488
PROLACT	ng/ml	0.00	2.30	4.30	19.30	20.20	24.40
TESTO	nmol/l						
ESTR	nmol/l	47	63	59	141	82	170
PROG	pmol/l	1.80	1.90	1.50	2.60	4.00	1.60

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
ACTH	pg/ml	109	104	110	95	132	126
CORTISOL	nmol/l	1482	1331	917	1532	1253	1375

ES 2 365 852 T3

(continuación)

PTS893							
Animal no.		W62555			W62556		
Ensayo	Unidades	d-8	d7	d13	d-8	d7	d13
ALDOST	pg/ml	314	217	330	210	228	226
INSULINA	mU/l	1.0	22.0	19.0	15.0	30.0	22.0
GLUCAG	pg/ml	711	591	657	696	437	380
C-PEPTI	ng/ml	n/a	3.00	2.40	n/a	3.80	3.50
GASTRINA	pg/ml	n/a	83	82	n/a	96	91
T3	nmol/l	2.08	2.74	2.63	1.98	2.69	2.05
T4	nmol/l	72	56	55	59	61	45
TSH	mU/l	0.34	0.14	0.25	0.88	0.89	0.69
IPH	pg/ml	95	45	64	111	67	58
CT	pg/ml	2.50	1.90	2.70	1.80	2.90	2.80
VD25-H	nmol/l	72	53	47	55	44	43
VD1-25dh	pmol/l	n/a	-	-	n/a	-	-
OSTEO	ng/ml	n/a	38	43	n/a	32	36
CTx	nmol/l	13	11	15	17	14	14
ICTP	ng/ml	22	16	16	20	15	15
PICP	ng/ml	n/a	612	436	n/a	478	393
G.H.	ng/ml	3.5	1.5	0.0	1.1	8.2	11.8
S.STA	pg/ml	n/a	-	-	n/a	-	-
S.MED	ng/ml	n/a	533	502	n/a	432	589
PROLACT	ng/ml	0.00	0.20	3.20	9.90	5.70	3.60
TESTO	nmol/l						
ESTR	nmol/l	67	68	60	59	66	57
PROG	pmol/l	2.80	1.70	1.50	2.40	2.20	2.40

d-8, d7 y d13 indican día -8, día 7 y día 13 con relación al día de inicio de la dosificación.

5 Muestreo de tejido. Se mataron los animales por medio de anestesia profunda inducida por una inyección intravenosa de Pentotal®, seguido por exanguinaciones. Se muestrearon todos los tejidos relevantes para histopatología y el perfil de expresión génica. Se procesaron las siguientes muestras de tejido para análisis: hígado, riñón, pituitaria, músculo, hueso, duodeno, bazo y tráquea. Se fijaron las muestras para histopatología en formalina al 10% amortiguada con fosfato. Se llevó a cabo la desmineralización de los huesos con ácido fórmico al 10%. Se embebieron las muestras de tejido en Paraplast® y se las seccionó hasta un espesor de 4 micrones, para coloración con hematoxilina y eosina. Las muestras para el perfil de expresión génica fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la excisión, se las almacenó en hielo seco y posteriormente se las ultracongeló aproximadamente a -80°C para ser utilizadas posteriormente. Todos los tejidos seleccionados para el perfil de expresión génica fueron examinados histopatológicamente.

10 Histopatología. El examen histopatológico de los tejidos seleccionados para el análisis de perfil génico exhibió un espectro normal de lesiones incidentales que no eran diferentes en términos de severidad y distribución de las lesiones con los controles en todos los grupos de tratamiento.

15 Se observó una incidencia ligeramente superior de cambios inflamatorios y regenerativos en los riñones de hembras a las que se les administró calcitonina de salmón. Estos cambios no fueron considerados relevantes, ya que no existen registros de toxicidad del riñón después de 40 años de uso terapéutico de la calcitonina.

Se colorearon secciones de hueso para osteonectina, osteopontina y osteocalcina y se las evaluó histopatológicamente. Se llevó a cabo una histomorfometría del tejido óseo con respecto a los parámetros de reabsorción ósea y de síntesis (formación de osteoide).

20 La coloración con osteonectina, osteopontina, y osteocalcina de la tibia no mostró diferencia entre los grupos, uno (control) y dos (calcitonina de salmón). La osteonectina exhibió un mayor agrandamiento y deterioro de la placa de crecimiento epifisial del animal no. 2553 debido a un estado patológico severo relacionado con la falta de tratamiento (epifisiolisis subaguda severa).

25 Se llevó a cabo una histomorfometría de tejido óseo para determinar los parámetros relacionados con reabsorción ósea y síntesis de hueso (formación de osteoide).

30 Los resultados mostraron (ver, las Tablas 34 y 35) que la calcitonina de salmón incrementó el volumen trabecular y el espesor aproximadamente un 17% en la tibia, pero no en las vertebrae. PTS893 redujo el espesor cortical (18%) e incrementó la porosidad cortical (54%) en la tibia (T), pero no en las vertebrae (V). Por el contrario, PTS893 indujo un incremento en el volumen de osteoide (37% en T, 213% en V) y la superficie (49% en T, 37% en V), así como un incremento en la superficie de los osteoblastos (40% en T, 24% en V), tanto en la tibia como en las vertebrae, respectivamente.

Tabla 34

Histomorfometría de la tibia (machos y hembras en promedio)

	BT/TV	Tb Th	Tb N	10 Sp	Ct Por	Ct Th	OS/BS	OV/BV	ES/BS	Obs/BS
	%	µm	mm <sup>-1</sup>	µm	%	µm	%	%	%	%
Control	20.70	106.32	1.95	407.20	2.53	1583.13	40.00	8.76	5.73	17.53
	17.72	97.99	1.81	454.90	2.59	976.66	33.37	8.51	4.70	12.77
	28.74	109.18	2.63	270.69	1.21	1036.24	29.45	5.79	10.19	11.70
	20.15	103.59	1.94	410.62	1.19	1031.89	29.19	5.29	5.71	15.80
SD	21.83	104.27	2.08	385.85	1.88	1156.98	33.00	7.09	6.58	14.45
promed.	4.79	4.77	0.37	79.79	0.78	285.39	5.04	1.80	2.45	2.69



(continuación)

## Histomorfometría de la tibia (machos y hembras en promedio)

	BT/TV	Tb Th	Tb N	10 Sp	Ct Por	Ct Th	OS/BS	OV/BV	ES/BS	Obs/BS
	%	$\mu\text{m}$	$\text{mm}^{-1}$	$\mu\text{m}$	%	$\mu\text{m}$	%	%	%	%
sCT	32.28	140.64	2.30	295.01	2.10	895.98	42.71	11.72	5.02	18.32
	25.00	122.19	2.05	366.51	1.98	1022.55	31.58	5.86	2.31	6.37
	29.96	129.05	2.32	301.75	1.61	939.32	35.21	5.03	6.89	18.58
	16.08	115.65	1.39	603.45	2.40	1178.70	30.37	4.01	5.61	19.36
SD	25.83	126.88	2.01	391.68	2.02	1009.14	34.97	6.65	4.95	15.66
promed.	7.17	10.68	0.43	144.81	0.33	124.65	5.56	3.46	1.93	6.21
PTS893	19.69	129.22	1.52	526.99	2.76	1022.62	54.84	11.24	4.62	16.16
	16.65	93.20	1.79	466.69	2.94	893.43	43.57	9.61	4.76	21.25
	25.74	120.52	2.13	347.63	2.94	950.33	43.63	8.14	4.21	18.46
	24.78	126.07	1.97	382.61	2.95	939.53	54.97	9.95	2.85	25.25
SD	21.72	117.25	1.85	430.98	2.90	951.48	49.25	9.74	4.11	20.28
promd.	4.30	16.43	0.26	81.20	0.09	53.46	6.53	1.28	0.87	3.91

sCT: Calcitonina de salmón; SD promed.: Desviación estándar promedio

BV/TV: volumen óseo trabecular; Tb. Th.: Espesor trabecular; Tb. N.: Número trabecular; Tb. Sp.: Separación Trabecular; Ct. Por.: Porosidad cortical; Ct, Th.: Espesor cortical; OS/BS: superficie de osteoide; OV/BV: Volumen de osteoide; ES/BS: Superficie erosionada; Obs/BS: Superficie de osteoblasto.

5

Tabla 35

## Histomorfometría de las vértebras (machos y hembras en promedio)

	BT/TV	Tb Th	Tb N	10 Sp	Ct Por	Ct Th	OS/BS	OV/BV	ES/BS	Obs/BS
	%	$\mu\text{m}$	$\text{mm}^{-1}$	$\mu\text{m}$	%	$\mu\text{m}$	%	%	%	%
Control	2- 1.67	179.80	1.21	649.79	0.88	887.91	23.61	1.22	8.94	16.14
	15.85	144.89	1.09	769.35	0.26	639.93	20.77	2.02	8.81	5.96

(continuación)

## Histomorfometría de las vértebras (machos y hembras en promedio)

	BT/TV	Tb Th	Tb N	10 Sp	Ct Por	Ct Th	OS/BS	OV/BV	ES/BS	Obs/BS
	%	µm	mm <sup>-1</sup>	µm	%	µm	%	%	%	%
	19.54	122.91	1.59	506.23	0.87	416.48	17.91	1.58	5.85	4.07
	21.95	131.30	1.67	466.91	0.85	604.45	11.58	0.97	1.82	4.79
SD	19.75	144.72	1.39	598.07	0.71	637.20	18.47	1.45	6.36	7.74
Promed.	2.82	25.07	0.28	138.62	0.30	193.78	5.15	0.45	3.34	5.65
sCT	17.32	113.29	1.53	540.84	1.70	705.10	3.95	0.46	11.60	3.21
	19.33	144.31	1.34	602.15	1.18	810.09	5.82	0.86	2.55	3.97
	20.11	118.49	1.70	470.71	1.18	576.42	11.48	1.43	4.93	6.81
	19.46	123.71	1.57	511.96	0.12	907.16	4.91	0.32	3.47	1.23
SD	19.06	124.95	1.53	531.42	1.05	749.69	6.54	0.77	5.64	3.80
promed.	1.21	13.59	0.15	55.24	0.66	141.96	3.38	0.50	4.09	2.31
PTS893	15.15	105.46	1.44	590.67	1.49	707.43	18.84	3.24	9.31	10.36
	20.23	118.79	1.70	468.39	1.45	629.35	41.28	8.42	2.30	9.07
	23.56	134.66	1.75	436.79	0.41	740.87	23.65	3.49	2.55	10.47
	24.86	134.82	1.84	407.56	0.92	624.35	17.66	2.66	3.96	8.33
SD	20.95	123.43	1.68	475.85	1.07	675.50	25.36	4.45	4.53	9.56
promed.	4.33	14.15	0.17	80.47	0.51	57.85	10.93	2.67	3.27	1.04

sCT: Calcitonina de salmón; SD promed.: Desviación estándar promedio

BV/TV: volumen óseo trabecular; Tb. Th.: Espesor trabecular; Tb. N.: Número trabecular; Tb. Sp.: Separación Trabecular; Ct. Por.: Porosidad cortical; Ct. Th.: Espesor cortical; OS/BS: superficie de osteoide; OV/BV: Volumen de osteoide; ES/BS: Superficie erosionada; Obs/BS: Superficie de osteoblasto.

5

La histomorfometría mostró resultados inconsistentes entre hueso de la tibia y de las vertebras, excepto por un incremento en la síntesis de osteoide inducida por PTS893. Este efecto está bien documentado para la hormona paratiroidea, cuando se la administra en una forma discontinua.

10

Extracción de ARN y purificación. Se seleccionó un grupo de tejidos para el perfil de expresión génica. Estos grupos incluyeron muestras de riñón, hueso, músculo, duodeno, pituitaria e hígado. En resumen, se obtuvo ARN total por medio de extracción con ácido guanidinio tiocianato-fenol-cloroformo (Trizol®, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif., EUA) de cada sección de tejido congelado y se purificó luego el ARN total sobre una resina de afinidad (RNeasy®, Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ARN total por medio de la

absorbancia a  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $A_{260\text{nm}}$ ), y se estimó la pureza por medio de la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Se confirmó la integridad de las moléculas de ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa no desnaturizante. Se almacenó el ARN aproximadamente a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis. Una parte de cada muestra individual de ARN fue mantenida para el análisis de genes críticos por medio de PCR en tiempo real.

- 5 Ensayo de hibridación. Se hizo un perfil del transcripto por medio de arreglos e la sonda de expresión GeneChip® de acuerdo a lo recomendado por el fabricante del sistema GeneChip® (GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix Inc., Santa Clara, Calif., EUA). Se utilizaron arreglos de la sonda de expresión HG-U95Av2 de GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara Calif., EUA). Se sintetizó ADNc bicatenario con una cantidad de aproximadamente  $5 \mu\text{g}$  de ARN total de longitud completa utilizando el Superscript Choice System (Invitrogen Life Technologies) en presencia de un iniciador oligonucleótido de ADN T7-(dT)24. Después de la síntesis, se purificó el ADNc por medio de extracción con fenol/cloroformo/isoamil alcohol y precipitación con etanol. Se transcribió luego el ADNc purificado *in vitro* utilizando el BioArray® High Yield RNA Transcript Labeling Kit (ENZO) en presencia de ribonucleótidos biotinilados de ARNc marcados con biotina. Se purificó luego el ARNc marcado sobre una resina de afinidad (Rneasy®, Qiagen), se lo cuantificó y fragmentó. Se hibridó una cantidad aproximadamente de  $10 \mu\text{g}$  de ARNc marcado aproximadamente durante 16 horas a  $45^\circ\text{C}$  con un arreglo de una sonda de expresión. Se lavó luego el arreglo y coloreó dos veces con estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes) utilizando la GeneChip® Fluidics Workstation 400 (Affymetrix). Se escaneó luego el arreglo dos veces utilizando un escáner láser confocal (GeneArray® Scanner, Agilent, Palo Alto, Calif., EUA) dando como resultado una imagen escaneada.

- 20 Se procesó este "archivo .dat" resultante utilizando el programa Micro Array Analysis Suite versión 4 (MAS4) (Affymetrix) en un "archivo .cel". El "archivo .cel" fue capturado y cargado en el Affymetrix GeneChip Laboratory Information Management System (LIMS). La base de datos del LIMS se conecta con un servidor UNIX Sun Solaris a través de un sistema de archivos en red que permite descargar las intensidades promedio para todas las celdas de pruebas (archivo CEL) en una base de datos Oracle. Se convirtieron los datos sin procesar en niveles de expresión utilizando una "intensidad objetivo" de 150. Los valores numéricos mostrados son promedios ponderados de las intensidades de señal de los pares de sondas incluidos en un grupo de sondas para una secuencia dada de un transcripto (valor AvgDiff). Se revisó la calidad de los datos y se los cargó en el software GeneSpring® versiones 4.2.4 y 5 (Silicon Genetics, Redwood City, Calif., EUA) para su análisis.

- 30 - Análisis de datos. El análisis de los datos se realizó con el paquete del software de Silicon Genetics GeneSpring versión 4.2.1 y 5. Los valores con una diferencia promedio por debajo de 20 fueron fijados en 20. Se utilizaron diferentes herramientas de agrupamiento y filtración en estos programas para explorar los grupos de datos e identificar cambios a nivel de transcripciones que informan sobre las funciones celulares y tisulares alteradas y que pueden ser utilizadas para establecer hipótesis de trabajo sobre los modos de acción del compuesto.

Se determinó el rango de umbral para considerar como favorecimiento o reducción de la expresión dentro del contexto de la interpretación biológica del estudio.

- 35 El contenido de la información de estos grupos de datos es una conjunción de cambios numéricos y de información biológica. La decisión para considerar un gen específico relevante se basa en una conjunción de cambios numéricos identificados por medio de algoritmos estadísticos y comparativos y la relación con otros genes modulados que apuntan a un tema biológico común. El peso de esa relación es evaluada por el analista a través de una revisión de la literatura científica relevante.

- 40 El incremento y la disminución reportados aquí se refieren a la abundancia de transcripto, a menos que específicamente se establezca otra cosa.

Perfil de expresión génica. Los análisis de perfil génico comparativo de múltiples órganos se realizaron en el grupo al que se le administró calcitonina de salmón a razón de  $50 \mu\text{g}/\text{animal}/\text{día}$ . Los órganos escogidos para análisis fueron hígado, riñón, pituitaria, músculo esquelético, hueso, duodeno, bazo y tráquea.

45

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
366II_at	isoforma a de fosfatasa ácida I			-1,33		-1,33	
32714_s_at	receptor tipo II clase 1 de activina A	-1,62			-1,83		
39314_at	precursor del receptor tipo IIB de activina A			-1,12	1,41	-4,15	
35915_at	cadena C de activina beta	-1,21			-2,41	-1,67	
3662I_at	glicoproteína HS de alfa-2	1,33	1,53				1,12
34588_i_at	amelogenina			-1,61			
37747_at	anexina		-1,30	1,87		-2,58	
40376_at	precursor de aril sulfatasa E		-1,59				
39326_at	ATPasa H (+) vacuolar	-1,57	-2,80			-1,62	
38814_at	ATPasa H (+) de subunidad vacuolar	1,22					
33741_at	ATPasa, transporte de H+, lisosomal	1,23				-1,50	
33033_at	ATPasa, transportando H+, lisosomal	-1,29		-3,19		-1,43	1,23
38814_at	ATPasa, transportando H+, lisosomal				1,30	-1,28	1,14
38126_at	biglicano					1,75	-1,61
39407_at	proteína 1 morfogenética de hueso			-1,20		-1,55	
31399_at	proteína 10 morfogenética de hueso	1,44	1,45	-1,31	-1,77		
1113_at	proteína 2A morfogenética de hueso	-1,12	2,63				1,29
183I_at	proteína 5 morfogenética de hueso	-1,43	1,39	1,40			
1733_at	precursor de proteína 6 morfogenética de hueso		-1,37	-1,17	-0,64	-1,27	-1,1
34500_at	proteína 1 enlazadora de calcio (calbrain)		2,31			1,21	
31670_s_at	proteína quinasa (CaM quinasa) II gama dependiente de calcio/calmodulina		1,17		1,57	-1,28	1,60
1751_g_at	Calreticulina	-4,03	-1,60		1,67		
32067_at	elemento modulador de respuesta camp (CREM)	1,39		-1,24		-1,50	

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
39241_at	anhidrasa carbónica I	-2.68		1.18		-1.69	
40095_at	anhidrasa carbónica II	-1.69					
40163_r_at	precursor de proteína matriz de cartílago oligomérico	2.36	5.61				
128_at	catepsina k	1.18			1.35	-2.33	
129_g_at	catepsina k	1.20	-1.54		1.17	-1.28	
38466_at	catepsina k	1.27			1.40		-1.19
40718_at	catepsina w	-1.31		-1.54		2.05	
32833_at	quinasa 1 tipo CDC	1.63					
646_s_at	isoforma hcl2/139 de quinasa 2 tipo CDC	1.19			1.86		
38112_g_at	proteoglicano 2 de sulfato condroitina (versicano)		-2.16		1.55		-1.68
32642_at	proteoglicano 3 de sulfato condroitina (neurocano)					-1.49	
31493_s_at	Somatotropina coriónica hormona 1					-1.59	
40714_at	quimotripsina C (caldecrina)					1.39	3.22
35474_s_at	colágeno tipo I y transcripto de fusión PDGFB				-7.30		-3.35
598_at	colágeno tipo II alfa 1	-1.38		1.69	-1.27	2.77	-3.02
32488_at	colágeno tipo III alfa 1	-1.41	-1.59	-1.53	-3.20	-1.89	-1.35
38952_s_at	colágeno tipo III alfa 1	1.23				-1.73	
35379_at	colágeno tipo IV alfa-2	-2.22	-3.28				
38722_at	colágeno tipo IX alfa 1		-3.38	-1.13	-1.42		
34802_at	colágeno tipo VI alfa-1	-1.37		-1.10	-1.39		-1.28
37892_at	colágeno tipo VI alfa-2 (AA 570 - 998)	1.24				-2.46	-1.51
1026_s_at	colágeno tipo XI alfa-1	-1.20	-1.32			1.15	-2.20

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
1027_at	colágeno tipo XI alfa 2	1.11		-1.25			1.37
32305_at	colágeno tipo XI alfa 1		-1.45				-1.54
39333_at	colágeno, tipo IV, alfa 1						-1.49
39925_at	colágeno, tipo IX, alfa 2					-2.38	-1.36
38420_at	colágeno, tipo V, alfa 2		-1.29	-1.18	-1.11		-1.10
4135I_at	colágeno, tipo VI, alfa 1		-2.29	-1.27	-150		
41350_at	colágeno, tipo VI, precursor alfa 1						-3.55
35168_f_at	colágeno, tipo XVI, alfa 1						-1.59
35169_at	colágeno, tipo XVI, alfa 1						-1.18
39632_at	colagenasa 3 (metalo proteinasa 13 de matriz)	1.20					
36638_at	factor de crecimiento de tejido conectivo					-2.11	
40697_at	ciclina A2	-1.60					
34736_at	ciclina B1	-2.83					
36650_at	ciclina D2	1.21					
35249_at	ciclina E2	-2.95					
1206_at	quinasa 5 dependiente de ciclina	1.56					-1.54
799_at	quinasa 5 dependiente de ciclina, subunidad 1 regulatoria (p 35)	1.32					
41546_at	quinasa 6 dependiente de ciclina	1.15	1.52			1.34	
2031_s_at	inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina (p21, Cip1)	1.95					
35816_at	cistatina B (estefina B)	1.57					
806_at	quinasa inducible por citoquina	1.20				1.35	
40049_at	proteína quinasa 1 asociada a muerte					-1.47	-1.29

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
33903_at	proteína quinasa 3 asociada a muerte	-1.22					
34029_at	fosfoproteína ácida 1 de matriz de dentina (DMP1)	1.65					
40186_at	especificidad dual de fosfatasa 9						1.59
37996_s_at	proteína quinasa de distrofia miotónica		1.25				-1.50
342_at	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1	1.45					
343_s_at	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1	1.11			-1.42		
33602_at	diferenciación endotelial, precursor del receptor 6 acoplado a proteína G		1.15			2.24	-1.66
1442_at	receptor de estrógeno	1.47	1.23			1.60	
33670_at	receptor de estrógeno	1.30					
1487_at	proteína relacionada al receptor de estrógeno	1.11			-1.52		1.24
38882_r_at	proteína da caja B sensible a estrógeno (EBBP)	1.22		-1.51			
39945_at	proteína de activación de fibroblastos	-1.27				-1.48	-1.32
996_at	factor de crecimiento de fibroblastos 1 (ácido)		1.17		-1.41		
41586_at	factor de crecimiento de fibroblastos 18		2.06				
1730_s_at	factor de crecimiento de fibroblastos 4		1.55				1.46
424_s_at	receptor del factor de crecimiento de fibroblastos	-1.17	-1.59				
4013l_at	folistatina tipo I	-1.31					
40132_g_at	folistatina tipo I					-1.22	1.15
33510_s_at	receptor de glutamato, metabotrópico 1	1.26			-1.31		
33269_at	componente Gpi1 de N-acetilglucosaminilo transferasa GPI1	1.24					

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
1401_g_at	Factor de estimulación de colonias de granulocitos - macrófago (CSF1)	-3.07	2.24				
1911_s_at	inhibición de crecimiento y daño inducible de AND, alfa		1.84		-3.84		1.24
37615_at	proteína 10 enlazada al receptor del factor de crecimiento	1.21				-1.61	
32845_at	proteoglicano 2 de sulfato de heparán (perlecan)			1.27			-1.11
32778_at	receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 1		1.75			-2.57	1.20
32779_s_at	receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 1			1.21	2.02		
756_at	receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 2						1.24
34209_at	isoenzima quinasa 3 de inositol 1,4,5-trifosfato		2.29		1.42	-1.36	1.75
33506_at	fosfatasa de inositol polifosfato 4 tipo 1 beta	1.12	1.66	2.09		1.27	
172_at	fosfatasa de inositol polifosfato - 5			-1.22	-1.15		
32697_at	inositol (myo) - 1 (ó 4)- monofosfatasa 1	-1.36	-2.70			1.61	
36496_at	inositol (myo) - 1 (ó 4)- monofosfatasa 2						1.13
2079_s_at	factor de crecimiento tipo insulina (IGF - II)				-1.32	1.15	-1.31
36782_s_at	factor de crecimiento tipo insulina 2 (somatomedina A)						-1.69
1232_s_at	factor de crecimiento tipo insulina enlazador de proteína	-1.31			-1.53		
40422_at	factor de crecimiento tipo insulina enlazador de proteína 2					-2.97	-1.16
1586_at	factor de crecimiento tipo insulina enlazador de proteína 3	1.45		-1.16	1.70		
37319_at	factor de crecimiento tipo insulina enlazador de proteína 3	2.17			1.58		-1.52



Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
41420_at	factor de crecimiento tipo insulina enlazador de proteína 5		1.15		-2.66		
1741_s_at	factor de crecimiento tipo insulina enlazador de proteína- 2	-2.49				-2.17	-1.22
1464_at	precursor II del factor de crecimiento tipo insulina	1.18	1.10			-1.26	
1591_s_at	precursor II del factor de crecimiento tipo insulina	1.41					-2.80
33082_at	subunidad 10 de integrina alfa	1.33			-2.32	-1.18	
1100_at	quinasa asociada al receptor de interleuquina-1				1.39	-1.48	
2005_s_at	quinasa Janus 3				-1.51		1.57
40060_r_at	proteína LIM (similar al enigma de enlazamiento de la proteína quinasa C de rata)	1.44				-1.68	-1.31
36811_at	proteína tipo lisil oxidasa	-1.44	1.14		1.30	-1.19	
1433_g_at	MAD, madres contra homólogo decapentaplégico 3	1.14	-1.13		-1.61	-1.65	-1.69
34655_at	MAGUK (homólogos de quinasa gualitano asociada a membrana)	1.23					
35652_g_at	MAP quinasa quinasa quinasa (MTK1)	1.14					
33246_at	MAPK 13: proteína quinasa 13 activada por mitógeno			-1.24	-1.13	-1.91	1.65
41280_r_at	MAPK81P1: proteína quinasa 8 activada por mitógeno que interactúa con proteína 1	-1.31	1.92			1.58	
2004_at	MEK quinasa				1.13	-1.62	1.16
1509_at	metaloproteinasas	1.42		-1.11		-1.23	-1.18
976_s_at	proteína quinasa 1 activada por mitógeno	-1.61					
34006_s_at	proteína quinasa 8 activada por mitógeno	1.32					

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
1844_s_at	proteína quinasa quinasa 1 activada por mitógeno					-1.60	1.15
35694_at	proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógeno				1.26		
l469_at	proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno		1.13	-1.30			1.16
l637_at	proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno				1.11		1.34
37565_at	MMD: monocitos para diferenciación asociada a macrófagos	1.28	-2.48				-1.28
38307_at	neurocondrina			2.80		-1.39	
39144_at	factor nuclear de células-T activadas, citoplásmica dependiente de calcineurina 1		2.72		1.42		-1.70
41202_s_at	proteína OS-4 (OS-4)	1.24				-1.72	
1451_s_at	factor-2 específico de osteoblastos OSF - 2 os (periostina)	-1.65				-2.06	1.56
467_at	factor estimulante de osteoclastos (OSF)	-1.23	-1.50	-1.58		-4.12	
33814_at	PAK4	1.16			-1.33	1.11	
38757_at	proteína asociada a PDGF	-1.89				-1.15	1.20
146_at	quinasa 4 fosfatidilinositol catalítica polipéptido beta				1.19		1.23
34496_at	glicano fosfatidilinositol, clase L		2.34	1.34	1.51		
34169_s_at	fosfatidilinositol polifosfato 5-fosfatasa, isoforma B					-1.33	1.19
37412_at	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa isoforma C (-1)	-1.87		-1.31			
37253_at	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa, tipo 1, tipo beta		1.17		-1.13		1.11
35741_at	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa, tipo 2, tipo beta				-1.18		-1.18

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
751_at	glicano fosfatidilinositol, clase C (PIG-C)	1.14	1.19			-1.22	
666_at	Fosfodiesterasa 4A, específico para cAMP	1.33		-1.32		-1.18	
38526_at	Fosfodiesterasa 4D, específico para cAMP (Fosfodiesterasa E3 homólogo de burro (Drosophila))	1.30	1.15				3.51
38921_at	Fosfodiesterasa IB, dependiente de calmodulina	1.52				1.42	1.12
31699_at	quinasa 3 de fosfoinositida	1.56		-1.56			
36287_at	quinasa 3 de fosfoinositida, catalítica, polipéptido gama	1.31					
35665_at	quinasa 3 de fosfoinositida, clase 3					-1.11	1.21
364_s_at	fosfolipasa C b3	1.22					
901_g_at	fosfolipasa C, beta 4	-1.20		1.41		-1.55	
1293_s_at	fosfolipasa D	-1.26					
38023_at	Proteína de transferencia de fosfatidilinositol		2.25		1.33	1.55	1.71
38269_at	PKD2 proteína quinasa D2			1.34			
32306_g_at	preprocolageno tipo I alfa - 2	1.19		-1.38		-1.75	-1.31
35473_at	preprocolageno tipo I alfa 1	-2.72	-1.37		-3.94		-2.70
32307_s_at	procolágeno	1.13		-1.26	-2.44	-1.56	-1.82
37605_at	procolágeno alfa 1 tipo II				-1.84		-1.61
36184_at	Lisina de procolágeno 5-dioxigenasa		2.52		-2.15		-1.30
37037_at	Prolina de procolágeno, 2-oxoglutarato 4- dioxigenasa (prolina 4-hidroxilasa), polipéptido I alfa			1.87	1.46	-1.67	1.29
37633_s_at	Proteína endometrial asociada a progestágeno (proteína de placenta 14, globulina 2 alfa endometrial asociada a embarazo, proteína uterina alfa)		2.00				

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
36109_at	Prolidasa (imidodipeptidasa) PEPD	-2.55				-2.05	
1884_s_at	antígeno nuclear de proliferación celular	-1.85					
36666_at	prolil 4-hidroxilasa beta	1.95			1.37	2.08	
718_at	proteasa, serina 11 (que enlaza a IGF)	-1.30				-1.81	-1.30
719_g_at	proteasa, serina 11 (que enlaza a IGF)	-1.43				-1.97	-1.27
385_at	subunidad de proteosoma (prosoma, macropaína), tipo beta, 10	1.36		-1.29			
37431_at	Inhibidor de proteína STAT X activado					-1.23	1.28
39183_at	proteína quinasa 1 PCTAIRE	-1.17					
3971l_at	sustrato de proteína quinasa C 80K-H						1.31
1437_at	proteína quinasa C, alfa			-2.06			1.82
36359_at	proteína quinasa, dependiente de cAMP, catalítica, gama	1.39		1.14	-1.49	1.30	1.13
1091_at	proteína quinasa, dependiente de cAMP, reguladora, tipo I, beta	1.65	-1.80		2.06		
116_at	proteína quinasa, dependiente de cAMP, reguladora, tipo II, alfa	1.28			-1.18		
33633_at	Receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 11	1.90	-1.82				
32737_at	Sustrato 2 de toxina botulínica C3 relacionada con RAC2 Ras (familia rho, proteína que enlaza a GTP pequeño Rac2)	1.16					1.22
1007_s_at	Receptor tirosina quinasa DDR	1.21					
1048_at	Receptor gama de retinoide X	1.47				1.47	
41404_at	Proteína quinasa S6 ribosomal	-1.67	-1.40		-1.83		-1.40
865_at	Proteína quinasa S6 ribosomal, 90 kD, polipéptido 3		-1.42				1.27
32290_at	SCAMP1: membrana secretora que transporta proteína 1 (transporte vesicular)	2.50				-1.27	-1.39

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
34342_s_at	Fosfoproteína secretada 1 (osteopontina, sialoproteína I ósea y activación temprana 1 de linfocitos T)		1.15				-3.01
39166_s_at	Inhibidor de proteinasa serina (o cisteína), clase H (proteína de choque térmico 47), miembro 2		-2.82	1.56	2.04		-1.29
36217_at	Serina/treonina quinasa 38	1.54					-1.59
1223_at	Serina/treonina proteína quinasa			2.42			
32447_at	SF-1; factor 1 esteroideogénico	8.76		1.59		1.27	-2.01
33338_at	Transductor de señal y activador de transcripción 1			-1.14	1.15	-2.11	1.93
1244_at	Transductor de señal y activador de transcripción 2, 113 kD						1.57
40458_at	Transductor de señal y activador de transcripción 5A					1.14	1.39
506_s_at	Transductor de señal y activador de transcripción 5A				1.32	2.60	
41222_at	Transductor de señal y activador de transcripción 6 (STAT6)	1.44			1.14	-1.46	
1950_s_at	Smad 3				-2.44		-1.16
38889_at	Activación del receptor para anclar Smad, isoforma 1		1.28			-1.14	-1.51
1013_at	Smad 5					-2.62	1.22
1955_s_at	SMAD6 (inhibe BMP/Smad 1 (MADH1))	1.19				-1.37	
37718_at	Quinasa relacionada a SNF-1	1.49		1.13	1.18		
35883_at	Factor de transcripción Spi-B (relacionada a SPI1/PU.1)		3.76			-2.96	1.15
472_at	Stat5b (stat5b)	-1.42	-1.28			-1.83	-2.50
38669_at	Serina/treonina quinasa relacionada a Ste20	1.24				-1.78	

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
38374_at	TEIG; respuesta inducible de crecimiento precoz TGFβ	1.18				-1.79	
224_at	respuesta inducible de crecimiento precoz TGFβ; TIEG	1.26				-2.69	
36940_at	Factor 1 apoptótico inducido contra TGFβ1	1.22			1.28	-1.38	
32217_at	Proteína 12 de apoptosis que induce a TGF-beta	1.40	1.55		1.12		
41445_at	Precursor beta para TGF	1.14	1.11				
1890_at	Proteína de la superfamilia beta de TGF	1.74	1.85	1.12		1.38	
40631_at	Tob	-1.14			1.28	-2.09	
32219_at	Quinasa 1 tipo enmarañado		-1.16				
1897_at	Factor de crecimiento de transformación, receptor III beta(betaaglicano, 300 kD)		1.18				1.12
1735_g_at	Factor de crecimiento de transformación beta 3		-1.15		-4.45	-1.39	-2.23
1767_s_at	Factor de crecimiento de transformación beta 3 (TGF-beta 3)	-1.71	1.41		-1.71		
40581_at	TRIO: dominio funcional triple (que interactúa con PTPRF)	1.65	1.62		1.34		-1.42
32272_at	tubulina alfa	-1.20			1.18		
330_s_at	tubulina alfa 1	-1.80		1.23	-1.20	-1.19	
40567_at	tubulina alfa 3	-1.39		-1.18			-1.10
685_f_at	tubulina alfa isotipo H2- alfa	-4.36		1.32		2.13	
151_s_at	tubulina beta	-1.40	-1.14	1.16	1.22	1.16	
33678_i_at	tubulina beta 2	-1.15			1.75		
33679_f_at	tubulina beta 2	-1.31			1.45		
709_at	tubulina beta 3	-1.18				-1.35	1.20
471_f_at	tubulina beta 4	-1.38			1.50		

Tabla 36

Perfil de expresión génica de múltiples órganos de calcitonina de salmón

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	hueso	riñón	hígado	músculo	pituitaria	tráquea
39399_at	tubulina beta, cofactor D	-1.85				-4.69	
32098_at	Precursor de cadena de colágeno alfa 2 tipo VI						-3.79
1651_at	Proteína transportadora de ubiquitina E2-C	-3.47					
1953_at	Factor de crecimiento endotelial vascular	-1.40					
36101_s_at	Factor de crecimiento endotelial vascular	1.45					
37268_at	Factor de crecimiento endotelial vascular B				-1.58		
36140_at	Proteína 1 que enlaza a la caja Y	2.30	1.86		2.36	-2.72	

Además, se evaluó el efecto de PTS893 en hueso.

5

Tabla 37

Análisis del perfil génico de calcitonina de salmón y PTS893 en hueso

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
38909 at	25 hidroxivitamina D3 1-alfa-hidroxilasa		-1.14
32714_s_at	Receptor de activina A tipo II clase 1	-1.62	
35915 at	Cadena C de activina beta	-1.21	
39279_at	Receptor de activina tipo II		1.24
39383_at	Adenilato ciclasa 6, isoforma A		1.22
38965_at	Agrecano 1		2.03
39206_s_at	Agrecano 1	1.41	
36621_at	Glicoproteína HS alfa 2	1.33	

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
34589_f_at	Amelogenina	1.10	-3.10
39326_at	ATPasa H (+) vacuolar	-1.57	-1.19
38814_at	ATPasa H (+) vacuolar	1.22	
33741_at	ATPasa, transporte de H +, lisosomal	1.23	
33033_at	ATPasa, que transporta H+, lisosomal	-1.29	-1.17
48328_at	Factor de transcripción de bHLH		2.57
39407_at	Proteína morfogenética ósea 1		1.16
31399_at	Proteína morfogenética ósea 10	1.44	1.20
1113_at	Proteína morfogenética ósea 2A	-1.12	-1.13
40367_at	Proteína morfogenética ósea 2A		-1.18
1114_at	Proteína morfogenética ósea 2B o BMP4		-1.70
1831_at	Proteína morfogenética ósea 5	-1.43	-1.60
1733_at	Precursor de la proteína morfogenética ósea 6		1.27
40333_at	Proteína morfogenética ósea-4 (hBMP-4)		-1.42
34847_s_at	Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaM quinasa) beta II		1.3
33935_at	Proteína que enlaza calciclina		1.41
1751_g_at	Calreticulina	-4.03	
32067_at	Elemento modulador sensible a cAMP (CREM)	1.39	2.75
39241_at	Anhidrasa carbónica I	-2.68	
40095_at	Anhidrasa carbónica II	-1.69	
40163_r_at	Precursor de la proteína matriz de cartílago oligomérico	2.36	
128_at	Catepsina k	1.18	
129_g_at	Catepsina k	1.20	
38466_at	Catepsina k	1.27	



(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
40718_at	Catepsina w	-1.31	
32833_at	Quinasa 1 tipo CDC	1.63	
646_s_at	Isoforma de quinasa 2 tipo CDC helk2/139	1.19	
34163_at	Proteoglicano 6 de sulfato de condroitina		-1.18
598_at	Colágeno tipo II alfa 1	-1.38	-1.19
32488_at	Colágeno tipo III alfa 1	-1.41	
38952_s at	Colágeno tipo IV alfa 2	1.23	1.44
35379_at	Colágeno tipo IX alfa 1	-2.22	
34802_at	Colágeno tipo VI alfa-2 (AA 570 - 998)	-1.37	
38566_at	Colágeno tipo X alfa 1		1.67
37892_at	Colágeno tipo XI alfa-1	1.24	1.18
1026_s_at	Colágeno tipo XI alfa2	-1.20	
1027_at	Colágeno tipo XI alfa2	1.11	
39632_at	colagenasa 3 (metalo proteinasa de matriz 13)	1.20	
36638_at	Factor de crecimiento de tejido conectivo.		-1.32
1943_at	ciclina A		-1.74
40697_at	ciclina A2	-1.60	-1.39
34736_at	ciclina B1	-2.83	
39251_at	ciclina C		-2.03
1983_at	ciclina D2		-1.28
36650_at	ciclina D2	1.21	
35249_at	ciclina E2	-2.95	
1649_at	Proteína que interactúa con ciclina G 1		1.31
1913_at	ciclina G2		-1.29

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
160024_at	quinasa dependiente de ciclina (tipo CDC2) 10 PISLRE		1.53
1942_s_at	quinasa dependiente de ciclina 4		-1.22
1206_at	quinasa dependiente de ciclina 5	1.56	
40549_at	quinasa dependiente de ciclina 5		-1.40
799_at	quinasa dependiente de ciclina 5, subunidad reguladora 1 (p35)	1.32	
41546_at	quinasa dependiente de ciclina 6	1.15	
2031_s_at	inhibidor quinasa dependiente de ciclina- 1A (p21, Cip1)	1.95	
1787_at	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1C		1.18
38673_s_at	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1C		1.13
39545_at	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1C		1.24
1797_at	inhibidor quinasa dependiente de ciclina 2D (p19, inhibe CDK4)		-1.21
35816_at	cistatina B (estefina B)	1.57	
806_at	quinasa inducible por citoquina	1.20	
40049_at	proteína quinasa asociada a muerte 1		-1.30
33903_at	proteína quinasa asociada a muerte 3	-1.22	-7.73
34029_at	Fosfoproteína ácida de matriz de dentina 1 (DMP1)	1.65	
38059_g_at	dermatopontina		1.72
343_s_at	ectonucleótido pirofosfatasa/ Fosfodiesterasa	1.11	
342_at	ectonucleótido pirofosfatasa/ Fosfodiesterasa	1.45	
1442_at	receptor de estrógeno	1.47	
33670_at	receptor de estrógeno	1.30	
1487_at	proteína relacionada al receptor de estrógeno	1.11	
38882_r_at	proteína de caja B sensible a estrógeno (EBBP)	1.22	

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
38902_r_at	proteína de caja B sensible a estrógeno (EBBP)		1.23
39945_at	proteína de activación de fibroblastos	-1.27	
424_s_at	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.	-1.17	
466_at	factor de transcripción general II,		1.34
1102_s_at	receptor alfa de glucocorticoides		1.43
33510_s_at	receptor de glutamato, metabotrópico 1	1.26	1.23
33269_at	componente Gpi1 de N-acetilglucosaminil transferasa GPI1	1.24	1.21
41476_at	subunidad 11 de la proteína G		1.24
1401_g_at	factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (CSF1)	-3.07	-2.57
1911_s_at	proteína inducible al daño de ADN y retardo de crecimiento (gadd45)		2.87
888_s_at	factor de diferenciación de crecimiento 1		-1.43
37615_at	proteína ligada al receptor del factor de crecimiento 10	1.21	
33929_at	proteoglicano de sulfato de heparán (glicano).		2.00
39757_at	Núcleo de la proteína de proteoglicano de sulfato de heparán		1.10
755_at	receptor 1,4,5-trisfosfato de inositol tipo 1		1.27
33506_at	polifosfato de inositol 4-fosfatasa tipo I-beta	1.12	-1.24
33290_at	polifosfato de inositol 5-fosfatasa (5ptase)		-1.20
32697_at	inositol(myo)-1(o 4)-monofosfatasa 1	-1.36	
1975_s_at	factor de crecimiento tipo insulina 1		-1.41
1501_at	factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)		-1.12
1232_s_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina	-1.31	
40422_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 2		-1.27
1586_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 3	1.45	

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
37319_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 3	2.17	
1737_s_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 4		1.13
41420_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 5		1.18
1396_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 5		1.62
1678_g_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 5		1.44
38650_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 5		1.53
1741_s_at	proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina-2	-2.49	-2.11
1464_at	precursor II del factor de crecimiento tipo insulina	1.18	
1591_s_at	precursor II del factor de crecimiento tipo insulina	1.41	1.31
39781_at	Proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 4		1.16
33082_at	Subunidad 10 de integrina alfa	1.33	
35131_at	Sialoproteína que enlaza a integrina (sialoproteína ósea, sialoproteína ósea II)		1.15
40060_r_at	proteína LIM (enigma que enlaza a la proteína quinasa C similar a la proteína de rata)	1.44	1.32
36184_at	lisil hidroxilasa (PLOD) procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5 dioxigenasa		-1.40
34795_at	Isoforma 2 de lisil hidroxilasa (PLOD2)		1.49
36811_at	Proteína tipo lisil oxidasa	-1.44	
1433_g_at	MAD, madres contra homólogo 3 decapentaplégico	1.14	1.73
34655_at	MAGUKs (homólogos de quinasa guanilato asociada a la membrana)	1.23	
36179_at	Proteína quinasa 2 que activa MAP quinasa		1.18

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
35652_g_at	MAP quinasa quinasa quinasa (MTK1)	1.14	
41279_f_at	MAPK8IP1 proteína quinasa 8 que activa al mitógeno que interactúa con la proteína 1		1.25
41280_r_at	MAPK8IP1: proteína quinasa 8 que activa al mitógeno que interactúa con la proteína 1	-1.31	-1.31
1509_at	Metaloproteinasa	-1.42	
976_s_at	Proteína quinasa 1 que activa mitógeno	-1.61	1.12
34006_s_at	Proteína quinasa 8 que activa mitógeno	1.32	
1439_s_at	Proteína quinasa 2 que activa que proteína quinasa que activa mitógeno		1.78
37565_at	MMD: monocito y macrófago asociados a diferenciación	1.28	1.30
38369_at	Gen de respuesta primaria de diferenciación de mieloides (88)		-1.10
1052_s_at	Proteína beta NF - IL6		1.30
36472_at	N-myc e Interactuador STAT		-1.35
38354_at	Factor nuclear NF-IL6 (AA 1-345)		1.92
33106_at	Receptor nuclear huérfano subfamilia del receptor nuclear alfa LXR 1, grupo H, miembro 3		3.29
33381_at	Receptor nuclear coactivador		1.11
279_at	Subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 1		2.30
280_g_at	Subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 1		3.08
37623_at	Subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 2 miembro de la familia del receptor de la hormona esteroide/tiroidea		27.72
547_s_at	Subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 2 miembro de la familia del receptor de la hormona esteroide/tiroidea		26.77

(continuación)

<u>GeneChip® identificador del grupo de sondas de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
190_at	Subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 3 miembro de la familia del receptor de esteroide/tiroidea de los receptores de la hormona nuclear		5.45
41202_s_at	Proteína OS-4 (OS-4)	1.24	
1451_s_at	OSF-2 factor 2 específico de osteoblastos (periostina)	-1.65	
38822_at	O-sialoglicoproteína endopeptidasa		2.43
467_at	Factor estimulante de osteoclastos (OSF	-1.23	
35107_at	Ligando de osteoprotegerina		3.33
33814_at	Proteína PAK4	1.16	
38757_at	Proteína asociada a PDGF	-1.89	
40253_at	fosfatidilinositol 4-quinasa (NPIK-C).	1.77	
37412_at	fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa isoforma C (-1)	-1.87	
751_at	Fosfatidilinositol glucano clase C (PIG-C)	1.14	-1.25
666_at	Fosfodiesterasa 4A, cAMP específico	1.33	1.30
38526_at	Fosfodiesterasa 4D, cAMP específico	1.30	3.53
38921_at	Fosfodiesterasa IB, dependiente de calmodulina	1.52	
38944_at	Fosfodiesterasa IB, dependiente de calmodulina		1.17
32029_at	fosfoinositida dependiente de proteína quinasa 1 (3)		1.16
31699_at	fosfoinositida -3-quinase	1.56	1.16
1085_s_at	fosfolipasa C		-1.14
364_s_at	fosfolipasa C b3	1.22	
901_g_at	fosfolipasa C, beta 4	-1.20	
1293_s_at	fosfolipasa D	-1.26	
32306_g_at	preprocolágeno tipo I alfa-2	1.19	
35473_at	preprocolágeno tipo I alfa1.	-2.72	

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
38951_at	PRKCQ Proteína quinasa C, teta		1.43
32307_s_at	procolágeno	1.13	
34494_at	procolágeno I-N proteinasa.		1.92
37605_at	procolágeno tipo II alfa1		1.91
36109_at	prolidasa (imidodipeptidasa) PEPD	-2.55	
1884_s_at	Antígeno nuclear de proliferación celular	-1.85	
34390_at	Subunidad de prolil 4-hidroxilasa alfa (II)		1.19
37037_at	Subunidad de prolil 4-hidroxilasa alfa		1.20
36666_at	prolil 4-hidroxilasa beta	1.95	
36533_at	prostaciclina sintasa		1.20
718_at	proteasa, serina, 11 (que enlaza IGF)		-1.30
719_g_at	proteasa, serina, 11 (que enlaza IGF)	-1.43	
385_at	Subunidad proteasoma (prosoma, macropáina), tipo beta, 10	1.36	
39183_at	proteína quinase 1 PCTAIRE	-1.17	
37698_at	proteína quinase A (PRKA) proteína de anclaje 1		1.29
397711_at	proteína quinase C substrato 80K-H		1.13
39161_at	proteína quinase Njmu-R1		1.21
35348_at	proteína quinase, que activa AMP, subunidad no catalítica beta 1		2.10
36359_at	proteína quinase, dependiente de cAMP, catalítica, gama	1.39	
546_at	proteína quinase, dependiente de cAMP, catalítica, inhibidor alfa		1.14
227_g_at	proteína quinase, dependiente de cAMP, reguladora, tipo I, alfa		1.18
41768_at	proteína quinase, dependiente de cAMP, reguladora, tipo I, alfa		1.15

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
1091_at	proteína quinase, dependiente de cAMP, reguladora, tipo I, beta	1.65	
116_at	proteína quinase, dependiente de cAMP, reguladora, tipo II, alfa	1.28	
33633_at	Receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 11	1.90	
32737_at	Sustrato 2 de la toxina botulínica C3 relacionada con RAC2 Ras2 (familia rho, proteína Rac2 que enlaza GTP pequeños)	1.16	
40299_at	RE2 receptor acoplado a proteína G		1.24
35668_at	Proteína 1 que modifica la actividad del receptor (calcitonina) RAMP 1		1.34
40696_at	receptor que interactúa con serina treonina quinasa 1 (TNFRSF)		1.12
1007_s_at	receptor tirosina quinasa DDR	1.21	
37701_at	Regulador de señalización 2 de la proteína G, 24kD		2.06
1048_at	Receptor gamma de retinoide X	1.47	1.34
36217_at	serina/treonina quinasa 38	1.54	
41544_at	Quinasa inducible a suero		1.16
32447_at	SF-1; factor esteroideogénico 1	8.76	
36487_at	homeobox 2, de corto tamaño		-1.46
41222_at	Transductor de señal y activador de transcripción 6 (STAT6)	1.44	
1955_s_at	SMAD6 (inhibe señalización de BMP/Smad1 (MADH1))	1.19	
37718_at	SNF-1 relacionada quinasa	1.49	1.19
35883_at	Spi-B		-2.80
1244_at	Stat2		-1.12
506_s_at	Stat5A		1.16
38994_at	Inhibidor 2 STAT que induce STAT inhibitor-2		1.25



(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
38669_at	Serina/treonina quinasa relacionada a Ste20	1.24	1.65
37152_at	Superfamilia del receptor de la hormona esteroide		1.19
35844_at	sindecano 4		1.37
38374_at	TEIG; TGFB respuesta inducible de crecimiento precoz	1.18	
38427_at	TEIG; TGFB respuesta inducible de crecimiento precoz		1.38
32080_at	Proteína tipo transportador de tetraciclina		1.41
224_at	TGFB respuesta inducible de crecimiento precoz; TIEG	1.26	
36940_at	TGFBI inducida por el factor de antiapoptosis 1	1.22	1.60
32217_at	TGF beta inducida por a proteína 12 de apoptosis	1.40	
41445_at	Precursor TGF beta	1.14	
1890_at	Proteína de la superfamilia TGF beta	1.74	
40631_at	Tob	-1.14	1.59
39358_at	Co-represor 2 del receptor nuclear co-represor transcripcional		1.42
1385_at	Proteína inducida por el factor de crecimiento de transformación		1.36
1830_s_at	Factor beta del crecimiento transformante		1.17
1767_s_at	Factor beta 3 del crecimiento transformante (TGF-beta 3)	-1.71	-1.63
40581_at	TRIO: dominio funcional triple (que interactúa con PTPRF)	1.65	1.56
32272_at	tubulina alfa	-1.20	
685_f_at	tubulina alfa isotipo H2-alfa	-4.36	-1.79
330_s_at	tubulina alfa, 1,	-1.80	-1.15
151_s_at	tubulina beta	-1.40	
39399_at	tubulina beta cofactor D	-1.85	
471_f_at	tubulina beta, 4	-1.38	

(continuación)

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas</u> <u>de expresión</u>	<u>Gen de codificación</u>	No. de veces que se incrementa la calcitonina de salmón	No. de veces que se incrementa PTS893
40567_at	Tubulina, alfa 3	-1.39	
709_at	Tubulina, beta 3	-1.18	
33678_i_at	Tubulina, beta, 2	-1.15	
33679_f_at	Tubulina, beta, 2	-1.31	
1651_at	Proteína transportadora de ubiquitina E2-C	-3.74	-1.22
32548_at	Receptor de progesterona inactivo		-1.33
1953_at	Factor de crecimiento endotelial vascular	1.40	1.20
36101_s_at	Factor de crecimiento endotelial vascular	1.45	1.44
36140_at	Proteína 1 que enlace a la caja Y	2.30	5.49

- números = veces Baja expresión

+ números = veces Sobre expresado

PCR en tiempo real. Con base en los datos del microarreglo de ADN, se escogió un grupo de transcritos para análisis cuantitativo por medio de PCR en tiempo real (RT-PCR).

- 5 En resumen, el método explota al colorante SyBr Green que se intercala dentro del ADN bicatenario. Se detecta la acumulación de productos PCR directamente monitoreando el incremento en fluorescencia del colorante SyBr Green. Las reacciones se caracterizan por el momento en el tiempo durante la ciclización cuando se detecta primero la amplificación de un producto PCR en vez de la cantidad de producto PCR acumulada después de un número fijo de ciclos. Entre mayor sea el número de copias de partida de ácido nucleico objetivo, más pronto se observa un
- 10 incremento significativo en fluorescencia.

- 15 A partir de cada muestra de ARN, se elaboró ADNc utilizando un kit de Applied Biosystem (Applied Biosystems # N808-0234) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se preparó la mezcla de PCR utilizando la SyBr Green Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems # 4309155) de la siguiente manera: 5 µl de un molde de ADNc, 400 nM de cada iniciador, desoxinucleótido trifosfatos 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y 0.5 U de Taq ADN polimerasa, 5 µl de amortiguador para PCR SyBr Green y ARNasa libre de agua hasta un volumen final de 50 µl. Se llevó a cabo la PCR utilizando el Sistema de Detección de Secuencia 7700 de ABI Prism, después e una etapa a 95°C durante 10 mi n, se llevó a cabo el programa de ciclos por etapas para un total de 40 ciclos de la siguiente manera: 95°C durante 30 s, 60°C durante 1 min. Se incluyó un control negativo: mezcla de reacción PCR con agua en lugar de la muestra ADNc.

- 20 Se determinó la concentración inicial de molde con base en el ciclo de umbral. El ciclo de umbral les el ciclo PCR en el cual se detecta primero fluorescencia por encima de la señal de fondo y se ha demostrado que es inversamente proporcional al número de copias objetivo presentes en la muestra. Se llevó a cabo la cuantificación calculando la concentración objetivo desconocida con relación a un estándar absoluto y por medio de la normalización con un control endógeno validado tal como un gen constitutivo (acción β). Los resultados se presentan como porcentaje de
- 25 control, una vez se ha calculado la relación entre los números de molécula para el gen de interés dividido por el número de molécula para beta-actina.

Con base en los datos del microarreglo de ADN se escogió el siguiente grupo de transcritos para análisis cuantitativo por medio de RT-PCR: receptor de adhesión CD44, angiopoyetina, proteína 5 morfogenética ósea,

angiopoyetina, proteína 5 morfogenética ósea, anhidrasa carbónica II, proteína de la matriz oligomérica de cartílago, catepsina K, osteopontina, colágeno pre-pro-alfa-2 tipo I, Spi-B y proteína de enlazamiento de Y-Box.

Tabla 38

Resultados de PCR tiempo real

<u>GeneChip®</u> <u>identificador del</u> <u>grupo de sondas de</u> <u>expresión</u>	Gen codificador	Efecto del tratamiento de calcitonina de salmón (% respecto al control)	Efecto del tratamiento de PTS893 (% respecto al control)
1372_at	Receptor de adhesión CD44	No cambia	No cambia
1929_at	angiopoyetina-1	No cambia	No cambia
1831_at	Proteína morfogenética ósea 5	+16	+18
40095_at	Anhidrasa carbónica II	-60	No cambia
40161_at	Proteína de la matriz oligomérica del cartílago	34,23	No cambia
128_at	Catepsina k	+67,2	No cambia
2092_s_at	osteopontina	No cambia	No cambia
32306_g_at	Colágeno tipo I pre-pro-alfa-2	+38	+62
35883_at	Spi B	-44	-18
36140_at	Proteína que enlaza la caja Y (hueso)	+14	+26
36140_at	Proteína que enlaza la caja Y (riñón)	+15	n.a.
36140_at	Proteína que enlaza la caja Y (músculo)	-26	n.a.

n.a. : no aplica

5

La RT-PCR confirmó en la mayoría de los casos los cambios observados en el análisis del perfil génico, como fue el caso para la proteína 5 morfogenética ósea, la anhidrasa carbónica II, la catepsina K, la proteína de la matriz oligomérica de cartílago, el colágeno pre-pro-alfa-2 tipo I, Spi-B y proteína de enlazamiento de Y-Box. Sin embargo no se detectaron cambios en el nivel de expresión del receptor de adhesión CD44, angiopoyetina-1 y osteopontina.

10 Análisis. Se sabe que la calcitonina ejerce un efecto sobre la diferenciación, la supervivencia y la actividad de reabsorción de osteoclastos, resultando en una menor actividad osteoclástica. Pondel M, Intl. J. Exp. Pathol. 81 (6): 405 - 22 (2000). Estos efectos podrían ser reconstruidos por medio del perfil génico de múltiples órganos (Tabla 39).

Tabla 39

## Efectos sobre osteoclastos

Función	Genes codificadores	Calcitonina de salmón	PTS893
<u>Osteoclasto</u>	PU.1 (SPI1)	B, K, P, T	B
<u>Determinación, supervivencia y diferenciación</u>	Factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (CSF1)	B, K	B
	Diferenciación asociada de monocitos y macrófagos (MMD)	B, K, T	B
	Factor de estimulación de osteoclastos (estimulación autocrina de la actividad de resorción de osteoclastos)	B, K, L, P	
<u>Resorción de hueso por medio de los osteoclastos</u>	H+ ATP-asas	ALL	B
	Anhidrasa carbónica I, II	B, L, P	
	Catepsina k	ALL	
	ODF/OPGL: ligando de osteoprotegerina		<u>B</u>
<u>Movilidad de osteoclastos</u>	Tubulina S	ALL	
	Proteína PAK4	B, M, P	

Perfil de la expresión génica de múltiples órganos en animales tratados con calcitonina de salmón. Se muestran los órganos donde se observaron cambios de expresión. B = hueso; K = riñón; M = músculo; P = pituitaria; L = hígado; T = tráquea.

- 5 PU.1 está involucrado en las etapas iniciales de osteoclastogénesis. Tondravi MM et al., Nature 386(6620): 81 - 4 (1997). CSF-1 es imperativo para la maduración del macrófago; se enlaza con su receptor de c-fms sobre precursores tempranos de osteoclasto, suministrando las señales requeridas para su supervivencia y proliferación. Teitelbaum SL, Science 289(5484):1504 - 1508 (2000).
- En forma muy interesante, PTS893 también regula los genes implicados en la diferenciación y supervivencia de osteoclastos, SPI1, CSF-1 y MMD. Esta regulación del osteoclasto no ha sido previamente descrita.
- 10 Se ha demostrado que la calcitonina de salmón regula la expresión del gen que codifica para el factor de estimulación de osteoclastos (OSF), que es una proteína intracelular producida por los osteoclastos que induce indirectamente la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea. Reddy S et al., J. Cell Physiol. 177 (4): 636 - 45 (1998). Esto implicaría un efecto autocrino de la calcitonina de salmón en la regulación de la función del osteoclasto, que es descrita aquí por primera vez.
- 15 Además, la calcitonina de salmón parece ejercer una regulación paracrina de la actividad de reabsorción de los osteoclastos, a través de la regulación de la expresión de cistatina en los osteoblastos. La anhidrasa carbónica I, II, las H+-ATPasas y la catepsina K son los principales efectores para disolver mineral óseo y la degradación de la matriz. Blair HC et al., Biochem. (2002). Regulation of tubulins and PAK4 genes can be related to the effect of calcitonin on osteoclast motility PAK 4. Zaidi M et al., Bone 30(5): 655 - 63 (2002); Jaffer ZM & Chernoff J, Intl. J. Biochem. Cell Biol. 34(7): 713 - 7 (2002).
- 20

Estos resultados muestran los efectos moduladores de la calcitonina sobre los genes que afectan la regulación directa, autocrina, paracrina y endocrina de la función de los osteoblastos (Tabla 40). Estos datos soportan la hipótesis que atribuye un efecto anabólico óseo a la calcitonina.

Tabla 40

## Efectos sobre osteoblastos

Función	Genes codificadores	Calcitonina de salmón	PTS893
<u>Antagonistas de Captresina; actividad anti-resorptiva</u>	Cistatinas	B	
<u>Autocrina/paracrina</u>	Glicoproteína HS alfa 2	B, K, T	
<u>función de regulación de osteoblastos</u>	Proteínas morfogenéticas óseas	ALL	B
	Factor de crecimiento de fibroblastos	B, K, M, T	B
	IL6/LIF		B
	Factor de crecimiento tipo insulina	ALL	B
	TGFs	B, K, M, P	B
	Tob	B, M, P	B
	Factor de crecimiento endotelial vascular	B, M	X
<u>Regulación endocrina de la</u>	activina	B, M, L, P	B
<u>Función de osteoblastos</u>	receptor de estrógeno	ALL	
	receptor retinoico X	B, P	B
	receptores nucleares del factor esteroideogénico (familia esteroide/tiroidea)	B, L, P, T	
<u>Factor de transcripción que regula la síntesis de colágeno tipo I</u>	Proteína que enlaza la caja -Y	B, K, M, P	B

Perfil de la expresión génica de múltiples órganos en animales tratados con calcitonina de salmón. Se muestran los órganos donde se observaron cambios de expresión. B = hueso; K = riñón; M = músculo; P = pituitaria; L = hígado; T = tráquea.

- 5 Tres familias de factores de crecimiento, los factores de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), los factores de crecimiento tipo insulina (IGF), y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), se considera que son los reguladores locales principales de la osteogénesis. Se cree que las proteínas morfogenéticas óseas tienen sus efectos principales sobre la replicación temprana en células óseas precursoras y el compromiso de los osteoblastos. En
- 10 contraste, se piensa que los TGF- $\beta$  son los inductores más potentes de replicación de las células óseas comprometidas y de producción de la matriz de osteoblastos, mientras que los IGF parece que integran y extienden el efecto de ambos factores. McCarthy TL et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med. 11(4): 409 - 22 (2000). Estos resultados apoyan el hecho de que tanto la calcitonina de salmón como PTS893 son capaces de regular estos factores sistémicos y locales implicados en el metabolismo óseo. El hecho de que la calcitonina de salmón regule a la
- 15 formación ósea con la edad, y una osteogénesis mejorada que depende de citoquina (QU). Szwera M et al., J. Biol. Chem., 277(22): 19991 - 19997 (2002).

5 Se demostró también que la calcitonina de salmón y PTS893 modulan la expresión de los genes que codifican para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se sabe que VEGF juega un papel clave en angiogénesis normal y patológica. El papel crítico de la angiogénesis para una osteogénesis exitosa durante la osificación endocondral está bien documentado. El VEGF induce indirectamente proliferación y diferenciación de osteoblastos por medio de la estimulación de células endoteliales para producir factores de crecimiento osteoanabólicos. Wang DS et al., *Endocrinology* 138(7): 2953 - 62 (1997). Además, el VEGF estimula la migración quimotáctica de osteoblastos humanos primarios, lo que sugiere un papel funcional en la formación y remodelación de hueso. Mayr-Wohlfahrt U et al., *Bone* 30 (3): 472 - 7 (2002).

10 Se han descrito ampliamente los efectos de la hormona paratiroidea sobre los osteoblastos para mediar tanto la reabsorción como la formación ósea. Swarthout JT et al., *Gene* 282(1 - 2):1 - 17 (2002). Ha sido posible confirmar aquí el efecto de PTS893 sobre citoquinas como la interleuquina 6 (IL-6), que media la activación paracrina de la diferenciación y actividad de los osteoclastos. Greenfield EM et al., *Life Sci.* 65:1087 - 102 (1999). PTS893 también produjo una fuerte expresión sobre receptores nucleares (familia de esteroides/tiroides).

15 Tanto los receptores de calcitonina como de la hormona paratiroidea pertenecen a la superfamilia del receptor de la proteína G. Después de la estimulación del receptor, la traducción de la señal es mediada por las rutas de adenilato ciclasa/cAMP/proteína quinasa, fosfolipasa C, fosfolipasa D, y MAPK (como un efector tardío) en el caso de la calcitonina, y por la adenilato ciclasa y fosfolipasa C en el caso de la hormona paratiroidea. Los análisis del perfil génico permitieron la reconstrucción de estas rutas, mostrando genes que fueron modulados por el tratamiento y que están localizados en diferentes niveles de la ruta de transducción de la señal.

20 Tabla 41

Efectos sobre la transducción de la señal y el ciclo celular

Función	Gen de codificación	Calcitonina de salmón	PTS893
<u>Señal de transducción</u>	Adenilato ciclasa		B
	Proteína que enlaza calciclina		B
	Calreticulina	B, K, M	
	CREM	B, L, P	B
	CDC quinasa	B, M	
	MAPK	TODOS	B
	Proteína quinasas	TODOS	
	Vía del Fosfatidilinositol	TODOS	B
	Fosfodiesterasa (1B, 4A, 4B)	TODOS	B
	Fosfolipasa (C, D)	TODOS	B
	PCNA	B	
	Vía SMAD	TODOS	B
	Vía STAT	TODOS	B

(continuación)

## Efectos sobre la transducción de la señal y el ciclo celular

Función	Gen de codificación	Calcitonina de salmón	PTS893
<u>Ciclo Celular</u>	Ciclinas (A, A2, B1, C, D2, E2, G1, G2)	B	B
	Quinasas dependientes de ciclina 5, 6, 10	B, K, P, T	B
	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 1A, 1C, 2D	B	B

Perfil de la expresión génica de múltiples órganos en animales tratados con calcitonina de salmón. Se muestran los órganos donde se observaron cambios de expresión. B= hueso; K= riñón; M= músculo; P= pituitaria; L= hígado; T= tráquea.

5

10

La proteína morfogenética ósea (BMP) controla la proliferación y diferenciación de los osteoblastos a través de proteínas Smad. Tob, un miembro de la familia que emerge de las proteínas antiproliferativas, es un regulador negativo de la señalización de BMP/Smad en osteoblastos. La ruta de Smad así como Tob como uno de sus reguladores fueron también identificados como genes modulados por el tratamiento con sCT y PTS893, de acuerdo con el efecto hipotético de ambos compuestos sobre la regulación de BMP de la remodelación ósea. Dentro de este contexto, ambos compuestos parecen ejercer una influencia directa sobre el ciclo celular, ya que podrían observarse también cambios en las ciclinas y en proteínas relacionadas con la ciclina.

Ambos compuestos regulan tanto la síntesis como la degradación de los componentes de la matriz extracelular (Tabla 42).

15

Tabla 42

## Efectos sobre la matriz extracelular

Función	Gen de codificación	Calcitonina de salmón	PTS893
<u>Célula adjunta. Señal de transducción.</u>	Integrinas	B, M, P	B
<u>Digestión de Colágeno</u>	Colagenasa	B	
	Metaloproteinasa de matriz I, II	B, L, P, T	
<u>Síntesis de colágeno</u>	Procolágeno endopeptidasa/proteinasa		B
	Lisil hidroxilasa		B
<u>Componente extracelular de la matriz</u>	Agrecano		B
	Precursor de proteína de matriz oligomérica de cartílago	B, K	
	Colágeno tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, tipo V,	TODOS	B
	Colágeno tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, tipo V, XIV, tipo XV, y/o tipo XVI)		

(continuación)

## Efectos sobre la matriz extracelular

Función	Gen de codificación	Calcitonina de salmón	PTS893
	Proteoglicano sulfato de condroitina	K, M, T	B
	Dermatopontina		B
	Proteoglicano de sulfato de heparán	L,T	B
	Sindecano		B

Perfil de la expresión génica de múltiples órganos en animales tratados con calcitonina de salmón. Se muestran los órganos donde se observaron cambios de expresión. B= hueso; K= riñón; M= músculo; P= pituitaria; L= hígado; T= tráquea.

- 5 De particular interés es la regulación de la proteína de enlace de Y-Box (YB-1), que parece ser modulada por ambos tratamientos y en cuatro de seis órganos analizados en el grupo de la calcitonina de salmón. YB-1 es una proteína que interactúa con un elemento de respuesta de TGF- $\beta$  en la región distal del gen alfa 1(I) para colágeno. La proteína YB-1 activa al promotor de colágeno y se transloca dentro del núcleo durante la adición de TGF- $\beta$  a los fibroblastos, lo que sugiere un papel para esta proteína en la señalización de TGF- $\beta$ . Sun W et al., Matrix Biol. 20(8): 527 - 41 (2001).

Además, la calcitonina de salmón y PTS893 regulan algunos aspectos de la mineralización de la matriz extracelular ósea, ya que se observaron cambios en la amelogenina, dentina y ectonucleótido pirofosfatasas.

Tabla 43

## Efectos sobre la mineralización y visualización

Función	Gen de codificación	Calcitonina de salmón	PTS893
Componente de cemento	Amelogenina	B, L	B
Proteína de matriz mineral	Dentina	B	B
Enzima para síntesis de Pi inorgánico	Ectonucleótido pirofosfatasas	B, M	
Vascularización del factor de crecimiento	VEGF	B,M	B

Perfil de la expresión génica de múltiples órganos en animales tratados con calcitonina de salmón. Se muestran los órganos donde se observaron cambios de expresión. B= hueso; K= riñón; M= músculo; P= pituitaria; L= hígado; T= tráquea.

15

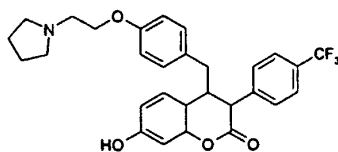
**EJEMPLO VII**

Perfil de expresión génica del compuesto de fórmula (II)

El compuesto de fórmula (II), 7-hidroxi-4-[4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-bencil]-3-(2,4-dicloro-fenil)-cromen-2-ona, como se muestra:

20





Formula (II)

- 5 El compuesto de fórmula (II) fue desarrollado para el tratamiento de enfermedades de reabsorción ósea que incluyen, generalmente, osteoporosis, cáncer óseo metastático, lesiones osteolíticas con implantes ortopédicos, enfermedad de Paget, y pérdida de hueso asociada con hipertiroidismo. El compuesto de fórmula (II) puede ser utilizado también para tratar otras condiciones asociadas con IL-6 incluidos diferentes cánceres (por ejemplo cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer endometrial, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, y carcinoma cervical) y artritis (por ejemplo artritis inducida por adyuvante, colágeno y antígeno, particularmente artritis reumatoide). Ver, las solicitudes publicadas de patente PCT WO 96/31206, WO 00/39120, WO 01/49673. El compuesto de fórmula (II) tiene actividad estrogénica, antiestrogénica, antifertilidad y uterotrópica.
- 10 El propósito de este Ejemplo es identificar la "firma del compuesto" del compuesto de fórmula (II), para definir una estrategia para un desarrollo adicional. Las principales preocupaciones son la estimulación potencial del útero y la inducción de trombosis venosa profunda (DVT). Además, un objetivo del Ejemplo es identificar biomarcadores para evaluar la eficacia o el riesgo del compuesto de fórmula (II).
- 15 Los Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (SERM) son moduladores selectivos del receptor de estrógenos que actúan como agonistas o antagonistas dependiendo del tejido objetivo. Para aumentar nuestra comprensión de los efectos directos específicos del tejido de diferentes SERM y para elucidar los mecanismos moleculares subyacentes, se inició un estudio para llevar a cabo un perfil exhaustivo de expresión génica *in vivo* utilizando microarreglos de ADN.
- 20 La tecnología de microarreglos de expresión génica permite la detección y medición simultánea de la expresión de miles de genes en una célula dada o muestra de tejido en un solo experimento. van de Rijn M & Gilks CB. *Histopathology* 44:97 - 108 (2004). Esta técnica tiene ventajas significativas sobre los métodos anteriores para medir la expresión génica, tales como la reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa y análisis de transferencias tipo Northern, que están limitados a la evaluación de pequeñas cantidades de genes por experimento.
- 25 Debido a que la tecnología de microarreglos permite un perfil rápido de expresión génica global (GEP), proporciona una herramienta poderosa para el análisis de un amplio rango de enfermedades, investigación farmacogenómica, selección de alto rendimiento en el descubrimiento de fármacos, y selección diagnóstica para diferentes enfermedades. Heller M J. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 4:129 - 153 (2002). El perfil de expresión génica puede ser utilizado para identificar los genes cuya expresión alterada puede estar directamente relacionada con la causa de una enfermedad en particular. Por medio de una evaluación sistemática de los genes identificados por tales selecciones, los investigadores incrementan la probabilidad objetivos adecuados no cubiertos para intervención terapéutica. Además, el uso del perfil de expresión génica en farmacogenómicos puede ser útil para identificar efectos potenciales indeseados del tratamiento con el fármaco identificando los cambios en expresión génica. En forma similar, el perfil de expresión génica puede ser utilizado en la identificación de pacientes que tengan una mayor probabilidad de lograr un resultado significativo a partir de un tratamiento terapéutico dado.
- 30 Aunque se han descrito métodos para detectar cambios en la expresión génica en respuesta a la terapia, no se ha descrito un método para dar puntaje (o clasificar) agentes de tratamiento con base en sus respectivos perfiles de expresión génica.
- 35 Tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM), es un agente hormonalmente activo no esteroideo que tiene efectos agonísticos y antagonísticos en diferentes tejidos objetivo; es un antagonista en tejido de mama y un agonista en el útero. Kiang D T & Kennedy B J, *Ann Intern Med*. 87:687 - 690 (1997); Jordan V C & Allen K E, *Eur. J. Cancer* 16:239 - 251 (1980); Jordan V C et al., *Breast Cancer Res Treat.* 10:31 - 35 (1987); Gottardis M M et al., *Cancer Res.* 48:812 - 815 (1998); Fornander T et al., *Lancet* 1:117 - 120 (1989). El tamoxifeno es un agente antitumoral efectivo que se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama mediado por estrógeno y como un agente quimiopreventivo; disminuye el riesgo tanto del cáncer de mama invasivo como no invasivo. Sin embargo, el tamoxifeno incrementa el riesgo de hiperplasia uterina y el cáncer a través de sus efectos proestrogénicos sobre el endometrio. Estos efectos indeseados conducen a una búsqueda de los SERM con mejores perfiles de seguridad. El raloxifeno, una segunda generación SERM que tiene un perfil terapéutico y de seguridad más favorable que el tamoxifeno, fue desarrollado posteriormente. Cohen F J et al., *Obstet. Gynecol.* 95:104 - 110 (2000); Ring J et al. (The Desloratadine Study Group) *Int J Dermatol.* 40:1 - 5 (2001); Fugere P et al., *Am J Obstet Gynecol.* 182:568 - 574 (2000). El raloxifeno tiene un efecto antagonístico reducido sobre el endometrio comparado con el tamoxifeno que no está asociado con el riesgo del cáncer endometrial.
- 40
- 45
- 50

Debido a que diferentes SERM exhiben efectos estrogénicos diferenciales sobre el útero, utilizamos este efecto del tratamiento como un sistema modelo para analizar y validar un método nuevo y único para dar puntaje a la actividad farmacológica y toxicológica relativa de diferentes agentes terapéuticos de acuerdo con sus perfiles de expresión génica. El perfil de expresión génica ha sido utilizado para diseccionar los mecanismos moleculares de la fisiología y enfermedad en el útero utilizando cultivos de tejido, ratones transgénicos, y ratas normales. Sin embargo, se han realizado pocos estudios en primates y poco se sabe del perfil de expresión génica en tejido uterino de monos. Ace C I & Okulicz W C, *Reprod Biol Endocrinol.* 2:54(2004); Marvanova M et al., *FASEB J.* 17:929 - 931 (2003); Zou J et al., *Genome Biol.* 3:research0020.1 - research0020.13 (2002). Además, ningún estudio ha incorporado un método para dar puntaje (o clasificar) agentes terapéuticos con base en sus respectivos perfiles de expresión génica. Si tal sistema de clasificación estuviera disponible, tendría una amplia utilidad para un amplio espectro de áreas terapéuticas, y representa un avance significativo para el descubrimiento y desarrollo de nuevas entidades farmacológicas. En el Ejemplo actual, se exploraron los cambios en los perfiles de expresión génica en el útero en monos cinomólogos normales y OVX después de tratamiento con tamoxifeno y raloxifeno; los resultados se comparan con aquellos obtenidos después del tratamiento con estradiol. A la potencia estrogénica de cada agente se le atribuyó luego un puntaje con base en su efecto sobre expresión génica uterina.

Animales. Se sometieron monos cinomólogos sexualmente maduros (*Macaca fascicularis* obtenidos de R.C. Hartelust BV, Tilburg, países bajos) de aproximadamente 48 meses de edad a cirugía (ovariectomía [OVX] o simulación) 10 semanas antes del tratamiento y fueron tratados por artrópodos y helmintos parasitarios, sometidos a una prueba de tuberculina, y aclimatados a las instalaciones para el tratamiento al menos durante 14 días antes del inicio del tratamiento.

Todos los animales recibieron agua corriente, filtrada con un filtro de 0,22 µm, a placer. Se les administró diariamente aproximadamente 180 g de una dieta granulada de OWM (Dietex France, SDS, Saint Gratien, Francia) a cada animal al menos una hora después de la dosis excepto el último día del tratamiento cuando los animales fueron mantenidos en ayunas. Cada animal recibió dos frutas o vegetales al día.

Procedimientos quirúrgicos. Al mono cinomólogo al que se les practicó la ovariectomía (*Macaca fascicularis*), que ha sido validado como un modelo útil predictivo de resultados en ensayos químicos con humanos de estrógeno y de los SERM (Cline J M et al., *Toxicol Pathol.* 29:84 - 90 (2001)), fue utilizado como modelo de la deficiencia de estrógeno. A los animales se les practico la ovariectomía aproximadamente 10 semanas antes del primer día de tratamiento. Se removieron los ovarios después de anestesia con una inyección intramuscular combinada de xilazina (Rompun®: 0.4 mL/animal, Bayer Pharma Division Santé Animale, Puteaux, Francia) y de clorhidrato de quetamina (Imalgène®: 0.6 mL/kg, Merial, Lyon, Francia). Los animales operados en forma simulada fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico excepto por la remoción de los ovarios.

Ensayo de estradiol. Se determinaron los niveles en suero del estradiol en cada animal aproximadamente 2 semanas después de la cirugía con el propósito de verificar el efecto de la ovariectomía. Se recolectaron muestras de sangre venosa (aproximadamente 1.5 mL) de animales no mantenidos en ayunas en tubos sin anticoagulante y se las analizó utilizando radioinmunoensayo (Sorin, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Francia).

Protocolo del tratamiento. Se dividieron los animales que recibieron la ovariectomía y los operados en forma simulada en grupos de 4 y se los trató como se describe a continuación.

Tabla 44

Cirugía	Droga	Dosis (mg/kg/día PO)
Simulación	Control de vehículo	-
OVX	Control de Vehículo <sup>1</sup>	-
OVX	Estradiol <sup>2</sup>	0.4
OVX	Tamoxifeno <sup>3</sup>	10.0
OVX	Raloxifeno <sup>3</sup>	10.0

40

(continuación)

Cirugía	Droga	Dosis (mg/kg/día PO)
---------	-------	----------------------

<sup>1</sup>Una solución acuosa de 0.5% de carboximetilcelulosa fue usada como vehículo.

<sup>2</sup>El etinil estradiol fue preparado en aceite de maíz.

<sup>3</sup>Tamoxifeno y raloxifeno fueron preparados en una solución acuosa de 0.5% de carboximetilcelulosa.

5 Preparación del tejido. Se determinó la expresión génica en la pituitaria y en el útero al final de la terapia con el fármaco. Se extirparon los tejidos que iban a ser analizados (glándulas de pituitaria y útero) se las ultracongeló en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C hasta que se llevo a cabo la extracción del ARN.

10 Análisis del microarreglo de ADN. Se obtuvo el ARN total por medio de extracción con ácido guanidinio isotiocianato-fenol-cloroformo (Trizol; Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EUA) y purificó sobre una columna de resina de afinidad (RNeasy; Qiagen, Hilden, Alemania) desacuerdo con las instrucciones del fabricante. Chomczynski P & Sacchi N. Anal Biochem. 1987; 162:156 - 159. Los experimentos con el microarreglo de ADN fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del sistema GeneChip (Affymetrix, Inc. 2002) y como se describió previamente. Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, et al. Nat Biotechnol. 1996; 14:1675 - 1680.

15 Estudios previos han probado la valides de los análisis con el chip de ADN entre especies (Hacia J G et al. Nat Genet 18: 155 - 158 (1998)), por lo tanto, se utilizaron los arreglos de la sonda de expresión génica humana HGU133A (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) que contienen 22.283 grupos de sondas que interrogan a los genes humanos anotados principalmente. Se utilizó un GeneChip por tejido, por animal. Se procesaron los archivos de las imágenes resultantes (archivos. dat) utilizando el software Microarray Analysis Suite 5 (MAS5) (Affymetrix, Inc.). Se obtuvieron archivos delimitados por tabuladores que contienen datos relacionados con la intensidad de la señal (Signal) y la medición categórica del nivel de expresión (Absolute Call).

20 Cuantificación de la potencia del fármaco con relación a la acción específica del fármaco; eje de puntuación de GEP. Para definir un eje de referencia que representa la acción farmacológica/toxicológica deseada, utilizamos un conocimiento a priori de 2 grupos que representan o se aproximan a los extremos de la condición bajo estudio. Estos consistieron del grupo OVX (animales no tratados por OVX que representan uno de los extremos) y OVX + estradiol (animales sometidos a OVX tratados con estradiol, un agente conocido por ejercer una acción bien definida, que representa el otro extremo). Estos dos grupos fueron utilizados para escalar cuantitativamente eje. Se posicionaron luego otros compuestos sobre este eje mediante lo cual se podían clasificar los fármacos con relación a aspectos específicos de una acción farmacológica/toxicológica.

30 Selección de características. Generalmente, los datos derivados de un experimento de un perfil de un microarreglo individual, proteómico, o de un metabolito pueden ser considerados como una huella dactilar. Sin embargo, en términos prácticos, muchas de las características (por ejemplo genes) no representan una información relevante y únicamente confunden el análisis de los resultados de tales experimentos. Por lo tanto, la selección y eliminación de las características apropiadas es un aspecto importante de esta metodología y la naturaleza cuantitativa de esta aproximación depende de las características utilizadas para definir el eje de la acción del fármaco.

35 En el caso de una condición bien definida, es posible invocar un conocimiento a priori sobre la selección de las características. Si la biología molecular de la acción específica del fármaco es conocida, se puede definir a priori las características (por ejemplo genes, metabolitos) que son utilizados para la definición del eje. En el caso de una condición menos bien definida, es posible utilizar filtros de una sola variedad (en este caso, la intensidad génica >50, ≥1,5 veces el cambio en expresión vs. los controles [OVX], y significancia estadística y métodos estadísticos para identificar y excluir características no informativas.

40 Pretratamiento de los datos. Se consideraron los problemas de transformación, centrado (en forma de variables), y de escalamiento de los datos. En el caso de microarreglos, los datos fueron transformados usando logaritmo en base 10 y el centrado en forma de grupos de sondas. En general, no se aplicó escalamiento. Cuando se utiliza únicamente un pequeño número de características biológicamente identificadas, estas fueron escaladas hasta la unidad de varianza.

- 5 Análisis del componente principal. Para calcular el eje de la acción del fármaco, se realizó un eje del componente principal (PCA) utilizando únicamente los 2 grupos de tratamiento que estaban en los extremos (los animales sometidos a OVX no tratados vs. los animales sometidos a OVX tratados con estradiol). Massart D L et al., Handbook for Chemometrics and Qualimetrics, Parte a. (Elsevier; 1997); Jolliffe I T. Principal Component Analysis. 2nd Edition (Springer; New York, NY, 2002). Únicamente se calculó 1 componente principal (PC), que era una combinación lineal ponderada de todas las características en los datos de entrada que apuntan en la dirección de una varianza máxima. Los pesos de los grupos de sondas en esta combinación lineal fueron llamados "cargas" y su valor absoluto es una medida de su importancia para explicar la diferencia entre los dos grupos. Cada medición en el experimento (por ejemplo microarreglo) podría ser representada luego por medio de su coordenada (puntuación) sobre el PC. Alternativamente, para obtener una separación aún mejor entre los grupos, se utilizó el método PLS-DA (Partial-Least-Squares Discriminate Analysis (Análisis Discriminado por Mínimos Cuadrados Parciales)) con una variable ficticia 0/1 como vector de respuesta. Barker M & Rayens W. Journal of Chemometrics 17:166 - 173 (2004). Massart D L et al., Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part b. (Elsevier; 1997). La siguiente etapa fue la identificación de las características que eran importantes para la definición del eje. Esto se basó en la magnitud de sus cargas y sus significancia estadística utilizando estimativos de error con base en una validación cruzada y/o gráficos de probabilidad normal de las cargas. Hunter W G & Hunter J S. Statistics for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. 1<sup>st</sup> Edition (Wiley; 1978). Esto permitió el cálculo de un nuevo modelo de PCA utilizando únicamente las características importantes.
- 10 Si una acción farmacológica o toxicológica afectó múltiples rutas bioquímicas que estaban representadas por números extremadamente diferentes de características en la medición, se utilizó un escalamiento de bloque. Eriksson L et al., Multi- and Megavariate Data Analysis - Principles and Applications. (Umetrics Academy; 2001). Esto atribuyó la misma influencia a todas las rutas (grupos de características) en el cálculo del modelo PCA. Se podría aplicar PCA jerárquico para identificar las rutas más importantes de acción del fármaco. Eriksson L et al., J Comput Aided Mol Des. 16:711 - 726 (2002).
- 15 Aplicación del modelo PCA. Utilizando las cargas del modelo PCA final, se calcularon los puntajes de todas las mediciones en los otros grupos de tratamiento (tamoxifeno y raloxifeno). Las medianas (o los promedios) de los puntajes de los dos grupos extremos fueron utilizados para escalar el eje de la acción del fármaco (0 - 100%). El puntaje (potencia estrogénica) del tratamiento (fármaco/dosis) se expresó sobre esta escala para promedios individuales o de grupo (mediana o promedio).
- 20 Análisis estadístico. Se utilizaron las varianzas del puntaje para estimar los intervalos de confianza (Sachs L. Angewandte Statistik, 10. (Springer; Berlín, Alemania, 2002)), y se evaluaron las diferencias significativas entre los grupos con diferentes pruebas estadísticas (por ejemplo la prueba t, la prueba u). Zar J H. Biostatistical Analysis. 4th Edition (Prentice Hall; 1998).
- 25 Las GEP comparativos después del tratamiento con estradiol, tamoxifeno y raloxifeno. Glándula pituitaria. La ovariectomía indujo el favorecimiento significativo de la expresión esperada de los genes que codifican a la hormona latinizante (LH) y la hormona estimuladora de folículos (FSH) en la glándula pituitaria (Tabla 45).

Tabla 45

Efecto de la ovariectomía en la hormona luteinizante y la hormona estimulante del folículo en la glándula pituitaria

	Relativo al No. de veces que cambia OVX						
	OVX (promedio)	SD	Simulación	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno	
Hormona luteinizante	1385	420	0.1	0.1	0.4	1.3	
Hormona estimulante del folículo	4964	971	0.2	<0.1	0.4	0.8	
Cambio del No. de veces de la expresión del control de Simulación							
	Control de simulación (promedio)		SD	OVX	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno

(continuación)

Hormona luteinizante	184	141	7.5	0.5	3.2	9.8
Hormona estimulante del folículo	807	290	6.1	0.1	2.3	5.2

OVX, ovariectomizada; EE, etinil estradiol

Datos obtenidos de a animales/grupo (1 ADN chip/animal).

- 5 Comparado con la cirugía simulada, los niveles de transcripto fueron 7,6 y 6,2 veces superiores (LH y FSH, respectivamente) en animales sometidos a OVX no tratados. La administración de estradiol reversó los efectos de la ovariectomía, y disminuyó la expresión de los transcriptos LH y FSH 16,4 y 73,4 veces, respectivamente, bien por debajo de los valores fisiológicos normales. El tamoxifeno tuvo un efecto estrogénico débil, disminuyendo la expresión génica de LH y FSH en la pituitaria en 2,4 y 2,7 veces en monos sometidos a OVX. El raloxifeno tuvo un efecto mínimo sobre la expresión de gonadotropina, reduciendo los transcriptos LH y FSH en 1,2 a 1,3 veces.
- 10 Útero. El efecto sobre la expresión génica uterina se subdividió por agrupaciones de genes en diferentes categorías lógicas; transducción de señal, factores de crecimiento, matriz extracelular, y como grupo, los genes involucrados en el ciclo celular, transporte, y redox.
- Inductores de la transducción de señal. En conjunto, se observó una mayor expresión de genes que codifican las proteínas de transducción de señal después del tratamiento con estradiol en monos sometidos a OVX (Tabla 46).

15 Tabla 46

GEP comparativo para inductores de transducción de señal en el útero después de tratamiento con estradiol, Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No. de veces que cambia OVX					
	OVX (promedio)	SD	Simulación	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno
Receptor de Progesterona LIM y dominios 1 tipo antígeno de células	101	54	3.0	9.7	4.5	1.9
senescentes	196	50	2.6	3.7	2.9	2.2
Familia del sitio de integración MMTV del tipo sin extremos,						
miembro 2B	34	19	1.8	2.6	1.9	1.4
Proteína 1 relacionada con rizados secretados	222	61	2.0	7.1	2.2	1.6
Integrina, beta 5	68	49	1.7	1.7	1.5	1.5
Proteína 4 relacionada con rizados secretados	931	251	2.2	4.2	2.9	0.8

(continuación)

GEP comparativo para inductores de transducción de señal en el útero después de tratamiento con estradiol, Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados

		Relativo al No. de veces que cambia OVX					
		OVX (promedio)	SD	Simulación	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno
5	Proteína de transferencia de fosfolípidos	716	383	1.6	2.0	1.4	1.2
	Cadherina 11, tipo 2, cadherina OB (osteoblastos)	486	104	1.6	3.4	3.2	1.3
	Familia del sitio de integración MMTV del tipo sin extremos, Miembro 16	58	61	1.1	1.1	1.1	0.9
	fosfatasa y homólogo de tensina (mutados en Múltiples cánceres avanzados 1)	173	50	1.6	1.8	1.6	1.1
	Proteína tirosina quinasa 9	84	6	1.6	2.1	1.7	1.2
	Cuatro y un medio LIM dominio 2	175	68	1.5	3.0	1.7	0.9
	activador asociado Dishevelled de morfogénesis 1	351	39	1.6	3.1	1.2	0.9
	canal de calcio, dependiente de voltage, subunidad beta 2	158	36	0.5	0.6	0.5	0.8
	Catenina (proteína asociada a cadherina), Tipo alfa 1	158	62	0.5	0.5	0.7	0.8
	Receptor adaptador LDL proteína	81	25	0.7	0.6	1.2	1.0

(continuación)

GEP comparativo para inductores de transducción de señal en el útero después de tratamiento con estradiol, Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados

		Relativo al No. de veces que cambia OVX					
		<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
5	Receptor insulina	520	90	0.6	0.8	0.7	0.9
	Activado por mitógeno						
	Proteína quinasa quinasa						
	quinasa 4	670	146	0.6	0.6	0.6	0.8
Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados							
		Relativo al No. de veces que cambia el control de Simulación					
		<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
	Receptor de Progesterona LIM y dominios 1 tipo antígeno de células	308	258	0.3	3.2	1.5	0.6
	senescentes	508	269	0.4	1.4	1.1	0.8
	Familia del sitio de integración MMTV del tipo sin extremos,						
	miembro 2B	59	11	0.6	1.5	1.1	0.8
	Proteína 1 relacionada con rizados secretados	441	78	0.5	3.6	1.1	0.8
	Integrina, beta 5	117	45	0.6	1.0	0.9	0.9
	Proteína 4 relacionada con rizados secretados	2018	995	0.5	1.9	1.4	0.4
	Proteína de transferencia de fosfolípidos	1140	473	0.6	1.3	0.9	0.7
	Cadherina 11, tipo 2, cadherina OB						
	(osteoblastos)	795	204	0.6	2.1	1.9	0.8
	Familia del sitio de integración MMTV del tipo sin extremos,						

(continuación)

Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados						
Miembro 16	67	18	0.9	0.9	1.0	0.8
fosfatasa y homólogo de tensina (mutados en						
Múltiples cánceres avanzados 1)	269	30	0.6	1.2	1.0	0.7
Proteína tirosina quinasa 9	133	14	0.6	1.3	1.1	0.8
Cuatro y un medio LIM	268	90	0.7	1.9	1.1	0.6
dominio 2						
activador asociado Dishevelled de						
morfogénesis 1	550	136	0.6	2.0	0.8	0.6
canal de calcio, dependiente de voltage, subunidad						
beta 2	82	24	1.9	1.1	0.9	1.5
Catenina (proteína asociada a cadherina),						
Tipo alfa 1	81	15	1.9	1.0	1.5	1.5
Receptor adaptador LDL	58	36	1.4	0.8	1.6	1.4
proteína						
Receptor insulina	333	66	1.6	1.2	1.2	1.4
Activado por mitógeno						
Proteína quinasa quinasa						
quinasa 4	431	53	1.6	0.9	1.0	1.2

OVX, ovariectomizado; EE, etinil estradiol

Datos obtenidos a partir de 4 animales/grupo (1 ADN chip/animal).

- 5 El receptor de progesterona, la proteína 1 secretada relacionada con *Frizzled*, la proteína 4 secretada relacionada con *Frizzled*, el activador asociado con *Dishevelled* de morfogénesis 1, el sitio de integración MMTV del tipo son alas (familia, miembro 2B; *wnt2B*), y la integrina (beta 5) se incrementaron 9,8, 7,1, 4,2, 3,1, y 2,6, y 1,7 veces, respectivamente, comparado con los controles sometidos a OVX no tratados. Estos mismos genes fueron sobreexpresados en 1,2 a 4,5 veces después de la terapia con tamoxifeno. Por el contrario, la terapia con raloxifeno estaba asociada con cambios más modestos en expresión génica para estas mismas proteínas de transducción de
- 10



señal (0,9 a 19 veces). El resto de genes examinados redujeron todos la expresión por el estradiol, el tamoxifeno (excepto para la proteína adaptadora del receptor de LDL receptor), y el raloxifeno.

Factores de crecimiento. El estradiol incrementó la expresión de diferentes genes que codifican los factores de crecimiento (GF) como se indica en la Tabla 47.

5

Tabla 47

GEP comparativo para genes del ciclo celular en el útero después de tratamiento con estradiol, tamoxifeno, y raloxifeno en monos sometidos a ovariectomía

	Relativo al No de veces que cambia OVX					
	OVX (promedio)	SD	Simulación	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno
Subunidad 2reguladora de proteína quinasa CDC28	58	15	1,7	3,8	3,1	0,8
Transición de fase S a G1	227	45	1,2	1,6	1,6	0,9
Transcrito del gen mejorado de testículo (inhibidor 1 Bax)	1516	492	1,0	1,8	1,5	1,14
Familia de histona H2A, miembro Y	482	94	1,2	1,4	1,7	1,0
Histona H3 familia 3A	9692	447	1,1	1,4	1,4	1,0
Histona H3 familia 3A	9495	1003	1,0	1,5	1,4	0,9
Variante Histona H2A.F/Z	890	89	1,0	1,4	1,5	1,0
Ciclina D1 (PRAD1: adenomatosis paratiroidea 1)	54	17	0,9	2,4	1,8	1,2
Inhibidor de quinasa 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	224	69	0,9	0,5	0,7	0,9
Inhibidor de quinasa 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	762	194	0,9	0,5	0,5	1,1
Inhibidor de quinasa 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	527	142	0,9	0,4	0,5	1,2

(continuación)

GEP comparativo para genes del ciclo celular en el útero después de tratamiento con estradiol, tamoxifeno, y raloxifeno en monos sometidos a ovariectomía

	Relativo al No de veces que cambia el control de Simulación					
	Control de simulación (promedio)	SD	OVX	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno
Subunidad 2 reguladora de proteína quinasa CDC28	96	66	0.6	2.3	1.9	0.5
Transición de fase S a G1	277	87	0.8	1.3	1.3	0.7
Transcrito del gen mejorado de testículo (inhibidor 1 Bax)	1579	341	1.0	1.8	1.5	1.1
Familia de histona H2A, miembro Y	598	96	0.8	1.2	1.4	0.8
Histona H3 familia 3A	10239	888	0.9	1.4	1.3	1.0
Histona H3 familia 3A	9408	555	1.0	1.5	1.4	0.9
Variante de la Histona H2A.F/Z	925	67	1.0	1.4	1.4	1.0
Ciclina D1 (PRAD1: adenomatosis paratiroidea 1)	49	22	1.1	2.7	2.0	1.3
Inhibidor de quinasa 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	201	57	1.1	0.6	0.8	1.0
Inhibidor de quinasa 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	660	213	1.2	0.5	0.6	1.3
Inhibidor de quinasa 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	459	119	1.1	0.5	0.6	1.4

OVX, ovariectomía; EE, etinil estradiol

Dato obtenidos de 4 animales/grupo (1 ADN chip/animal).

5

Los efectos más prominentes fueron observados para la proteína 2 de enlazamiento del GF tipo insulina (36 kDa) (se incrementó 7,1 veces), y GF 1 tipo insulina (somatomedina C) (se incrementó 5,3 a 6,9 veces), comparado con los controles sometidos a OVX. Los genes que codifican estos factores de crecimiento se sobreexpresaron también en 2,7 y 3,7 hasta 4,8 veces después de la terapia con tamoxifeno. El raloxifeno provocó incrementos menores de aproximadamente 2 veces, similar al grupo de simulación.

10

- 5 El estradiol también sobreexpresó a la proteína 5 de enlazamiento del factor de crecimiento tipo insulina, a la proteína 1 de enlazamiento del factor de crecimiento beta de transformación latente, y al inductor angiogénico 61 rico en cisteína en 5,2, 3,6, y 3,5 veces, respectivamente, comparado con los controles sometidos a OVX. Por el contrario, el tamoxifeno y el raloxifeno fueron asociados con cambios únicamente modestos en los genes que codifican estos factores de crecimiento, en forma similar a los niveles observados en el grupo de simulación (Tabla 46).
- 10 Matriz extracelular. Una cantidad de diversas proteínas de la matriz extracelular fueron sobreexpresadas por el estradiol como se indica en la Tabla 47. El colágeno tipo I alfa 2, el colágeno tipo III alfa 1, el colágeno tipo I alfa 1, y el colágeno tipo IV alfa 1 fueron sobreexpresados por el tratamiento con estradiol 13,2, 6,8, 6,6, y 4,3 veces, respectivamente, comparado con los controles sometidos a OVX. La terapia con tamoxifeno también sobreexpresa a los genes que codifican estas proteínas de la matriz en 6,1, 3,4, 3,5, y 3,2 veces, respectivamente. Para la mayor parte del resto de los genes en esta categoría, después de tratamiento con tamoxifeno o raloxifeno, la expresión total se redujo a niveles no muy diferentes a la de los controles con simulación.
- 15 Transporte, redox, y ciclo celular. El estradiol incrementó la expresión de una variedad de genes de transporte (familia 2 del transportador de soluto [facilitó el transporte glucosa/fructosa]; miembro 5; ATPasa; transporte de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, polipéptido beta 3; familia 2 transportadora de soluto [facilita el transporte de glucosa/fructosa], miembro 5; familia 25 transportadora de soluto [transportador mitocondrial; translocalizador del nucleótido adenina], miembro 5; ATPasa, transportador de H<sup>+</sup>, lisosomal de 38 kDa, V0 subunidad d isoforma 1; ATP sintasa, transporte de H<sup>+</sup>, complejo mitocondrial F0, subunidad c [subunidad 9] isoforma 3; familia 22 transportadora de soluto [transportador de cationes orgánicos], ATP sintasa tipo miembro 1, transporte de H<sup>+</sup>, complejo mitocondrial F0, subunidad c [subunidad 9] isoforma 3; canal intracelular 4 de cloruro) de 2 a 7 veces; genes que codifican proteínas redox (dominio SET bifurcado 1, peroxiredoxina 1, y subunidades VIa y VIIa de citocromo c oxidasa) aproximadamente de 2 a 3 veces; y genes que codifican las proteínas del ciclo celular (subunidad 2 reguladora de la proteína quinasa CDC28) hasta 4 veces en animales tratados con estradiol comparado con los controles sometidos a OVX. El tratamiento con estradiol disminuyó la expresión del gen para la proteína redox, proteína que interactúa con tioredoxina, 3 veces y el gen para la proteína del ciclo celular, inhibidor 1C de quinasa que depende de ciclina (p57, Kip2), en 2 a 4 veces comparado con el control sometido a OVX. Aunque ligeramente menos potente, el tamoxifeno ejerció efectos similares mientras que el raloxifeno tuvo poco o ningún efecto sobre cualquiera de los genes para el transportador, redox y el ciclo celular estudiados.
- 20
- 25
- 30 Genes inducidos por estrógeno. Diferentes genes inducidos por estrógeno (creatina quinasa cerebral; dineína citoplasmática; hipocalcina tipo 1; polipéptido 1 liviano; prostaglandina D2 sintasa de cerebral de 21 kDa; hexoquinasa 1; y cadherina 11 de osteoblasto, tipo 2) fueron sobreexpresados por el estradiol de 3 a 10 veces comparado con el control sometido a OVX. Sin embargo, la significancia de estos cambios para la fisiología y patología uterina no ha sido aún definida.
- 35 Clasificación de la actividad de los fármacos de acuerdo con el GEP uterino. Para determinar la potencia estrogénica relativa y el puntaje para un tratamiento estrogénico dado, se construyó un eje de potencia asignando un puntaje promedio al GEP de "0" para los controles sometidos a OVX (sin estrógeno) y un puntaje promedio para GEP de "100" para los animales tratados con estradiol (efecto máximo con estradiol). Los puntajes respectivos del GEP para tamoxifeno y raloxifeno fueron graficados para determinar sus potencias estrogénicas relativas.
- 40 La aplicación de diferentes parámetros de filtración de intensidad génica >50, el cambio estadísticamente diferente de los controles sometidos a OVX, y los genes que muestran cambios >1,5 veces a partir de los valores del control sometido a OVX permitieron la clasificación de las potencias relativas de tratamiento de acuerdo con criterios definidos del perfil de expresión génica (GEP). Estos enfoques produjeron más información útil que el análisis de datos no supervisado del GEP.
- 45 De las 22.283 sondas ensayadas por chip, 225 genes individuales mostraron cambios estadísticamente significativos superior a 1,5 veces en el nivel de expresión comparado con los controles sometidos a OVX. Considerando únicamente este grupo de genes, el tamoxifeno mostró una respuesta estrogénica fuerte con un puntaje de 59 y el raloxifeno tuvo un puntaje estrogénico débil de 23. Por el contrario, los animales de la simulación exhibieron una línea base de puntaje estrogénico de 48.
- 50 Cuando se considera solamente el número de veces que cambia y sin tener en cuenta el significado estadístico, 673 genes mostraron cambios mayores a 1,5 veces en el nivel de expresión comparado con los controles sometidos a OVX. El tamoxifeno exhibió un fuerte efecto con estradiol, con un puntaje de 71, el raloxifeno aún tuvo un puntaje estrogénico débil de 34, y una línea base para animales con simulación fue de 66.
- 55 Se hizo un subanálisis adicional utilizando 123 genes que mostraron cambios estadísticamente significativos mayores a 1,5 veces en expresión y se piensa que juegan un papel en la función uterina. De acuerdo con este análisis, el tamoxifeno retuvo un alto puntaje estrogénico de 69, el raloxifeno aún tuvo un puntaje estrogénico débil

de 20, y la línea base de las simulaciones fue de 44. Utilizando este enfoque, los subanálisis adicionales de grupos génicos específicos mostraron que los efectos estrogénicos del tamoxifeno (puntajes de 61 a 87) fueron consistentemente mayores que aquellos del raloxifeno (puntales de -11 a 32) en cada categoría.

Tabla 48

5 GEP comparativo para proteínas de transporte en el útero después de tratamiento con estradiol, tamoxifeno y raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No de veces que cambia para OVX					
	<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Familia transportadora de soluto 2						
(facilita transporte glucosa/fructosa),	171	101	1.9	4.4	2.2	1.2
Miembro 5						
ATPasa, transportando Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , polipéptido						
beta 3	1147	1058	1.8	2.2	2.1	0.9
Familia transportadora de soluto 2						
(facilita transporte glucosa/fructosa),	176	103	1.7	3.5	2.1	1.0
transportador), miembro 5						
familia transportadora de soluto 25 (transportado mitocondrial; traslocador del nucleótido						
adenina,						
miembro 5	923	463	1.5	2.5	2.2	1.1
ATPasa, transportando H <sup>+</sup> , lisosomal						
38kda,						
V0 subunidad d isoforma 1	465	50	1.2	1.9	1.2	1.1

(continuación)

GEP comparativo para proteínas de transporte en el útero después de tratamiento con estradiol, tamoxifeno y raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No de veces que cambia para OVX					
	<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
ATP sintasa, transportando						
H <sup>+</sup> , complejo						
mitocondrial F <sub>0</sub> ,						
subunidad c						
(subunidad 9) isoforma 3	811	121	1.3	2.0	2.0	1.2
Familia transportadora de soluto						
22						
(transportador de						
Cación orgánico),	92	49	1.2	1.9	1.8	1.0
miembro 1-						
tipo ATP sintasa,						
transportando						
H <sup>+</sup> , complejo						
mitocondrial F <sub>0</sub> ,						
subunidad c						
(subunidad 9) isoforma 3	1007	188	1.3	2.0	1.9	1.2
canal 4 intracelular						
de cloruros	287	185	1.8	1.7	1.9	1.4

(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación

	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Familia transportadora de soluto 2 (facilita transporte glucosa/fructosa),	317	105	0.5	2.4	1.2	0.7
Miembro 5 ATPasa, transportando Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , polipéptido beta 3	2028	2519	0.6	1.2	1.2	0.5
Familia transportadora de soluto 2 (facilita transporte glucosa/fructosa), transportador), miembro 5	291	134	0.6	2.1	1.3	0.6
familia transportadora de soluto 25 (transportado mitocondrial; traslocador del nucleótido adenina, miembro 5	1351	518	0.7	1.7	1.5	0.8
ATPasa, transportando H <sup>+</sup> , lisosomal 38kda, V0 subunidad d isoforma 1	545	80	0.9	1.6	1.0	1.0

(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación

	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
ATP sintasa, transportando H+, complejo mitocondrial F0, subunidad c (subunidad 9) isoforma 3	1045	276	0.8	1.6	1.6	0.9
Familia transportadora de soluto 22 (transportador de Cación orgánico), miembro 1- tipo ATP sintasa, transportando H+, complejo mitocondrial F0, subunidad c (subunidad 9) isoforma 3	112	41	0.8	1.6	1.5	0.8
canal 4 intracelular de cloruros	1355	184	0.7	1.5	1.4	0.9
OVX, ovariectomizado; EE, etinil estradiol	522	50	0.6	0.9	1.1	0.7
Datos obtenidos a partir de 4 animales/grupo (1 ADN chip/animal).						

Tabla 49

GEP comparativo para proteína redox en el útero después de tratamiento con estradiol, tamoxifeno, y raloxifeno  
en monos ovariectomizados

		Relativo al No de veces que cambia para OVX				
<i>OVX (promedio)</i>						
		<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Dominio	928	171	1.3	3.0	1.9	1.1
SET , bifurcado 1						
Peroxiirredoxina 1	2,575	923	1.2	1.9	1.7	1.0
Citocromo c oxidasa subunidad vía						
polipéptido 1 Citocromo c oxidasa subunidad vía	912	199	1.1	1.5	1.3	1.0
polipéptido 2 (hígado) Ubiquinol- citocromo c reductasa,	266	18	1.0	1.8	1.6	1.1
Sulfuro de hierro Rieske polipéptido 1	708	54	1.2	1.4	1.4	1.0
Proteína que Interactúa con tiorredoxina	5,300	644	0.6	0.3	0.6	1.0



(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación						
	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Dominio	1209	238	0.8	2.3	1.4	0.8
SET , bifurcado 1						
Peroxiredoxina 1	3041	787	0.8	1.6	1.4	0.8
Citocromo c oxidasa subunidad vía						
polipéptido 1 Citocromo c oxidasa subunidad vía	1043	240	0.9	1.3	1.2	0.8
polipéptido 2 (hígado) Ubiquinol- citocromo c reductasa,	255	94	1.0	1.8	1.7	1.1
Sulfuro de hierro Rieske polipéptido 1	881	80	0.8	1.1	1.1	0.8
Proteína que Interactúa con tiorredoxina	3327	778	1.6	0.5	0.9	1.7
OVX, ovariectomía; EE, etinil estradiol						
Dato obtenidos de 4 animales/grupo (1 ADN chip/animal).						

Tabla 50

GEP comparativo para factores de matriz extracelular en el útero después de tratamiento con Estradiol, Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No de veces que cambia para OVX					
	<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Metaloproteinasa de matriz	11	5	5.1	6.3	1.6	0.9
19						
Biglicano	23	28	2.7	1.9	2.0	2.4
Fibronectina 1	39	26	2.5	1.6	2.3	2.3
Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome Ehlers-Danlos						
tipo IV,	1084	471	2.8	6.8	3.4	1.9
autosomal dominante)						
Colágeno, tipo I, alfa 2	2757	929	2.8	5.1	3.7	2.2
Colágeno, tipo I, alfa 1	3056	697	2.8	6.6	3.5	1.8
Colágeno, tipo IV, alfa 1	182	87	2.4	4.3	3.2	1.8
Proteoglicano 2 de sulfato de heparán	17	12	2.2	3.5	2.2	1.2
(perlecano)						
Procolágeno C-	215	97	2.1	3.2	2.3	1.7
Reforzador de endopeptidasa						
Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos						
tipo IV,	3445	859	2.1	4.1	2.9	2.0
autosomal dominante)						
Colágeno, tipo V, alfa 1	189	82	2.1	4.0	1.3	1.2
Proteína secretada, ácida, Rica en cisteína						
(osteonectina)	561	172	2.1	2.9	2.2	1.7

(continuación)

GEP comparativo para factores de matriz extracelular en el útero después de tratamiento con Estradiol,  
Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No de veces que cambia para OVX					
	<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
5 Fibronectina 1	419	99	2.2	2.4	2.0	2.2
Fibrilina I (síndrome de Marfan)	124	57	1.9	2.2	1.9	2.1
Serina (o cisteína)						
Inhibidor de proteinasa, clado H (proteína de choque térmico 47), miembro 1, (proteína 1 que enlaza colágeno)	501	15	2.0	3.3	2.2	1.4
Osteoglicina (factor osteoinductivo, mimecano)	54	13	2.2	2.2	1.7	1.6
Fibulina 1	583	413	1.8	1.6	1.9	1.4
Fibronectina 1	648	126	2.0	1.9	1.9	1.7
Colágeno, tipo VIII, alfa 2	39	19	1.7	2.1	1.8	1.9
Fibronectina 1	586	121	1.9	2.1	1.9	2.2
Colágeno, tipo VI, alfa 3	3428	408	1.8	3.7	2.0	1.2
Colágeno, tipo IV, alfa 2	929	335	1.7	3.3	2.2	1.4

(continuación)

GEP comparativo para factores de matriz extracelular en el útero después de tratamiento con Estradiol, Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No de veces que cambia para OVX					
	OVX (promedio)	SD	Simulación	EE	Tamoxifeno	Raloxifeno
5 Fibrilina 1 (síndrome de Marfan)	874	453	1.6	3.5	2.1	1.5
Colágeno, tipo IV, alfa 1	690	203	1.7	3.7	2.7	1.2
Fibronectina 1	757	89	1.7	1.8	1.6	1.9
SPARC tipo 1 (mast9, hevin)	4971	1787	1.6	2.4	1.3	1.7
Nidógeno (enactina)	24	16	1.4	1.4	1.4	1.1
Laminina, beta 1	215	102	1.4	1.4	1.4	1.1
- Procolágeno-prolina, 2-oxoglutarato 4-dioxigenasa(prolina 4-hidroxilasa), alfa polpéptido II sulfato de condroitina proteoglicano 2 (versicano)	120	49	1.5	2.6	1.6	1.2
Tenascina C (hexabraquiona)	74	36	1.3	1.2	3.8	1.0
Colágeno, tipo I, alfa 2 quitinasa 3 tipo 1 (glicoproteína de cartílago 39)	154	34	3.2	13.2	6.1	3.2
Dermatopontina	100	25	1.4	3.9	1.7	1.1
	132	92	1.8	1.9	1.8	1.5

(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación						
	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Metaloproteinasa de matriz	59	27	0.2	1.2	0.3	0.2
19						
Biglicano	61	11	0.4	0.7	0.7	0.9
Fibronectina 1	100	31	0.4	0.6	0.9	0.9
Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, autosomal dominante)	2992	860	0.4	2.5	1.2	0.7
Colágeno, tipo I, alfa 2	7758	3072	0.4	1.8	1.3	0.8
Colágeno, tipo I, alfa 1	8502	5403	0.4	2.4	1.3	0.7
Colágeno, tipo IV, alfa 1	436	183	0.4	1.8	1.3	0.7
Proteoglicano 2 de sulfato de heparán (perlecano)	38	14	0.5	1.6	1.0	0.6
Procolágeno C- Reforzador de endopeptidasa Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, autosomal dominante)	449	97	0.5	1.5	1.1	0.8
Colágeno, tipo V, alfa 1	394	137	0.5	1.9	0.6	0.6
Proteína secretada, ácida, Rica en cisteína (osteonectina)	1187	361	0.5	1.4	1.0	0.8
Fibronectina 1	920	427	0.5	1.1	0.9	1.0

(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación						
	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Fibrilina I (síndrome de Marfan)	236	71	0.5	1.2	1.0	1.1
Serina (o cisteína)						
Inhibidor de proteinasa, clado H (proteína de choque térmico 47), miembro 1, (proteína 1 que enlaza colágeno)	1011	306	0.5	1.6	1.1	0.7
Osteoglicina (factor osteoinductivo, mimecano)	120	76	0.4	1.0	0.8	0.7
Fibulina 1	1026	469	0.6	0.9	1.1	0.8
Fibronectina 1	1288	483	0.5	0.9	0.9	0.9
Colágeno, tipo VIII, alfa 2	68	18	0.6	1.2	1.1	1.1
Fibronectina 1	1089	456	0.5	1.2	1.0	1.2
Colágeno, tipo VI, alfa 3	6008	1342	0.6	2.1	1.1	0.7
Colágeno, tipo IV, alfa 2	1594	548	0.6	1.9	1.3	0.8
Fibrilina 1 (síndrome de Marfan)	1388	424	0.6	2.2	1.3	1.0
Colágeno, tipo IV, alfa 1	1143	276	0.6	2.2	1.6	0.7

(continuación)

GEP comparativo para factores de matriz extracelular en el útero después de tratamiento con Estradiol, Tamoxifeno, y Raloxifeno en monos ovariectomizados						
Fibronectina 1	1301	425	0.6	1.1	0.9	1.1
SPARC tipo 1 (mast9, hevin)	8078	2034	0.6	1.5	0.8	1.1
Nidógeno (enactina)	34	15	0.7	2.6	1.4	1.7
Laminina, beta 1	302	48	0.7	1.0	1.0	0.8
- Procolágeno-prolina, 2- oxoglutarato 4- dioxigenasa(prolina 4- hidroxilasa), alfa polipéptido II sulfato de condroitina proteoglicano 2 (versicano)	184	92	0.7	1.7	1.0	0.8
Tenascina C (hexabraquiona)	96	34	0.8	0.9	2.9	0.8
Colágeno, tipo I, alfa 2 quitinasa 3 tipo 1 (glicoproteína de cartílago 39)	493	255	0.3	4.1	1.9	1.0
Dermatopontina	141	59	0.7	2.8	1.2	0.8
	233	43	0.6	1.1	1.0	0.8

OVX, ovariectomía; EE, etinil estradiol

Dato obtenidos de 4 animales/grupo (1 ADN chip/animal).

Tabla 51

GP comparativo para factores de crecimiento en los úteros seguidos del tratamiento con estradiol, tamoxifeno, y raloxifeno en monos ovariectomizados

	Relativo al No de veces que cambia para OVX					
	<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Proteína morfogenética ósea 1	93	24	2.2	2.9	2.2	1.4
Proteína morfogenética ósea 1	79	24	1.8	2.6	1.9	1.2
Rica en cisteína, Inductor angiogénico, 61	172	80	1.8	3.5	1.6	1.7
Factor de crecimiento de fibroblasto 2 (básico)	34	22	2.0	2.1	2.0	2.0
Proteína asociada a crecimiento 43	37	8	2.4	2.0	1.9	1.7
Receptor de insulina	520	90	0.6	0.8	0.7	0.9
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	156	48	2.7	6.9	4.6	2.2
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	102	40	2.2	5.3	3.7	1.5
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	310	79	1.9	6.3	4.8	2.3
Proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 2 36kda	596	77	1.6	7.1	2.7	1.1



(continuación)

GP comparativo para factores de crecimiento en los úteros seguidos del tratamiento con estradiol, tamoxifeno, y raloxifeno en monos ovariectomizados

		Relativo al No de veces que cambia para OVX					
		<i>OVX (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>Simulación</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
5	Proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 5	299	56	1.9	5.2	2.0	2.0
	proteína que enlaza al factor beta de crecimiento de transformación latente 1	181	80	2.1	3.6	2.6	1.8
	Proteína que interactúa con el tumor de pituitaria 1	59	25	2.1	1.8	1.9	1.5
	factor de crecimiento de células madre; Linfocitos secretados tipo lectina C	92	12	1.6	2.2	1.4	1.2
	Factor de crecimiento de transformación beta inducido, 68kda	376	97	2.2	1.7	2.2	1.7
	Intercrina-alfa, secuencia mrna	859	76	1.6	1.5	1.5	1.3
Número de veces que cambia con respecto el control de simulación							
		<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
	Proteína morfogenética ósea 1	205	57	0.5	1.3	1.0	0.6

(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación						
	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Proteína morfogenética ósea 1	143	44	0.5	1.4	1.0	0.7
Rica en cisteína, Inductor angiogénico, 61	303	200	0.6	2.0	0.9	0.9
Factor de crecimiento de fibroblasto 2 (básico)	67	40	0.5	1.1	1.0	1.0
Proteína asociada a crecimiento 43	88	27	0.4	0.8	0.8	0.7
Receptor de insulina	333	66	1.6	1.2	1.2	1.4
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	417	68	0.4	2.6	1.7	0.8
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	226	69	0.5	2.4	1.7	0.7
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	581	185	0.5	3.4	2.6	1.2
Proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 2 36kda	957	104	0.6	4.4	1.7	0.7
Proteína que enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 5	562	260	0.5	2.8	1.0	1.1
proteína que enlaza al factor beta de crecimiento de transformación						

(continuación)

Número de veces que cambia con respecto el control de simulación						
	<i>Control de simulación (promedio)</i>	<i>SD</i>	<i>OVX</i>	<i>EE</i>	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
latente 1	389	322	0.5	1.7	1.2	0.8
Proteína que interactúa con el tumor de pituitaria 1	126	17	0.5	0.9	0.9	0.7
factor de crecimiento de células madre;						
Linfocitos secretados tipo lectina C	148	36	0.6	1.4	0.9	0.7
Factor de crecimiento de transformación beta inducido, 68kda	843	212	0.4	0.8	1.0	0.8
Intercrina-alfa, secuencia mrna	1383	258	0.6	0.9	0.9	0.8

OVX, ovariectomía; EE, etinil estradiol

Dato obtenidos de 4 animales/grupo (1 ADN chip/animal).

- 5 Discusión. Estudios previos han establecido que el modelo de mono cinomólogo sometido a OVX de deficiencia de estrógeno es relevante para humanos con respecto a los efectos hormonales sobre el útero. Cline J M et al., Toxicol Pathol.29: 84 - 90 (2001). Los datos de estos estudios mostraron una mayor hiperplasia endometrial después del tratamiento con estradiol o tamoxifeno, y fueron confirmados en el presente Ejemplo. Además, mostramos que en este modelo, el estradiol reversó los efectos de OVX sobre la sobreexpresión del gen de la gonadotropina en la
- 10 pituitaria (Tabla 45), suministrando una evidencia adicional de que el mono sometido a OVX representa un modelo válido para evaluar el perfil de expresión génica (GEP) del estradiol y los SERM.

- Todos los datos de expresión génica reportados en el presente Ejemplo se correlacionan con los efectos histopatológicos del estradiol y los SERM en el útero. Los estudios experimentales y clínicos han demostrado los efectos proliferativos inequívocos del estrógeno y el tamoxifeno sobre el útero y las células tumorales uterinas.
- 15 Gottardis M M et al., Cancer Res. 48: 812 - 815 (1988). El tamoxifeno indujo un perfil de expresión génica como el del estrógeno en el útero de monos sometidos a OVX que era consistente con hiperplasia cística uterina, fibrosis estromal, y una mayor expresión del receptor de progesterona observada en macacos sometidos a ovariectomía. Cline J M et al., Toxicol Pathol.29: 84 - 90 (2001). Los cambios menores en los GEP uterinos de monos sometidos a OVX después de terapia con raloxifeno estaban de acuerdo con los estudios que muestran su carencia de efectos
- 20 patológicos sobre el útero humano. Cohen F J et al., Obstet Gynecol.95: 104 - 110 (2000).

En el útero, los efectos proliferativos del tamoxifeno son mediados en parte por los GF. La mayor expresión de IGF-1 y de las proteínas de enlazamiento relacionadas después de la terapia con estrógeno está bien documentada y puede ser importante para estimulación paracrina local del crecimiento de tejido uterino. Norstedt G et al., *Acta Endocrinologica (Copenh)*.120:466 - 472 (1989); Stygar D et al., *Reproductive Biology and Endocrinology*.1:40 (2003). La inducción del inductor angiogénico "61" rico en cisteína y la transformación de genes del factor de crecimiento beta también ha sido descrita en respuesta al estrógeno, y ambos factores de crecimiento parecen mediar el crecimiento endometrial y la hiperplasia. Sampath D et al., *Endocrinology*. 142:2540 - 2548 (2001); Takahashi T et al., *Cell Growth Differ*. 5:919 - 935 (1994); Sartor B M et al., *Reprod Toxicol*.9:225 - 231 (1995). Estas observaciones apoyan los datos del presente Ejemplo en el cual es estradiol incrementó la expresión de estos factores de crecimiento en el útero (Tabla 46).

Estudios recientes utilizando perfil de expresión génica en endometrio humano han identificado un arreglo de genes y de familias de genes asociadas con el proceso de implantación, que involucra una interacción compleja entre el embrión y el endometrio materno. Las proteínas wnt secretadas localmente indican una ruta de señalización celular que involucra la activación de receptores de *Frizzled* asociados a la membrana (FzR), que a su vez activan *Dishevelled* (Dvl) y la regulación de la transcripción génica nuclear requerida para implantación. Las proteínas relacionadas con *Frizzled* (FRP) modulan la señalización de wnt en el sitio de enlazamiento del ligando de wnt-FzR, y FRP4 secretada (también conocida como FrpHE) inhibió la señalización de wnt. Aunque los genes para wnt son controlados por esteroides sexuales, incluido estrógeno, la relevancia de estos hallazgos con el crecimiento uterino inducido por estrógeno no es conocida. Tulac S et al., *J Clin Endocrinol Metab*. 88:3860 - 3866 (2003). De acuerdo con estudios en líneas de células cancerosas, la señalización de wnt2B parece jugar un papel en la tumorigénesis. Kato M, *Int J Mol Med*. 8:657 - 660 (2001); Ricken A et al., *Endocrinology*. 143:2741 - 2749 (2002). Además, la mayor expresión FRP1 y FRP4 secretada fue observada en leiomiomas uterinos humanos, el útero de ratas sometidas a OVX a las que se les administró estradiol, y endometrio proliferativo humano. Fujita M et al., *J Mol Endocrinol*. 28:213 - 223 (2002); Fukuhara K et al., *J Clin Endocrinol Metab*. 87:1729 - 1736 (2002). Aunque FRP4 estromal, que es sobre expresaba por estrógeno, estaba involucrada en proliferación endometrial, FRP1 secretada estaba asociada con efectos antiapoptóticos y antitumorales. Estos estudios son relevantes para los datos reportados en el presente Ejemplo, que demostró que se incrementó la expresión uterina de los genes que codifican wnt2B, Dvl, y FRP1 y FRP4 secretadas después de terapia con estradiol (Tabla 46). Los datos sugieren que los efectos estrogénicos sobre el útero pueden involucrar la ruta de señalización de wnt y su regulación por medio de FRP4 secretada. Tulac S et al., *J Clin Endocrinol Metab*. 88:3860 - 3866 (2003).

El tratamiento a largo plazo con estrógenos conjugados de equino sobreexpresa a los receptores de progesterona en el tejido estromal endometrial de macacos cinomólogos sometidos a OVX. Wang H et al., *Reprod Biol Endocrinol*. 1:7 (2003). El estradiol incrementó la expresión génica del receptor de progesterona el presente Ejemplo (Tabla 46), valida adicionalmente el modelo del mono sometido a OVX para el perfil de expresión génica.

El estradiol también incrementó la expresión uterina de otras clases funcionales de genes, incluidas las proteínas de la matriz extracelular (Tabla 47) y los genes generalmente asociados con proliferación celular (por ejemplo, ciclo celular, redox, y transporte; Tabla 48). Estos efectos están probablemente relacionados con hiperplasia uterina inducida por estrógeno, que se caracteriza por una mayor proliferación celular y de crecimiento de tejido. Cline J M et al., *Toxicol Pathol*. 29:84 - 90 (2001).

El análisis de los perfiles del perfil de expresión génica (GEP) asociados con estradiol y con los SERM reveló importantes diferencias en los mecanismos moleculares a través de los cuales estos agentes afectan al útero. Por lo tanto, el perfil de expresión génica del tamoxifeno sugiere que este actúa principalmente a través de estimulación estrogénica de factores de crecimiento, mecanismos de transducción de señal, síntesis de proteína de la matriz extracelular, y genes relacionados con proliferación celular en el útero. Por el contrario, el raloxifeno exhibió actividad estrogénica débil con poco o ningún efecto sobre estas rutas moleculares como se indica por medio de su perfil de expresión génica.

Análisis adicionales de los datos del perfil de expresión génica (GEP) involucraron el desarrollo de un nuevo sistema de puntuación para la clasificación de los efectos estrogénicos relativos del tamoxifeno y el raloxifeno. A través de cada una de las siete clases diferentes de genes expresados, el tamoxifeno fue clasificado como el agente más estrogénico, con puntajes en el rango de 69 a 87, comparado con 100 para el estradiol. El raloxifeno fue mucho menos estrogénico por estos criterios como se muestra por sus bajos puntajes en el rango de -11 a 32, comparado con 100 para el estradiol.

En conclusión, el perfil de expresión génica (GEP) que utiliza un microarreglo de ADN combinado con el nuevo método de clasificación de agentes terapéuticos descrito aquí es una técnica poderosa para definir y predecir las acciones farmacológicas y toxicológicas relativas de nuevas entidades químicas, y representa un nuevo paradigma para el desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica. Además, este procedimiento tiene un enorme potencial para identificar la eficacia y los biomarcadores de seguridad que pueden ser utilizados para refinar el proceso de

selección del fármaco, reduciendo el tiempo y los costos requeridos para llevar a un fármaco desde su descubrimiento hasta el campo clínico.

### EJEMPLO VIII

5 Introducción y resumen. El ánimo de este Ejemplo es evaluar adicionalmente el efecto de FGF23CTP sobre la angiogénesis como se muestra en el EJEMPLO III por medio del uso de un modelo de ratón de retinopatía vascular hipóxica.

10 Métodos. Se colocaron ratones C57/B16J de siete días de edad junto con sus padres para lactancia en un contenedor sellado ventilado por medio de una mezcla de oxígeno y aire comprimido hasta una concentración final de oxígeno del 75% ± 2% hasta el día 12. Una vez retornados al aire normal de la habitación, los animales desarrollaron una isquemia relativa de la retina con neovascularización que se inicia tan pronto como en el día 14.

El día 12, cuando los animales fueron retornados de la incubación con oxígeno, se inyecta un volumen de 2,0 µl en el ojo utilizando una pipeta de vidrio con un diámetro aproximadamente de 150 µm en su punta. Se inyecta el ojo derecho con 6 microgramos (µg) de FGF23CTP (3 µg / µl) y el ojo izquierdo del animal con PBS como control individual.

15 Para la inyección intravítrea de una sustancia el día 12, se anestesiaron los ratones por medio de la inhalación de isoflurano. Cinco días después se sacrificaron los animales después de perfusión con dextrano-fluoresceína y se preparan montajes retinales planos. Los montajes codificados completos permiten evaluar los cambios vasculares del embridamiento retinal. Los montajes de proliferación incluyen la cuantificación de la proliferación que incluye la papila, desarrollo vascular, vasoconstricción, sangrado retinal y tortuosidad de los vasos, características también observadas en enfermedad retinal humana.

20 Animales. En total, se utilizaron 44 animales para inyección con FGF23CTP y PBS. De estos, 8 animales murieron durante la hiperoxia o después de la inyección, 2 animales no son perfundidos, 5 animales son embebidos en parafina para evaluación de las neuronas, de los cuales únicamente tres pudieron ser examinados, y a partir de 29 de estos animales se prepararon montajes retinales planos.

25 Evaluación de los cambios angioproliferativos. La evaluación de los cambios angioproliferativos en las preparaciones retinales se lleva a cabo en una forma enmascarada sobre preparaciones codificadas. El sistema de puntuación de retinopatía es adaptado de Higgins, R. D., et al. (J. AAPOS 3: 114 - 116 (1999)) que fue desarrollado después de la modificación de un sistema de puntuación utilizado clínicamente en la unidad de cuidados intensivos de neonatales. Las siguientes características son tomadas en cuenta: neovascularización del disco óptico, formación de manojos de vasos sanguíneos, grandes agrupaciones de manojos de vasos sanguíneos, vasoconstricción central y tortuosidad de los vasos. No se tienen en cuenta las hemorragias retinales ya que ellas se generan también después de la inyección intraocular.

30 Para cada criterio, se asigna un número definido de puntos (P), que se resumen en el puntaje total de proliferación. Entre más alto sea el puntaje, peor la retinopatía inducida por hipoxia. En forma detallada:

35 Neovascularización del disco óptico: se asignan ya sea 1 ó 0 puntos en el caso de que se mida proliferación del disco óptico (1 P) o ausencia (0 P).

40 Formación de manojos de vasos sanguíneos: el puntaje para los manojos de vasos sanguíneos se determina dividiendo cada hora del reloj de la superficie de la preparación en 4 zonas: Zona 1 (zona del disco óptico) es evaluada adicionalmente; Zona 2: un punto para cada extremo (máximo 4 P); Zona 3: un punto para cada hora del reloj (máximo 12 P); y Zona 4: un punto por cada hora del reloj (máximo 12 P). Por lo tanto, se mide un máximo de 28 puntos siempre y cuando no existan áreas vasculares, y un se calcula un máximo de 12 puntos en el caso de una avascularización completa.

45 Grandes agrupaciones de manojos de vasos sanguíneos: cada gran agrupación de manojos de vasos sanguíneos que cubren más de 3 sectores es contada como un punto. Por lo tanto, se pueden medir máximo 8 puntos siempre y cuando no existan áreas avasculares, y pueden asignarse máximo 4 puntos para avascularización completa.

Vasoconstricción central: se asigna 1 punto a una vasoconstricción de zona 1 superior al 50%; se asigna 1 punto si la vasoconstricción es superior al 50% de cada extremo de la zona 2 y 3. Por lo tanto, se puede asignar máximo 1 punto a la zona 1, y máximo 4 puntos para cada una de las zonas 2, 3 y 4. Ya que hasta ahora no se ha observado vasoconstricción para la zona 4, se pueden asignar un máximo de 9 puntos totales (sin la zona 4).

Tortuosidad de los vasos: se asignan 2 puntos si menos de un tercio de los vasos son tortuosos; si la cantidad de vasos sanguíneos tortuosos está entre un tercio y dos tercios, se asignan 4 puntos, y en el caso de que más de dos tercios de los vasos sean tortuosos, entonces se asignan 6 puntos.

5 El máximo teórico de puntos nunca se alcanza, por ejemplo la Zona 4 nunca muestra zonas avasculares. Nunca se observa proliferación en zonas avasculares. Esto es, en principio, una exclusión mutua de criterios; la existencia de proliferaciones vasculares tiene un mayor impacto sobre el puntaje de retinopatía que grandes áreas avasculares. Por lo tanto, el máximo puntaje que puede ser obtenido con este sistema es de 38 puntos utilizando una sustancia que se considere que mejora la proliferación vascular.

10 El puntaje de proliferación que se relaciona con cambios vasculares sobre montajes retinales planos para animales individuales tratados con FGF23CTP (ojo derecho) y control PBS (ojo izquierdo) se miden como se describió más arriba. La severidad de la retinopatía varía de una animal a otro. La Tabla 52 resume el puntaje determinado para la proliferación.

Tabla 52 puntuación de proliferación

Animal No	Ojo derecho	Ojo izquierdo	Animal No.	Ojo derecho	Ojo izquierdo
	FGF23CTP	PBS		FGF23CTP	PBS
146.1	4	4	150.1	14	16
146.2	13	8	150.2	8	26
146.3	8	9	150.3	17	24
146.4	3	5	150.4	30	29
146.5	6	8	160.2	10	7
146.6	1	9	160.3	10	7
146.7	2	4	160.4	16	20
146.8	5	6	160.5	28	28
147.1	9	8	161.1	30	15
147.2	8	9	161.2	21	33
147.3	2	8	161.3	17	22
147.4	11	12			
147.5	1	11			
149.1	5	26			
149.2	14	36			
149.3	8	10			
149.4	17	12			
149.5	10	8			

15 Los puntajes de proliferación de todos los animales son mostrados adicionalmente como un diagrama de cajas en la Figura 2. La comparación del ojo tratado individualmente (ojo derecho, FGF23CTP) con el ojo de control (izquierdo, PBS), el efecto de la inyección de FGF23CTP alcanza significancia estadística en una prueba t pareada con  $p=0,04$  (Tabla 53).

Tabla 53 Prueba t pareada

Diferencia de medias	DF	Valor t	Valor p
-3,172	28	2,183	0,0375

Los puntajes de proliferación para los factores separados se presentan en la Tabla 54, y las respectivas pruebas t pareadas en las Tablas 55 a 57.

Tabla 54 Proliferation scores

suma de proliferación		manejo de vasos sanguíneos		grandes agrupaciones de proliferación		zona no vascularizada		tortuosidad de vasos	
ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo
FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS
2	2	2	2	0	0	1	2	1	0
10	8	10	8	0	0	3	0	0	0
7	9	6	9	0	0	1	0	0	0
2	4	2	4	0	0	1	1	0	0
4	8	4	8	0	0	2	0	0	0
1	9	1	9	0	0	0	0	0	0
1	2	1	2	1	1	1	1	0	1
4	6	3	5	1	0	1	0	0	0
6	4	6	4	0	0	1	1	2	3
5	6	5	6	0	0	0	0	3	3
0	4	0	4	1	1	1	1	1	3
7	7	7	7	2	2	2	2	2	3
0	7	0	7	0	0	0	0	1	4
2	17	2	14	0	2	3	4	0	5
8	25	7	20	1	5	4	6	2	5
4	6	4	5	0	1	3	3	1	1
10	6	10	6	0	0	2	2	5	4
6	4	6	3	0	0	3	3	1	1
8	9	7	7	1	2	4	5	2	2

(continuación)

suma de proliferación		manejo de vasos sanguíneos		grandes agrupaciones de proliferación		zona no vascularizada		tortuosidad de vasos	
ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo	ojo derecho	ojo izquierdo
FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS	FGF23CTP	PBS
4	21	4	17	0	4	3	4	1	4
11	14	10	13	0	1	4	6	2	4
17	18	14	15	3	3	7	5	6	6
6	3	5	3	1	0	3	3	1	1
6	5	6	5	0	0	2	2	2	0
12	14	7	11	4	3	3	4	1	2
18	20	14	16	3	4	6	6	4	2
18	9	13	7	4	2	6	4	6	2
14	21	11	15	5	3	5	7	2	5
12	16	9	11	2	5	4	5	1	1

5

Tabla 55 Suma de proliferación de la prueba t pareada

Diferencia de medias	DF	Valor t	Valor p
-2,724	28	2,514	0,0180

Tabla 56 Prueba t pareada Zona avascular

Diferencia de medias	DF	Valor t	Valor p
-0,034	28	0,154	0,8791

Tabla 57 Prueba t pareada tortuosidad de los vasos

Diferencia de medias	DF	Valor t	Valor p
--0,517	28	-1,543	0,1341

10

Evaluación de la toxicidad. A partir de los cinco ratones originalmente planeados para la evaluación del daño neurológico después de la inyección de FGF23CTP en el ojo derecho y de PBS en el ojo izquierdo, únicamente tres son estudios debidos a daño con el lente en un ojo y de problemas de fijación en otro animal.

El espesor total de la capa nuclear externa, de la capa nuclear interna y de la capa de células ganglionares se mide utilizando una magnificación estandarizada después de inclusión en parafina y de la coloración con hematoxilina y eosina (HE). Se miden tres secciones de cada ojo en tres lugares de cada una. La Tabla 58 muestra los resultados de las mediciones en mm utilizando una ampliación x200. Se codifican las secciones para la evaluación.



Tabla 58 Daño neuronal

Animal No.	Capa nuclear externa		Capa nuclear interna		Capa celular del ganglio	
	derecho	izquierdo	derecho	izquierdo	derecho	izquierdo
150-5	10.5	11	6	6.5	2.5	2
	11	9	7	5	3	2
	10.5	10	5	5.5	2	3
	10	10	5.5	5	2	1.5
	10	10.5	7	6	2.5	3.5
	11	10	6	7	2	2
	11	9	6.5	5	2.5	1.5
	11.5	11	6.5	7	2.5	2.5
	10	10	6.5	6	2	2
150-7	10.5	10.5	6	6	1.5	2
	12	12	7	7	2	2
	10	9	6	5.5	2.5	3
	10	11	6	7	2	2
	10	11	6	6	2	2.5
	11.5	11	7	7	2.5	3
	10	11	6	6.5	2	2
	10	12.5	5.5	6	2	2
150-9		10		7		2.5
	10.5	10	5	6	2	2
	11	10	6	6	2	2.5
	10.5	11	6	5.5	2	1.5
	11	9	5	6	2	2.5
	11	11	5	5	2.5	2
	12	11	6	5.5	2.5	2.5

(continuación)

Animal No.	Capa nuclear externa		Capa nuclear interna		Capa celular del ganglio	
	10	12	5.5	6	3	2
	11	9	5.5	6	3	2.5
	10	11	6.5	5	2	1.5
varianza	0.64121279	0.9600273	0.63245553	0.69337525	0.38078866	0.50636968
promedio	10.6346154	10.462963	6	6	2.25	2.22222222

- 5 Con base en las mediciones llevadas a cabo sobre los tres animales, se encontró que FGF23CTP no induce ningún daño neuronal en el ojo. En forma detallada, no existe una diferencia marcada en el espesor de las capas neuronales de la capa nuclear interna, de la capa nuclear externa o de la capa de células ganglionares cinco días después de la inyección ya sea de FGF23CTP o de PBS.

## LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; Novartis AG

- 10 <120> Utilización de fragmentos del factor de crecimiento de fibroblastos

&lt;130&gt; 4-33264A

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn versión 3.1

&lt;210&gt; 1

- 15 <211> 251

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val  
 1 5 10 15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu  
 20 25 30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg  
 35 40 45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala  
 50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala  
 65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met  
 85 90 95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn  
 100 105 110

Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His  
 115 120 125

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala

130		135		140											
Phe 145	Leu	Pro	Gly	Met	Asn 150	Pro	Pro	Pro	Tyr	Ser 155	Gln	Phe	Leu	Ser	Arg 160
Arg	Asn	Glu	Ile	Pro 165	Leu	Ile	His	Phe	Asn 170	Thr	Pro	Ile	Pro	Arg 175	Arg
His	Thr	Arg	Ser 180	Ala	Glu	Asp	Asp	Ser 185	Glu	Arg	Asp	Pro	Leu 190	Asn	Val
Leu	Lys	Pro 195	Arg	Ala	Arg	Met	Thr 200	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser 205	Cys	Ser	Gln
Glu	Leu 210	Pro	Ser	Ala	Glu	Asp 215	Asn	Ser	Pro	Met	Ala 220	Ser	Asp	Pro	Leu
Gly 225	Val	Val	Arg	Gly	Gly 230	Arg	Val	Asn	Thr	His 235	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly 240
Pro	Glu	Gly	Cys	Arg 245	Pro	Phe	Ala	Lys	Phe 250	Ile					

<210> 2

<211> 75

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln  
 20 25 30  
 Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly  
 50 55 60  
 Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile  
 65 70 75

<210> 3

<211> 756

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggtg9999 cccgcctcag gctctgggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc      60
gtcctcagag cctatcccaa tgcctcccca ctgctcggct ccagctgggg tggcctgatc      120
cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccacaa gaatggccat      180
gtggatggcg caccccatca gaccatctac agtgccttga tgatcagatc agaggatgct      240
ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga tttcagaggc      300
aacatttttg gatcacacta tttcgacctg gagaactgca ggttccaaca ccagacgctg      360
gaaaacgggt acgacgtcta ccactctcct cagtatcact tcctggtcag tctgggccgg      420
gcgaagagag ccttctctgcc aggcataaac ccacccccgt actcccagtt cctgtcccgg      480
aggaacgaga tccccctaat tcaactcaac acccccatac cacggcggca caccgggagc      540
gccgaggacg actcggagcg ggacccccctg aacgtgctga agccccgggg ccggatgacc      600
ccggccccgg cctcctgttc acaggagctc ccgagcggcg aggacaacag cccgatggcc      660
agtgacctat taggggtggt caggggcggg cgagtgaaca cgcacgctgg gggaacgggc      720
ccggaaggct gccgccccctt cgccaagtgc atctag                                     756
  
```

<210> 4

<211> 228

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 4

```

cacacccgga ggcccgagga cgactcggag cgggaccccc tgaacgtgct gaagccccgg 60
gcccggatga ccccggcccc ggcctctctgt tcacaggagc tcccgagcgc cgaggacaac 120
agccccgatgg ccagtgaccc attaggggtg gtcaggggcg gtcgagtgaa cacgcacgct 180
gggggaacgg gcccggaagg ctgccccccc ttcgccaagt tcatctag 228
    
```

10

15

20

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un fragmento de FGF23, en donde dicho fragmento
  - a) consiste de la secuencia de la SEQ ID NO 2, o
  - b) es una variante funcional del polipéptido de la SEQ ID NO. 2, que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 2, derivada por medio de sustitución conservadora de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 2.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento.
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de una enfermedad asociada con una mayor angiogénesis.
- 10 4. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la enfermedad asociada con una mayor angiogénesis se selecciona del grupo que consiste de retinopatías, degeneración macular relacionada con la edad, hemangioblastoma, hemangioma, tumores y cáncer.
5. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la enfermedad asociada con una mayor angiogénesis es retinopatía.
- 15 6. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad asociada con angiogénesis mejora es cáncer.
7. El uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de retinopatías, degeneración macular relacionada con la edad, hemangioblastoma, hemangioma, tumores y cáncer.
- 20 8. Una composición farmacéutica que contiene un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

# Figura 1

LTBP2: proteína 2 de enlazamiento del factor beta de crecimiento de transformación latente

humano vs ratón

```

GPA018 1 qrdpvgrypaggdanrlrrpagsypaaaaakvyslfreqdapvaglpv 50
          ||| :||||| ||||| | ||:||||||| |||| || |
mLTBP2 56 qrdsigryepasrdanrlwhpvqshpaaaaakvyslfrepdapvpglsps 105

          51 ecaqpgwgsprprpteaearrpsraqsrr 79
          | || | | | ||||| | || |
          106 ewnqpaqgnpgwlaeeearpprtqqlrr 134
    
```

proteína hipotética XP\_097406      No hay correspondencia en ratón

```

GPA019 1 atlggpeeestienyasrpe.....afkadeflnwhalfes 36
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
XP_097406 23 atlggpeeestienyasrpeafntpflnidklrsafkadeflnwhalfes 72

          37 ikrklpflnwdafpklkglrsatpdaq 63
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          73 ikrklpflnwdafpklkglrsatpdaq 99

GPA020 1 atlggpeeestienyasrpeafntpflnidklr.afkadeflnmhalfes 49
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
XP_097406 23 atlggpeeestienyasrpeafntpflnidklrsafkadeflnwhalfes 72

          50 ikrklpflnwdafpklkglrsatpdaq 76
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          73 ikrklpflnwdafpklkglrsatpdaq 99
    
```

## ANGPTL1: angiopietina tipo 1

humano vs ratón

```

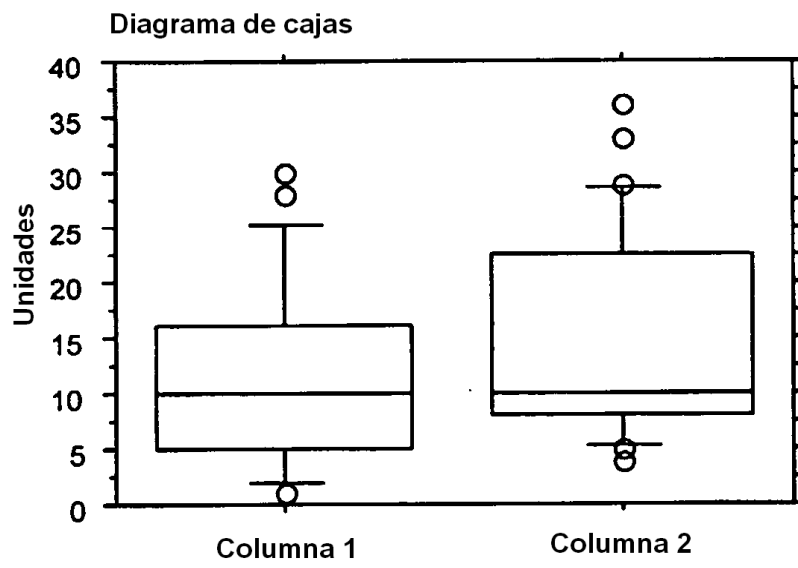
GPA022 1 CAYTFLVPEQRITGPICVNWKGGDASTIKDMITRMDLENLKDVLRSQKR. 49
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
mANGPTL1 1 CSYTFVPEQRTGPICVNWKGGDAGTKDMITRMDLENLKDVLRSQKRE 20

          Secuencia 5' traducida de ratón
          ↑
          |
GPA023 51 stihmitrmdlenlkdvlrsqkr..... 74
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
mANGPTL1 1 .....mitrmdlenlkdvlrsqkreidvlqlvvdvgnivnevkllrkes 45

          ↑
          |
Secuencia precursora humana
    
```



# Figura 2



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patente citados en la descripción

- US 6165754 A [0048]
- US 6309370 B [0048]
- US 6566342 B [0048]
- US 6620617 B [0048]
- US 6651655 B [0048]
- US 5202232 A [0052]
- US 5445934 A [0052]
- US 5525464 A [0052]
- US 5695940 A [0052]
- US 5744305 A [0052]
- US 5795716 A [0052]
- US 5800992 A [0052]
- WO 02088358 A [0158]
- WO 0210192 A [0186]
- US 5733569 A [0215]
- US 5759565 A [0215]
- US 5719122 A [0215]
- US 5175146 A [0215]
- US 56986721 B [0215]
- US 003015815 A [0215]
- EP 0672057 A [0216]
- WO 9402510 A [0216]
- WO 9631206 A [0271]
- WO 0039120 A [0271]
- WO 0149673 A [0271]

10 Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- Grenet O. Pharmacogenomics J., 2001, vol. 1 (1), 11 - 2 [0003]
- Shimada T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2001, vol. 98, 6500 - 6505 [0020]
- White K. E. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001, vol. 86, 497 - 500 [0021]
- 15 • The ADHR Consortium. Nat. Genet., 2000, vol. 26, 345 - 348 [0022]
- The HYP Consortium. Nat. Genet., 1995, vol. 11, 130 - 136 [0023]
- Quarles L. D. ; Drezner M. K. J. Clin. Endocrino/. Metab., 2001, vol. 86, 494 - 496 [0024]
- Shimada T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, vol. 98, 6500 - 6505 [0025]

- Quarles L. D. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2003, vol. 285, E1 - 9 [0025]
- Kim J-M et al. Gene Ther., August 2003, vol. 10 (15), 1216 - 24 [0047]
- Gene Ther., September 2003, vol. 10 (19), 1672 - 9 [0047]
- Sambrook J et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 2000 [0052]
- 5 • Johnston, M. Curr Biol, 1998, vol. 8, K171 - 174 [0052]
- Iyer V R et al. Science, 1999, vol. 283, 83 - 8T [0052]
- Elias P. New human genome 'chip' is a revolution in the offing, 03 October 2003 [0052]
- Needleman; Wunsch. "GAP" program of Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group. J. Mol. Biol., 1970, vol. 48, 443 - 453 [0075]
- 10 • Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group, Madison. "BestFit" program, based on the algorithm of Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 1981, vol. 2, 482 - 489 [0075]
- Altschul et al. Methods in Enzymology, 1996, vol. 266, 460 - 480 [0075]
- Ausubel et al. Protocols in Molecular Biology, 1995 [0084]
- Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley Sons, 1990 [0086]
- 15 • Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0087]
- Creighton T. E. Proteins, Structures and Molecular Properties. W H Freeman, 1984 [0103]
- Annes J P et al. Cell Sci., 2003, vol. 116 (2), 217 - 24 [0157]
- Chen S et al. Nucl. Acids Res., 2003, vol. 31 (4), 1302 - 10 [0157]
- Vehivilainen P et al. J. Biol. Chem., 2003, vol. 278 (27), 24705 - 13 [0157]
- 20 • Brown T L et al. J. Biol. Chem., 1999, vol. 274 (33), 23256 - 23262 [0157]
- Tang Y et al. Science, 2003, vol. 299 (5606), 574 - 7 [0157]
- Ludbrook S B et al. Biochem. J., 2003, vol. 369 (2), 311 - 8 [0157]
- Ota T et al. J. Cell Physiol., 2002, vol. 193 (3), 299 - 318 [0157]
- Hu MC et al. Development, 2002, vol. 130 (12), 2753 - 2766 [0157]
- 25 • Letamendia A et al. J. Bone Joint Surg. Am., 2001, vol. 83 - A (1), S31 - 9 [0157]
- Perlman R et al. Nature Cell Biology, 2001, vol. 3 (8), 708 - 14 [0157]
- Zhou Y et al. Genomics, 2002, vol. 80 (5), 465 - 72 [0157]
- Chen W B et al. J. Biol. Chem, 2002, vol. 277 (39), 36118 - 28 [0157]
- Lesne S et al. J. Biol. Chem., 2003, vol. 278 (20), 18408 - 18 [0157]
- 30 • Yang L et al. J. Cell Physiol., 2001, vol. 188 (3), 383 - 93 [0157]
- Aschenbrenner J K et al. T. Surg. Res., 2001, vol. 100 (2), 171 - 5 [0157]

- Yamashita T et al. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 2000, vol. 277, 494 - 8 [0158]
- Saito H et al. *Am. J. Pathol.*, 2002, vol. 156, 697 - 707 [0158]
- White K E et al. *Kidney Int.*, 2001, vol. 60, 2079 - 86 [0158]
- Shimada T et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 6500 - 5 [0158]
- 5 • Hoi Sang U et al. *J. Neurosurg.*, 1995, vol. 82, 841 - 846 [0173]
- Wu C J et al. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 3999 - 4010 [0173] [0181]
- Streffer JR et al. *J. Neurooncol.*, 2002, vol. 56, 43 - 49 [0173]
- Martin S et al. *J. Neurooncol.*, 2001, vol. 52, 129 - 139 [0173]
- Huang R et al. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 2806 - 2812 [0173]
- 10 • Soroceanu L et al. *Glia*, 2001, vol. 33, 107 - 117 [0173]
- Shir A; Levitzki A. *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20, 895 - 900 [0173] [0181]
- Cichowski K; Jacks T. *Cell*, 2001, vol. 104, 593 - 604 [0173] [0181]
- Gutmann, D H et al. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, vol. 10, 3009 - 3016 [0173]
- Aiello F P et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 10457 - 61 [0180]
- 15 • Ozaki H et al. *Am. J. Pathol.*, 2000, vol. 156, 697 - 707 [0180]
- Hoi Sang U et al. *J. Neurosurg.*, 1995, vol. 82, 841 - 6 [0181]
- Streffer J R et al. *J. Neurooncol.*, 2002, vol. 56, 43 - 9 [0181]
- Huang R et al. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 2806 - 12 [0181]
- Soroceanu L et al. *Glia*, 2001, vol. 33, 107 - 17 [0181]
- 20 • Gutmann D H et al. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, vol. 10, 3009 - 16 [0181]
- Lewis I et al. *J. Med. Chem.*, 05 June 2003, vol. 46 (12), 2334 - 44 [0186]
- Weckbecker G et al. *Endocrinology*, 2002, vol. 143 (10), 4123 - 4130 [0186]
- Kneissel M et al. *Bone*, 2001, vol. 28, 237 - 250 [0186]
- Thomsen J S et al. *Bone*, 1999, vol. 25, 561 - 569 [0186]
- 25 • Lewis I et al. *J Med Chem*, 05 June 2003, vol. 46 (12), 2334 - 44 [0187]
- Weckbecker G et al. *Endocrinology*, October 2002, vol. 143 (10), 4123 - 30 [0187]
- Bruns C et al. *Eur J Endocrinol*, 2000, vol. 143 (1), S3 7 [0187]
- Bruns C et al. *Eur J Endocrinol.*, May 2002, vol. 146 (5), 707 - 16 [0187]
- Macaulay V M. *Br J Cancer*, 1992, vol. 65, 311 - 20 [0211]
- 30 • Pollak M N ; Schally AV. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998, vol. 217, 143 - 52 [0211]

- Woltering E A et al. *New Drugs*, 1997, vol. 1.5, 77 - 86 [0212]
- van Hagen PM et al. *Eur J Clin Invest*, 1994, vol. 24, 91 - 9 [0212]
- Aguilera G et al. *Nature*, 1981, vol. 292, 262 - 3 [0212]
- Aguilera G et al. *Endocrinology*, 1982, vol. 111, 1376 - 84 [0212]
- 5 • Ray C et al. *Clin Sci (Lond)*, 1993, vol. 84, 455 - 60 [0212]
- Cheng H et al. *Biochem J*, 2002, vol. 364, 33 - 9 [0212]
- Bachman E et al. *Science*, 2002, vol. 297, 843 - 45 [0212]
- Kneissel M et al. *Bone*, March 2001, vol. 28, 237 - 50 [0216]
- Stewart A F et al. *J. Bone. Miner. Res.*, August 2000, vol. 15 (8), 1517 - 25 [0216]
- 10 • Thomsen J S et al. *Bone*, November 1999, vol. 25 (5), 561 - 9 [0216]
- Stewart A F et al. *J Bone Miner Res*, August 2000, vol. 15 (8), 1517 - 25 [0216]
- Eiden S et al. *J. Physiol.*, 2002, vol. 541 (3), 1041 - 1048 [0226]
- Lutz T A et al. *Peptides*, 2000, vol. 21 (2), 233 - 8 [0226]
- Pondel M. *Intl. J. Exp. Pathol.*, 2000, vol. 81 (6), 405 - 22 [0256]
- 15 • Tondravi M M et al. *Nature*, 1997, vol. 386 (6620), 81 - 4 [0257]
- Teitelbaum S L. *Science*, 2000, vol. 289 (5484), 1504 - 1508 [0257]
- Reddy S et al. *J. Cell Physiol.*, 1998, vol. 177 (4), 636 - 45 [0259]
- Blair H C et al. *Biochem.*, 2002 [0260]
- Zaidi M et al. *Bone*, 2002, vol. 30 (5), 655 - 63 [0260]
- 20 • Jaffer Z M ; Chernoff J. *Intl. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002, vol. 34 (7), 713 - 7 [0260]
- McCarthy T L et al. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2000, vol. 11 (4), 409 - 22 [0262]
- Szweras M et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (22), 19991 - 19997 [0262]
- Wang D S et al. *Endocrinology*, 1997, vol. 138 (7), 2953 - 62 [0263]
- Mayr-Wohlfahrt U et al. *Bone*, 2002, vol. 30 (3), 472 - 7 [0263]
- 25 • Swarthout J T et al. *Gene*, 2002, vol. 282 (1 - 2), 1 - 17 [0264]
- Greenfield E M et al. *Life Sci.*, 1999, vol. 65, 1087 - 102 [0264]
- Sun W et al. *Matrix Biol.*, 2001, vol. 20 (8), 527 - 41 [0268]
- van de Rijn M ; Gilks C B. *Histopathology*, 2004, vol. 44, 97 - 108 [0274]
- Heller M J. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, 2002, vol. 4, 129 - 153 [0275]
- 30 • Kiang D T ; Kennedy B J. *Ann Intern Med.*, 1997, vol. 87, 687 - 690 [0276]

- Jordan V C ; Allen K E. Eur. J. Cancer, 1980, vol. 16, 239 - 251 [0276]
- Jordan V C et al. Breast Cancer Res Treat., 1987, vol. 10, 31 - 35 [0276]
- Gottardis M M et al. Cancer Res., 1998, vol. 48, 812 - 815 [0276]
- Fornander T et al. Lancet, 1989, vol. 1, 117 - 120 [0276]
- 5 • Cohen F J et al. Obstet. Gynecol., 2000, vol. 95, 104 - 110 [0276]
- Ring J et al. (The Desloratadine Study Group) Int J Dermatol., 2001, vol. 40, 1 - 5 [0276]
- Fugere P et al. Am J Obstet Gynecol., 2000, vol. 182, 568 - 574 [0276]
- Ace C I ; Okulicz W C. Reprod Biol Endocrinol., 2004, vol. 2, 54 [0277]
- Marvanova M et al. FASEB J., 2003, vol. 17, 929 - 931 [0277]
- 10 • Zou J et al. Genome Biol., 2002 [0277]
- Cline J M et al. Toxicol Pathol., 2001, vol. 29, 84 - 90 [0280] [0310] [0311] [0315]
- Chomczynski P ; Sacchi N. Anal Biochem., 1987, vol. 162, 156 - 159 [0284]
- Lockhart D J ; Dong H ; Byrne M C et al. Nat Biotechnol., 1996, vol. 14, 1675 - 1680 [0284]
- Hacia J G et al. Nat Genet, 1998, vol. 18, 155 - 158 [0285]
- 15 • Massart D L et al. Handbook for Chemometrics and Qualimetrics, Part a. Elsevier, 1997 [0290]
- Jolliffe I T. Principal Component Analysis. Springer, 2002 [0290]
- Barker M ; Rayens W. Journal of Chemometrics, 2004, vol. 17, 166 - 173 [0290]
- Massart D L et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part b. Elsevier, 1997 [0290]
- 20 • Hunter W G ; Hunter J S. Statistics for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Wiley, 1978 [0290]
- Eriksson L et al. Multi- and Megavariate Data Analysis - Principles and Applications. Umetrics Academy, 2001 [0291]
- Eriksson L et al. J Comput Aided Mol Des., 2002, vol. 16, 711 - 726 [0291]
- Sachs L. Angewandte Statistik. Springer, 2002 [0293]
- 25 • Zar J H. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, 1998 [0293]
- Gottardis M M et al. Cancer Res., 1988, vol. 48, 812 - 815 [0311]
- Cohen F J et al. Obstet Gynecol., 2000, vol. 95, 104 - 110 [0311]
- Norstedt G et al. Acta Endocrinologica (Copenh), 1989, vol. 120, 466 - 472 [0312]
- Stygar D et al. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003, vol. 1, 40 [0312]
- 30 • Sampath D et al. Endocrinology, 2001, vol. 142, 2540 - 2548 [0312]
- Takahashi T et al. Cell Growth Differ., 1994, vol. 5, 919 - 935 [0312]

- Sartor B M et al. *Reprod Toxicol.*, 1995, vol. 9, 225 - 231 [0312]
- Tulac S et al. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2003, vol. 88, 3860 - 3866 [0313]
- Kato M. *Int J Mol Med.*, 2001, vol. 8, 657 - 660 [0313]
- Ricken A et al. *Endocrinology*, 2002, vol. 143, 2741 - 2749 [0313]
- 5 • Fujita M et al. *J Mol Endocrinol.*, 2002, vol. 28, 213 - 223 [0313]
- Fukuhara K et al. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2002, vol. 87, 1729 - 1736 [0313]
- Wang H et al. *Reprod Biol Endocrinol.*, 2003, vol. 1, 7 [0314]
- Higgins, R. D. et al. *J. AAPOS*, 1999, vol. 3, 114 - 116 [0324]

10