

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO NO DIRIGIDO DE LOS CAMBIOS
DINÁMICOS EN EL TRANSCRIPTOMA DEL
CÁNCER DE RECTO TRAS EL TRATAMIENTO
QUIMIORRADIOTERÁPICO MEDIANTE LA
TÉCNICA SAGE**

**Memoria presentada para la obtención del grado de
Doctor en Medicina por**

Beatriz Castelo Fernández

**Dirigida por el Prof. Manuel González Barón,
la Dra. Paloma Cejas Guerrero y
el Dr. Enrique Casado Sáenz**

Madrid, 2008

A Vicente, María y Diego

A mis abuelos, mi madre y mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

La investigación que trata de aplicar los conocimientos moleculares del cáncer a la toma de decisiones clínicas, lo que hoy se conoce como Oncología Traslacional, requiere una estrecha colaboración entre oncólogos, biólogos moleculares y estadísticos. Por ello la realización de esta tesis no hubiera sido posible sin el trabajo en equipo de un gran número de personas, muchas de las cuales pertenecen al Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y a su laboratorio de Oncología Traslacional.

En primer lugar quisiera agradecer al Prof. Manuel González Barón, gran impulsor de la investigación oncológica en este país, su estímulo constante para la realización de este trabajo, así como su confianza y sabios consejos.

A la Dra. Paloma Cejas y al Dr. Enrique Casado, amigos y compañeros, ambos pilares fundamentales de este trabajo. Con una dirección y una dedicación ejemplar, sus conocimientos y análisis crítico han sido de gran ayuda. Gracias por vuestras enseñanzas y por el enorme entusiasmo que conseguís contagiar. Han sido casi cuatro años de dedicación a este proyecto y, para mí, siempre será un verdadero placer trabajar a vuestro lado. Gracias por todo.

Al Prof. José Javier Sánchez, por su ayuda inestimable en las explicaciones del método estadístico, de especial relevancia en este estudio.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, por su colaboración.

Al Servicio de Digestivo y, en especial, a la Dra. Pilar Castillo, por su interés desinteresado a la hora de recoger las muestras de las colonoscopias a lo largo de varios años.

A todos mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz: médicos adjuntos, residentes, enfermeras, secretarías y auxiliares por el apoyo que me han transmitido a lo largo de estos años.

A todo el personal del Servicio de Oncología Traslacional de nuestro Servicio.

Al fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Sanidad y Consumo (Nº PI021094).

Por último, y no por ello menos importante, mi eterno agradecimiento a toda mi familia por su estímulo y su cariño, como siempre ha estado ahí compartiendo mis esfuerzos y mis ilusiones. Gracias Vin, gracias María, gracias Dieguete por los momentos tan felices que me regaláis. Sería injusto no hacer una dedicatoria especial a mi madre, gracias por cuidar a María y a Diego con tanto cariño y dedicación, sin ti no hubiera podido disponer de todo ese tiempo extra que ha resultado fundamental para poder finalizar esta tesis.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Aspectos generales	2
2. Patología molecular del cáncer colorrectal	3
2.1. Fundamentos biológicos del cáncer	3
2.2. Patogenia del cáncer colorrectal	5
3. Técnicas de estudio de perfiles genómicos	11
3.1. Métodos de bajo rendimiento	12
3.2. Métodos de alto rendimiento	12
3.3. Aplicación de los perfiles de expresión génica en cáncer colorrectal	15
4. Cáncer de recto. Aspectos clínicos	19
4.1. Epidemiología	19
4.2. Curso evolutivo	20
4.3. Diagnóstico y evolución de la enfermedad	20
4.4. Tratamiento del cáncer de recto	22
5. Determinantes pronósticos del cáncer colorrectal	30
5.1. Evaluación de datos clínicos	31
5.2. Evaluación de datos biológicos	34
5.3. Farmacogenética y evaluación de tratamientos	44
6. Mecanismos de resistencias terapéuticas	49
6.1. Mecanismos de muerte celular	50
6.2. Principales mecanismos de resistencias farmacológicas	54
6.3. Células madre tumorales y modelos de resistencias terapéuticas	63

6.4. Mecanismos de resistencias terapéuticas a Fluoropirimidinas	65
6.5. Mecanismos de resistencias terapéuticas a Irinotecán	68
6.6. Mecanismos de resistencias terapéuticas a Oxaliplatino	68
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	72
1. Hipótesis	73
2. Objetivos	74
III. MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Características clínico-patológicas de los pacientes	76
1.1. Características generales	76
1.2. Muestras clínicas	77
1.3. Recogida de muestras tumorales	79
2. Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)	81
2.1. Homogenización del tejido y lisis celular	82
2.2. Aislamiento del ARNm	83
2.3. Síntesis del ADN de cadena sencilla (ADN copia o ADNc)	83
2.4. Síntesis del ADN de cadena doble	83
2.5. Digestión con la enzima NlaIII	84
2.6. Unión de los adaptadores (<i>linkers</i>) A y B	85
2.7. Digestión con BsmFI	85
2.8. Unión de los adaptadores	86
2.9. Reacción de PCR	87
2.10. Aislamiento de los <i>ditag</i>	88
2.11. Ligación de los <i>ditag</i> para formar el concatémero	89
2.12. Ligación del concatémero al vector pZERO (plásmido)	89

2.13. Secuenciación de los concatémeros	89
3. Análisis estadístico y selección de genes	90
IV. RESULTADOS	93
1. Características clínico-patológicas	94
2. Análisis de la expresión génica	95
3. Perfil génico significativo con expresión diferencial	102
3.1. Análisis funcional del perfil génico seleccionado	104
3.2. Variaciones intrapaciente del perfil génico seleccionado	105
3.3. Variaciones inter-paciente del perfil génico seleccionado	106
V. DISCUSIÓN	110
1. Planteamiento del estudio	111
2. Limitaciones metodológicas	112
2.1. Selección de pacientes con pobre respuesta terapéutica	112
2.2. Reducido número muestral	113
2.3. Universalidad de los resultados	113
2.4. Heterogeneidad de la muestra tumoral	114
2.5. La técnica	115
3. Evaluación de resultados	115
3.1. Cambios dinámicos del transcriptoma tras la QRT	116
3.2. Estado de activación de los genes seleccionados en nuestros pacientes	119
4. El futuro de la predicción del pronóstico y la respuesta a fármacos en CCR	131

VI. CONCLUSIONES	136
VII. BIBLIOGRAFÍA	139
VIII. ANEXO	165
IX. CLAVES DE LAS ABREVIATURAS	303

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales diferencias entre <i>microarrays</i> de ADN y SAGE	13
Tabla 2. Principales diferencias entre SAGE y microSAGE	14
Tabla 3. Clasificación TNM del CCR	21
Tabla 4. Relación entre la estadificación tumoral y la supervivencia global, según series históricas	31
Tabla 5. Supervivencias alcanzadas con los primeros esquemas de adyuvancia en CR	32
Tabla 6. Principales factores moleculares predictivos de respuesta a diferentes quimioterápicos en CCR	45
Tabla 7. Factores predictivos de respuesta al tratamiento con 5-FU	45
Tabla 8. Quimioterápicos utilizados en clínica	49
Tabla 9. Funciones biológicas de algunos miembros de la superfamilia Ras	57
Tabla 10. Características de los 25 pacientes que dieron su autorización para el estudio dinámico	78
Tabla 11. Características de los tres pacientes en los que finalmente se realizó el estudio dinámico del transcriptoma	79
Tabla 12. Secuencias génicas con cambios dinámicos significativos tras el tratamiento QRT en el paciente A	95
Tabla 13. Secuencias génicas con cambios dinámicos significativos tras el tratamiento QRT en el paciente B	97
Tabla 14. Secuencias génicas con cambios dinámicos significativos tras el tratamiento QRT en el paciente C	98
Tabla 15. Paciente A: Función y proporción de genes significativos	100
Tabla 16. Paciente B: Función y proporción de genes significativos	100

Tabla 17. Paciente C: Función y proporción de genes significativos	101
Tabla 18. Paciente A: Nombre de los genes relacionados con las funciones más representativas	101
Tabla 19. Paciente B: Nombre de los genes relacionados con las funciones más representativas	101
Tabla 20. Paciente C: Nombre de los genes relacionados con las funciones más representativas	102
Tabla 21. Genes seleccionados por su posible implicación en procesos de RTs y su comportamiento en los pacientes del estudio	103
Tabla 22. Perfil de 26 genes con su principal función biológica y cambio dinámico objetivado tras el tratamiento QRT	105
Tabla 23. Características de interés de los genes seleccionados	118
Tabla 24. Situación funcional, en nuestro trabajo, de algunos de los genes más mencionados en la literatura	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales rutas genéticas en la carcinogénesis colorrectal	7
Figura 2. Regulación de la proteína Ras	10
Figura 3. Técnica SAGE	15
Figura 4. Dimerización de proteínas Bcl-2	51
Figura 5. Modelo de protección de la catástrofe mitótica mediado por survivina	54
Figura 6. Vía de señalización MAPKK/MAPKKK	59
Figura 7. Modelos de resistencia tumoral a drogas	64
Figura 8. Esquema de tratamiento quimiorradioterápico	76
Figura 9. Microscopía óptica de muestras seleccionadas para el aislamiento de ARN	80
Figura 10. Técnica MicroSAGE	82
Figura 11 (11a-11g). Material necesario para la técnica MicroSAGE	
Figura 11a. Tampón de lisis celular	82
Figura 11b. Tampón de LoTE	84
Figura 11c. Adaptadores	85
Figura 11d. Primers o cebadores	85
Figura 11e. Gel de acrilamida al 12%	87
Figura 11f. Tampón de PCR (10X)	87
Figura 11g. Cebadores para la amplificación de los clones de concatémeros	90
Figura 12. Digestión con BsmFI	86
Figura 13. Unión de las dos construcciones formando un <i>ditag</i>	87
Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida al 12% con el producto de 100pb amplificado en la PCR	87
Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida al 15% con el producto de 100pb tras la digestión por la enzima NlaIII	88

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el concatémero de la ligación de las bandas de 20pb	89
Figura 17. Análisis funcional de los genes con cambios significativos del paciente A	107
Figura 18. Análisis funcional de los genes con cambios significativos del paciente B	107
Figura 19. Análisis funcional de los genes con cambios significativos del paciente C	108
Figura 20. Análisis funcional de nuestro perfil de 26 genes	108
Figura 21. Código de colores para cada tipo de asociación, según la base de datos STRING	108

Introducción

1. ASPECTOS GENERALES

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad prevalente y con frecuencia letal. Es la tercera neoplasia maligna más frecuente en ambos sexos, la segunda causa de muerte por cáncer en varones, y la tercera en las mujeres. El cáncer de recto (CR) representa cerca de un tercio de los tumores colorrectales y en la mayoría de las ocasiones se diagnostica en fase localmente avanzada (CRLA) (1). En España su incidencia oscila entre 8 y 22 casos por 100.000 habitantes (2).

En el CRLA, el desarrollo de la excisión total del mesorrecto (ETM) y de estrategias preoperatorias con quimioterapia (QT) y radioterapia (RT) ha mejorado notablemente la supervivencia global (SG), el control local de la enfermedad, ha disminuido la toxicidad asociada a la quimiorradioterapia (QRT) y, posiblemente, la tasa de amputaciones anales.

El tratamiento combinado preoperatorio con QRT ha extendido la SG a los 5 años desde un 45%, con cirugía convencional (3), a un 66-76% con QRT preoperatoria, y las recidivas locales han disminuido desde un 30-50% a un 6-8%. Sin embargo, y a pesar de un correcto tratamiento, un tercio de los pacientes desarrollará metástasis a distancia, responsables de la elevada mortalidad (4;5).

En este contexto el oncólogo se enfrenta con dos grandes problemas. Por una parte, conocemos mal el pronóstico de los enfermos e ignoramos quienes se beneficiarán del tratamiento. Sólo algunos pacientes experimentan una respuesta terapéutica, a pesar del riesgo de sufrir toxicidades importantes, incluso letales. Si bien se han estudiado algunos parámetros moleculares individuales que pueden tener algún valor pronóstico y/o predictivo de respuesta, estos no han demostrado clara utilidad clínica, y la realidad es que desconocemos, a priori, los fármacos más apropiados para cada enfermo en términos de respuesta y toxicidad. Por otra parte, la eficacia de los tratamientos es limitada. Las resistencias terapéuticas (RTs) son un problema complejo y su estudio requiere del análisis simultáneo de múltiples factores moleculares.

El abordaje de ambos problemas puede beneficiarse del empleo de técnicas genómicas de alto rendimiento. El análisis de perfiles de expresión génicos ofrece la posibilidad de analizar miles de factores potencialmente involucrados en el pronóstico y en dichas RTs (6). La evaluación dinámica de factores moleculares que cambian tras un tratamiento puede ofrecer información sobre rutas de señalización celular que se activan o reprimen en respuesta al mismo y, por tanto, potencialmente asociadas a mecanismos de resistencia. Hasta la fecha apenas existen estudios

genómicos de alto rendimiento en CR, y los estudios de cambios dinámicos en la expresión de genes se limitan a muestras in vitro (7).

2. PATOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL

2.1. Fundamentos biológicos del cáncer

El cáncer se genera cuando se produce un desequilibrio entre regeneración y muerte celular. El resultado es una proliferación clonal de células inmortales con características impropias de sus tejidos de origen como la capacidad de invadir y proliferar en un ambiente ajeno.

Los primeros avances de la genómica en el conocimiento de la carcinogénesis tuvieron lugar en los años 70 con el descubrimiento de la capacidad transformadora de un gen retroviral que proporcionaba a las células que infectaba un fenotipo tumoral. Estudios posteriores reconocieron nuevos genes con esta propiedad y se denominaron proto-oncogenes. Fueron identificados como versiones mutantes de genes cuya función normal era controlar el ciclo celular. Más adelante, se consiguió transformar no sólo células en cultivo sino comprobar el crecimiento de tumores en modelos murinos transgénicos tras combinar un mínimo de dos oncogenes; si bien el análisis del tejido tumoral evidenciaba nuevas alteraciones genéticas. Eran necesarias, pues, una serie de mutaciones para transformar una célula normal, quedando por definir cuáles eran. Al tratar de llevar a cabo experimentos idénticos en células humanas el fracaso era la norma. Parecía que se requerían otra serie de condiciones para conseguir la transformación tumoral (8). Desde entonces se han identificado una infinidad de genes y proteínas involucrados en la patogénesis del cáncer, en un intrincado sistema de complejo análisis.

Hahn y Weinberg describen unos circuitos reguladores claves para el funcionamiento celular, a través de los que podemos entender las alteraciones de las células tumorales. Estas alteraciones o “capacidades adquiridas” incluyen la evasión de la apoptosis, la inmortalidad, generación de señales mitógenas propias, resistencia a las señales inhibitorias del entorno, estimulación de la angiogénesis, invasión de otros tejidos y metastatización. Además, las células tumorales se caracterizan por su inestabilidad genética, lo que les facilita la adquisición de nuevos atributos necesarios para la progresión del tumor. Todos los conocimientos detallados que tenemos hoy en día de la genómica y proteómica del cáncer se pueden describir mediante estos conceptos, aunque queda todavía mucho que aclarar para entender, en su totalidad, estas vías reguladoras.

Describiremos las principales alteraciones de los circuitos reguladores de las células tumorales.

a) Inmortalidad

Uno de los circuitos clave es el que gobierna la proliferación de la célula; conduciendo su desajuste a la inmortalidad. De este circuito se conocen varias alteraciones típicas de las células tumorales:

a.1. Alteraciones de la proteína del gen retinoblastoma (pRb). Actúa en una célula normal como “interruptor” del ciclo celular, decidiendo si la célula entra o no a la fase G1. Puede ser desarmada de distintas formas (mutación o metilación del gen, aumento de la degradación o inactivación de la proteína, etc.) con la consiguiente pérdida de la supresión de la proliferación.

a.2. Alteración de la función de otro gen supresor de tumores, p53. Este hecho sucede en la mayoría de las neoplasias humanas. En condiciones normales la proteína p53 es responsable de parar el ciclo celular en caso de que exista un daño al ADN, hasta que éste se corrija. En caso de no poder repararlo, p53 conduce la célula a la muerte celular. En una célula tumoral, la función de p53 se altera, por mecanismos similares que en el caso de pRb, con el resultado de células genéticamente inestables y receptivas a nuevas alteraciones pro-cancerígenas.

a.3. Alteración de los telómeros. Para la proliferación indefinida de una célula es imprescindible el mantenimiento de los telómeros, secuencias protectoras del ADN que se localizan en los extremos de los cromosomas y les protegen de su degradación. En una célula mortal, la supresión de la expresión de la enzima telomerasa conlleva la degradación progresiva de los telómeros dejando desprotegido al ADN codificante, lo cual conduce a apoptosis. Este enzima se sobre-expresa en hasta un 90% de las células tumorales, permitiendo, con el mantenimiento de los telómeros, la continua proliferación de la célula.

b) Proliferación

Una vez preparado el ambiente para la proliferación indefinida, la célula necesita independizarse en cuanto a la señalización de factores de crecimiento se refiere. Para ello activará vías de señalización, usadas en condiciones normales para transmitir señales mitógenas, para que funcionen sin necesidad de estímulos externos. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el que se desencadena por la mutación del oncogen Ras, como veremos más adelante. Otros ejemplos son la sobre-expresión del receptor de un factor de crecimiento o las alteraciones de otros enzimas involucrados en las rutas de señalización.

c) Angiogénesis y metástasis

Un tumor necesita para su crecimiento independiente una capacidad de estimular la formación de neovasos, proceso conocido como angiogénesis. Sin ello no superarán un diámetro mayor de dos milímetros. Todas las neoplasias sólidas producen factores angiogénicos e inhiben la expresión de factores anti-angiogénicos. Los detalles de este circuito regulador clave en una célula tumoral están por dilucidar. Menos entendidos son, todavía, los mecanismos que permiten que un tumor invada y metastatice en otro tejido.

2.2. Patogenia del cáncer colorrectal

Dada la importancia epidemiológica del CCR, se han hecho grandes esfuerzos para entender su carcinogénesis. Estos culminaron en el año 1990 con la publicación de un trabajo básico no sólo para entender los mecanismos genéticos del CCR, sino por reflejar un modelo con el que ilustrar los principios básicos del desarrollo de cualquier tumor: la adquisición sucesiva de una serie de alteraciones genéticas que confieren a la célula ventajas evolutivas permitiendo la progresión tumoral. Los autores fueron Fearon y Vogelstein y 17 años después los conceptos no han cambiado (9).

Los nuevos conocimientos adquiridos desde entonces han servido para completar el esquema y entender con mayor detalle el proceso. Estos avances nos han dado nuevas herramientas útiles para desarrollar métodos de cribaje y prevención, y para el tratamiento y seguimiento de los pacientes con CCR.

2.2.1. Evidencia morfológica

Antes del trabajo de Fearon y Vogelstein, se conocía por estudios anatomopatológicos y epidemiológicos que el cáncer de colon no se formaba nunca sobre epitelio colónico normal sino sobre lesiones precursoras: los adenomas. Dentro de ellos, los de menor potencial cancerígeno son los tubulares, seguidos por los tubulo-vellosos y los vellosos. Otro dato a favor de la relación causal entre adenoma y carcinoma es que la distribución dentro del colon es la misma y que el cáncer aparece unos 10-15 años más tarde que los adenomas. La extirpación endoscópica de pólipos adenomatosos reduce la incidencia de CCR (10).

En la mucosa colónica normal, la renovación del epitelio es un proceso minuciosamente regulado para que haya un equilibrio entre la tasa de apoptosis y descamación de las células a la luz del intestino, y la tasa de proliferación y diferenciación de células nuevas. La proliferación se produce en el fondo de las criptas de la mucosa y a medida que las células van migrando hacia la luz se van

diferenciando para formar epitelio normal. Cuando se forma un pólipo adenomatoso este proceso se altera. La zona de proliferación se extiende progresivamente hacia la superficie con una progresiva pérdida de la diferenciación celular sin que haya un aumento de la apoptosis para compensar el aumento de regeneración, con la consiguiente formación de un pólipo.

La pérdida del equilibrio entre proliferación y apoptosis presupone una alteración de los genes controladores del ciclo celular. Esta alteración probablemente ocurra antes que la formación del propio pólipo, en los llamados focos de criptas aberrantes (ACF), cada uno de los cuales puede tener hasta 200 criptas. Aunque la mayoría de los ACF son hiperplásicos, su proliferación es monoclonal (11) y una buena parte tienen rasgos displásicos con inestabilidad genética (12). Se han identificado varias mutaciones idénticas a las que se conocen en los pólipos adenomatosos y en el carcinoma invasivo, por ejemplo del gen APC (*adenomatosis poliposis coli*), K-ras y p53 (13), apoyando la hipótesis de que los ACF son precursores de los adenomas. Otra evidencia indirecta de esta conexión es que los ACF tienen la misma distribución a lo largo del colon que los adenomas y los tumores malignos, y su aparición se puede provocar mediante la exposición de carcinógenos en modelos animales (14). Parece probable, por tanto, que el proceso neofornativo en el colon empiece como ACF displásicos, de los cuales se forman los adenomas displásicos y de ellos el carcinoma invasivo. La evidencia apoya que esto es un proceso de más de diez años de duración, a lo largo de los cuales las células adquieren secuencialmente alteraciones genéticas que conducen a la aparición del cáncer de colon (14).

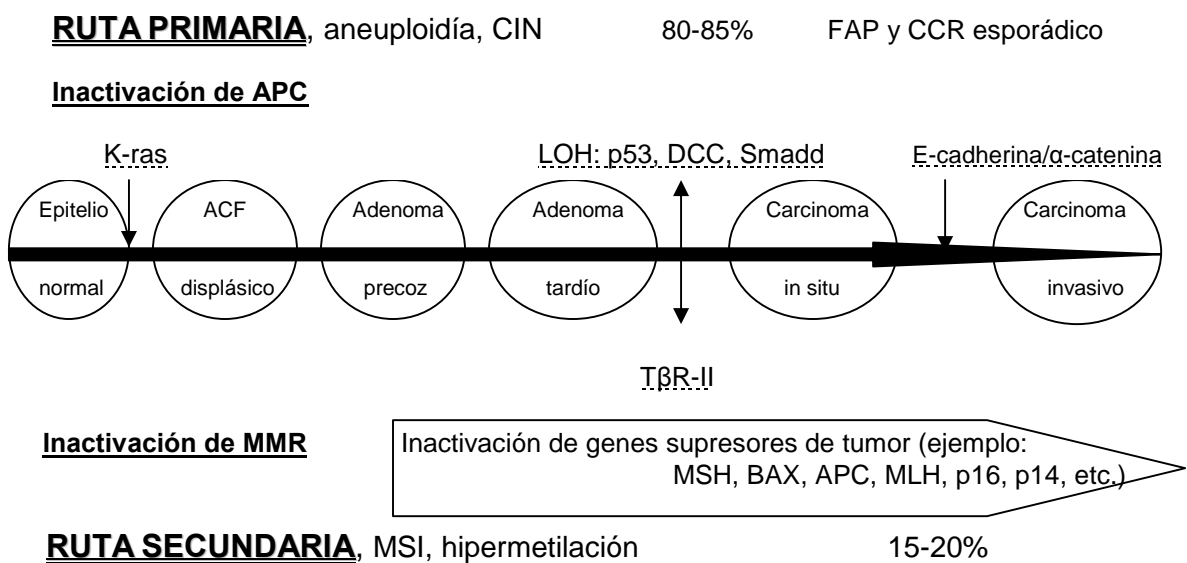
La hipótesis de la adquisición secuencial de mutaciones como modelo de tumorigénesis se basa en la clonalidad de las lesiones tumorales: cada célula neoplásica procede de un sólo progenitor. Éste adquiere alguna mutación nueva que le confiere una ventaja frente a las células de su entorno, desencadenando una nueva ola de proliferación clonal. Esto se repite hasta que la combinación de alteraciones genéticas es suficiente para el crecimiento de una masa con capacidad de invasión a los tejidos adyacentes y, finalmente, migración a distancia. Es importante destacar que la mayoría de las mutaciones somáticas adquiridas no proporcionan ninguna ventaja a la célula, sino todo lo contrario: conducen a apoptosis. Quiere decirse que la mayoría de los ACF no progresan a adenomas, y la mayoría de los adenomas no progresan a cáncer.

2.2.2. Biología molecular del cáncer colorrectal

Se habla de dos tipos principales de genes involucrados en el desarrollo del cáncer: los *gatekeepers*, responsables de inhibir la proliferación e iniciar la apoptosis en el momento indicado y los *caretakers*, responsables de mantener la estabilidad genética de una célula.

En el cáncer de colon se han identificado dos rutas carcinogénicas distintas, pero que conducen a la neoformación maligna, cada una en un contexto diferente (Figura 1).

Figura 1. Principales rutas genéticas en la carcinogénesis colorrectal



APC: *adenomatosis poliposis coli*, ACF: focos de criptas aberrantes CIN: inestabilidad cromosómica, CCR: cáncer colorrectal, FAP: poliposis adenomatosa familiar, HNPCC: cáncer de colon hereditario no polipósico, LOH: pérdida de heterozigosidad, MSI: inestabilidad de microsatelites, MMR: *mismatch repair*

En cuanto a frecuencia, la principal vía de tumorigénesis es la que se define por la inactivación precoz del gen *gatekeeper* APC, la aparición de aneuploidía e inestabilidad cromosómica. Esta vía está involucrada en el 80-85% de los casos de CCR, tanto en la forma hereditaria ligada a la poliposis adenomatosa familiar (FAP) como en las no hereditarias. La otra vía, responsable del 15-20% restante, se caracteriza por la pérdida de unos genes *caretakers* llamados “*mismatch-repair*” (MMR). Éste es el mecanismo responsable de los casos de cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis (HNPCC) y de algunos cánceres de colon esporádicos. Las dos rutas se caracterizan por una inestabilidad genética adquirida precozmente, pero de distinto tipo. Pese a compartir los mismos mecanismos genéticos, la gran diferencia entre los casos hereditarios y los esporádicos es que en

los casos familiares la mutación inicial, bien de APC o del sistema MMR, está presente en uno de los alelos del gen en cuestión desde el nacimiento, mientras que en los casos esporádicos se produce por una mutación somática. Posteriormente, en ambos casos, se produce la inactivación del segundo alelo permitiendo así la expresión del fenotipo tumoral.

Un fenómeno que está cobrando cada vez más interés es el de las alteraciones epigenéticas que ocurre en células no tumorales como una forma de regulación de la expresión de distintos genes o alelos. A nivel molecular, la metilación de ciertos dinucleótidos (CpG), particularmente presentes en las zonas promotoras de varios genes, causa su silenciamiento. La pérdida del patrón de silenciamiento ("*loss of imprinting*" o LOI) y la hipermetilación descontrolada parecen ser mecanismos de importancia en el desarrollo de ciertos CCR, donde se inactivan algunos genes supresores de tumor.

2.2.2.1. La ruta primaria: inactivación de APC

En la ruta primaria predomina la inestabilidad cromosómica (CIN) que consiste en la amplificación, inserción, delección o translocación de cromosomas enteros con la consiguiente aneuploidía. Un concepto central en la CIN es la llamada pérdida de heterocigosidad ("*loss of heterozygosity*", LOH). En ésta se pierde un alelo de un gen y con una mutación del alelo restante ya se manifiesta el fenotipo mutado.

Las causas fundamentales de la CIN no están claras, pero parece que los puntos críticos en su aparición están en el sistema reparador del ADN y en la formación del huso mitótico. Genes claves para la reparación del ADN, involucrados en varios cánceres, son BRCA-1, BRCA-2 y p53. De los genes implicados en la formación del huso mitótico se sabe menos, pero publicaciones recientes han presentado datos a favor de un papel central en las mutaciones del gen APC como causa de un defecto en la segregación cromosomal durante la mitosis (15;16).

La importancia de las mutaciones del gen APC en el desarrollo del CCR no radica sólo en que es un hecho muy frecuente (aproximadamente un 80% de los casos de CCR esporádico y FAP) sino también por ser un acontecimiento muy precoz. En el CCR esporádico se identifican con la misma frecuencia en los adenomas precoces que en el carcinoma invasivo y con menor frecuencia, pero ya presentes, en los ACF. En la FAP la práctica totalidad de los casos de ACF displásicos y adenomas han perdido el segundo alelo de APC, bien por mutación somática o bien por LOH (tras heredar la mutación del primer alelo).

En los casos de CCR en los que no se han identificado mutaciones en APC, en algunos se ha visto silenciamiento del gen por metilación del promotor y en otros

mutaciones que afectan a β -catenina, proteína efectora de la misma ruta de señalización intracelular – la vía *wingless/APC/ β -catenina*. En condiciones normales esta ruta regula la expresión de varios genes claves en la proliferación celular. Cuando APC se liga a β -catenina se inhibe el paso de ésta al núcleo, donde su función es estimular la expresión de dichos genes. La mutación del gen APC conlleva la alteración de la proteína APC que pierde la capacidad de ligarse a β -catenina, que pasa al núcleo para ejercer su efecto. Como ya hemos mencionado, mutaciones de APC también inhiben la correcta formación del huso mitótico contribuyendo a la CIN.

2.2.2.2. La ruta secundaria: inactivación de MMR

La fiabilidad del proceso de replicación del ADN es básica para la supervivencia no sólo de una célula sino de un organismo o de una especie. La evolución ha llevado el proceso a su práctica perfección y para los errores que aún así ocurren, que se estiman en uno de cada diez millones de pares de bases, se ha desarrollado el sistema de corrección que forman los genes MMR. Estos codifican una familia numerosa de proteínas que en conjunto son capaces de reconocer y corregir los errores que ocurren durante la replicación y, probablemente también, los que ocurren por exposición a agentes químicos, radiológicos, etc. Los miembros más conocidos son hMSH y hMLH.

En la ruta secundaria de carcinogénesis colorrectal predomina un tipo de inestabilidad genética causada por defectos en este sistema de reparación de errores, de una o pocas bases de nucleótidos, que ocurren durante la replicación del ADN. Hay zonas del ADN que son especialmente vulnerables a este tipo de mutación: zonas de secuencias cortas y repetitivas llamadas microsatélites. Cuando hay una mutación en un gen del sistema MMR, estos microsatélites adquieren con mayor frecuencia mutaciones dando lugar al fenómeno de inestabilidad de microsatélites (MSI) y, como consecuencia, a una mayor susceptibilidad a mutaciones inactivadoras de distintos genes supresores de tumor. En el caso concreto del CCR este fenotipo da lugar a tumores generalmente de mejor pronóstico, a pesar de ser con mayor frecuencia de localización proximal (y, por tanto, menos sintomáticos) y pobremente diferenciados.

La importancia clínica del sistema MMR para el CCR viene dada por su frecuente disfunción en el HNPCC y en algunos tumores esporádicos. Un 90% de los pacientes con HNPCC tienen MSI, y un 60% tienen mutaciones de los genes de MLH o MSH en las células germinales. De forma análoga con lo que ocurre en FAP, un portador de un alelo mutado heredado de genes MMR empieza a presentar MSI en cuanto el otro alelo se inactiva. En HNPCC esto suele ser por mutación somática o LOH. En tumores

MSI esporádicos el mecanismo de inactivación más frecuente es hipermetilación bi-alelica de zonas promotoras. El resultado es el mismo: el acúmulo progresivo de errores de replicación y posteriormente silenciación de genes supresores de tumor. Genes frecuentemente silenciados por este mecanismo son APC, β -catenina, TGF- β RII (receptor II del factor de crecimiento transformante β , que inhibe la proliferación) y BAX, un efector del sistema pro-apoptótico mediado por p53.

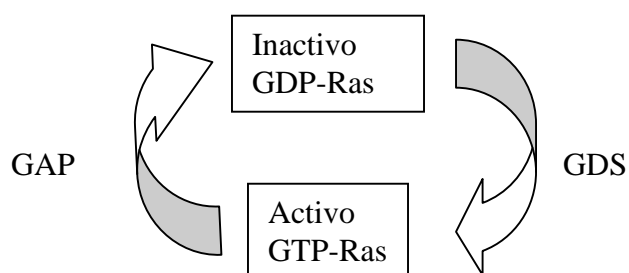
Al margen de estos mecanismos que promueven la formación de un cáncer, la disfunción de MMR tiene otra consecuencia de importancia clínica: los tumores son menos sensibles a la QT.

2.2.2.3. Otras alteraciones genéticas de importancia

2.2.2.3.1. p53: Se encuentra mutado hasta en un 75% de los CCR invasivo, pero raramente en las lesiones pre-neoplásicas (adenomas y ACF) sugiriendo que se trata de una alteración tardía en el desarrollo del CCR. Ejerce su función controlando la expresión de otros 20 genes y su mutación origina células genéticamente inestables y con una tendencia a acumular más mutaciones (17). La alta prevalencia de esta mutación y su probable importancia pronostica hace que sea una interesante diana terapéutica.

2.2.2.3.2. Ras: El gen Ras es una de las primeras familias de oncogenes conocidos cuyos miembros se denominan H-, K- y N-Ras. Los productos finales son proteínas GTPasas. Transducen señales desde la membrana celular hasta el núcleo. Sus principales funciones, en condiciones normales cuando el oncogen no está activado, son centrales para el correcto funcionamiento de la célula. Ras GTPasa está activa cuando está ligada a GTP e inactiva cuando éste está desfosforilado (GDP), en un equilibrio que se mantiene gracias a los reguladores GAP (*GTPase Activating Protein*) y GDS (*GDP Dissociation Stimulator*) (Figura 2).

Figura 2. Regulación de la proteína Ras (18)



Las mutaciones del oncogen Ras se han visto en ambas rutas de carcinogénesis de CCR. En el cáncer de colon se encuentran mutaciones en K-Ras en un 40-50% (19). Con frecuencia conlleva la anulación de la función desactivadora de GAP, resultando en una activación permanente de la señalización provocada por Ras.

El momento de la aparición de la mutación parece variar: los ACF no displásicos presentan la mutación en casi el 100% de los casos, es muy infrecuente en los adenomas precoces, mientras que en los adenomas de más de un centímetro se objetiva en un 50% de los casos. Por el contrario, en los pólipos hiperplásicos se da en aproximadamente el 25% (13). Las formas oncogénicas de Ras están permanentemente activas y se han definido varios mecanismos a través de los cuales la proteína adquiere esta capacidad: mutaciones génicas puntuales, sobre-expresión de la proteína, alteración de los reguladores o de los efectores de Ras GTPasa (Figura 2) (18;20). Sabemos que mutaciones en K-ras se asocian con peor respuesta al tratamiento, alta tasa de recidiva y elevada mortalidad en CCR (21).

El CCR representa un modelo ideal para el estudio de la patogénesis molecular del cáncer gracias a la conocida progresión del epitelio normal a cáncer invasivo a través de un precursor intermedio, el pólipo adenomatoso, y a la fácil accesibilidad para obtener muestra de los tejidos a través de biopsias. La identificación de mutaciones específicas responsables del desarrollo del CCR puede tener una clara aplicación clínica: la selección precoz de pacientes con alto riesgo de desarrollar CCR

3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE PERFILES GENÓMICOS

Los genes expresados por la célula están estrictamente regulados, tanto temporal como espacialmente, para mantener la diferenciación y el crecimiento normal celular. La pérdida de esta regulación lleva a situaciones anormales que alteran el comportamiento celular, como sucede en los tumores. La identificación de genes expresados de manera anormal en condiciones patológicas puede darnos indicadores para diagnóstico precoz, dianas para diseño de drogas o indicadores de respuesta o refractariedad a los tratamientos. También puede permitir conocer qué rutas están implicadas en la respuesta celular a un estímulo.

Por ello es importante afrontar el estudio de los perfiles de expresión génica. En los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de técnicas para estos análisis, lo que está favoreciendo un aumento paralelo del abordaje de estos estudios.

Los distintos métodos que se emplean pueden clasificarse como de alto y bajo rendimiento, refiriéndose a la cantidad de información y a la rapidez de obtención de la misma.

3.1. Métodos de bajo rendimiento: genoteca substractiva y *differential display*

3.1.1. Genoteca substractiva

Se prepara una copia de ADN (ADNc) de las células de las que queremos analizar la expresión diferencial y se hibrida con el ARN mensajero (ARNm) extraído de las células que usamos como control. Los híbridos ADNc-ARNm, resultado de los genes expresados comunes, se separan por cromatografía en hidroxapatita que retiene los híbridos y excluye el ADNc libre -de cadena sencilla- que son los genes de expresión diferencial que no se encuentran en el control. Con ellos se construye una genoteca de ADNc (22).

3.1.2. *Differential display*

Consta de dos pasos fundamentales: 1. Transcripción reversa de ARNs aislados de las distintas poblaciones celulares en las que queremos comparar diferencias de expresión. Para ello se utilizan oligonucleótidos degenerados con una cola de oligo(dT), formando así, un conjunto de ADNc. 2. Amplificación por PCR de estos ADNc utilizando como pareja de oligonucleótidos el anterior degenerado con una cola de oligo(dT) y otro con decámeros arbitrarios. Se emplea una temperatura de anillamiento baja, poco restrictiva, para favorecer las amplificaciones lo que provoca la aparición de falsos positivos, principal limitación de la técnica. Se aplica siempre con el mismo par de oligonucleótidos en todas las poblaciones celulares que queremos comparar. Tras una electroforesis en gel de acrilamida, las bandas correspondientes a los genes de expresión diferencial, las que amplifican para unas poblaciones sí y no para otras, se utilizan para hacer sondas de *Northern* o para clonaras (23).

3.2. Métodos de alto rendimiento: *microarrays* de ADN y SAGE

Ofrecen, frente a estrategias de estudio de parámetros individuales, la posibilidad de analizar miles de factores potencialmente involucrados en las RTs. Su aplicación en oncología permite conocer, al comparar diferentes perfiles de expresión, por ejemplo antes y después de un tratamiento, en situaciones análogas (mismo estadio de la enfermedad, tipo histológico, mismo tratamiento, etc.) qué genes se activan o se reprimen en función de la respuesta. Las diferencias que se encuentren podrían jugar un papel en la defensa de la célula frente a los tratamientos (24). Las ventajas e inconvenientes de estas técnicas de alto rendimiento se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Principales diferencias entre *microarrays* de ADN y SAGE

Técnica	Definición	Ventajas	Inconvenientes
Microarrays	Hibridación ADNc problema con ADNc conocidos en cristal	Rapidez Seriar análisis	Sofisticación técnica Sólo genes conocidos
SAGE	Secuenciar clones cortos de <i>tag</i> que corresponden a transcritos únicos	Análisis abierto y global Detección de genes no esperados	Puesta a punto laboriosa Enorme trabajo de secuenciación

3.2.1. *Microarrays* de ADN

Es una técnica basada en la hibridación de ADNc, preparados a partir de las células a las que queremos analizar su expresión génica, con una serie de secuencias ADNc de cadena sencilla que corresponden a genes ya conocidos y que están fijados a un cristal o membrana llamado *microarray*. Los ADNc problema están marcados con fluorocromos por lo que las hibridaciones se pueden detectar con un láser y un programa informático que trata las imágenes traduciéndolas en información cualitativa y parcialmente cuantitativa de la expresión de los genes (25). Los *microarrays*, incluyendo la tecnología más avanzada de la plataforma *Affymetrix*, presentan limitaciones importantes como la necesidad de seleccionar qué genes se van a analizar y su discreta capacidad para cuantificar la expresión génica ya que ofrece una estimación aproximada de ésta, que depende parcialmente de la fluorescencia (26).

3.2.2. SAGE

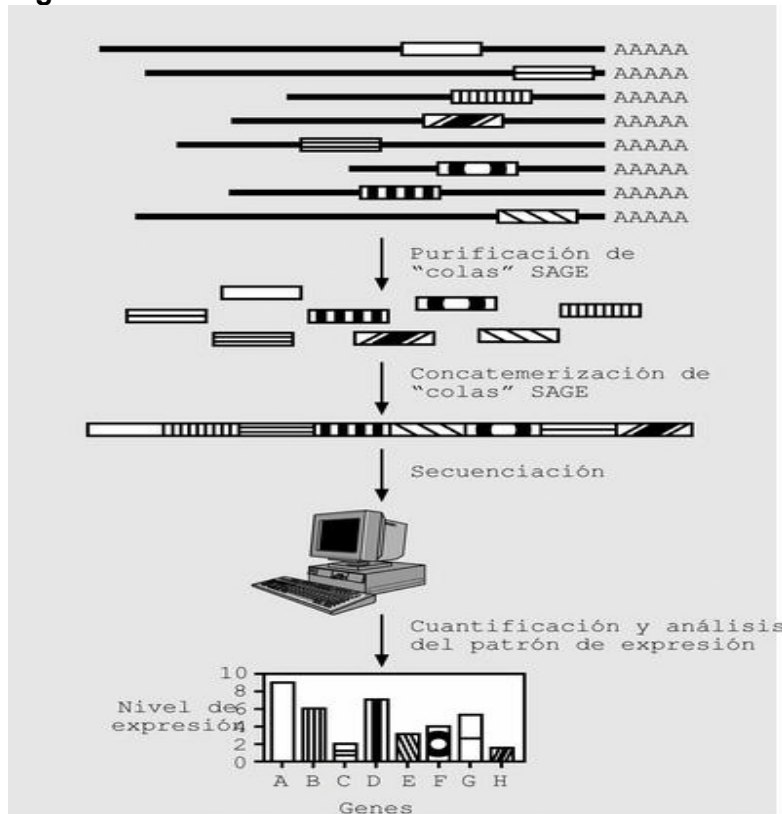
Es aún más potente que los *microarrays* de ADN pues no analiza secuencias seleccionadas sino la totalidad de las que se expresan, estén o no identificadas, además de cuantificar de forma precisa el número de veces que cada gen se expresa. Se basa en el hecho de que una secuencia de ADNc tan corta como de 10-14 pares de bases (pb), que denominamos *tag*, es suficiente para identificar un gen en una base de datos de secuencias (27-29). Todas las secuencias *tags* que se obtienen de las células en estudio se preparan, amplifican y unen unas a otras formando concatémeros. La secuenciación final de los concatémeros identificará tanto los *tags* conocidos como los desconocidos (denominados ESTs, *Expressed Sequence Tags*), tantas veces como aparezcan en la muestra. El principal inconveniente de la técnica es su laboriosidad, que impide su aplicación a un número elevado de muestras. SAGE puede resultar del máximo interés para el cribado de genes relevantes, aquéllos que la célula señala y no los que el investigador propone, en pacientes seleccionados que podrían ser estudiados posteriormente ya de forma selectiva para su validación mediante otras técnicas, como *Northern Blott*, PCR cuantitativa o los mismos

microarrays, aplicados a un mayor número de casos clínicos (27-29). MicroSAGE es una modificación de SAGE que permite trabajar con muestras de tejido unas 500-5000 veces más pequeñas que las necesarias para SAGE, de las que es suficiente con extraer 1-5ng de ARNm para el estudio del perfil de expresión génica. Se basa en la hibridación de unos oligo(dT) unidos a las esferas magnéticas desde el primer paso de lisado con lo que apenas se pierde material de los lavados iniciales (30). En la tabla 2 se muestran las diferencias entre SAGE y microSAGE. La figura 3 muestra cada uno de los pasos de los que consta la técnica SAGE.

Tabla 2. Principales diferencias entre SAGE y microSAGE

	SAGE	MicroSAGE
Cantidad de tejido	2.5-5 µg poliA ARN	ARN total de muestra tisular de 300 µm (10 ⁵ cels: 1-5ng poliA ARN)
Obtención ADNc	Oligo(dT) unidos a Estreptavidina a las que en un segundo paso habrá que ligar unas esferas magnéticas unidas a Biotina	Hibridación de oligo(dT) unidos a esferas magnéticas desde el primer paso de lisado
Técnica	Reacciones en múltiples tubos. Múltiples extracciones con fenol-cloroformo y precipitaciones con etanol entre la síntesis del ADNc y la liberación de los <i>tag</i>	Reacciones en un mismo tubo. Menos pérdida de información. No extracciones con fenol-cloroformo ni precipitaciones con fenol
PCR	25-28 ciclos	30 ciclos

Figura 3. Técnica SAGE



De estas cuatro técnicas solamente SAGE proporciona la ventaja de dar una información abierta de los genes que se expresan, resultando más informativa cuanto más *tag* se secuencien.

3.3. Aplicación de los perfiles de expresión génica en cáncer colorrectal

Los fracasos terapéuticos por resistencia a los tratamientos quimioterápicos son responsables de la elevada tasa de mortalidad del CCR. La magnitud del problema es, pues, notable considerando su elevada incidencia en nuestro país, que se ha estimado en aproximadamente 21.000 casos nuevos por año en ambos sexos (<http://www.msc.es>). Son muchos los factores que contribuyen a las resistencias terapéuticas intrínsecas o primarias. No sólo la expresión constitutiva de los genes MDR1 y MRP sino la confluencia de mutaciones, que se adquieren en el proceso de carcinogénesis, contribuyen, en conjunto, a la formación de resistencias (21). Aproximadamente el 80% de los pacientes con CCR no se va a beneficiar del tratamiento quimioterápico, bien porque la cirugía ha sido curativa o bien porque entran dentro de un grupo cuyos tumores son refractarios a la QT (6). La exposición a los antineoplásicos acaba originando la expansión de un clon de células tumorales que

se caracteriza por haber adquirido alteraciones genéticas que favorecen su refractariedad a dichos agentes terapéuticos.

Clásicamente han sido cuatro los marcadores con los que se distinguía, a priori, a los pacientes resistentes al tratamiento con 5-FU: la expresión de timidilato sintetasa (TS), de timidín fosforilasa (TP), el estado de p53 y el de los genes MMR. Las alternativas terapéuticas llegan, para esta situación, tras demostrar que otros dos agentes - Irinotecán y Oxaliplatino- son efectivos en el tratamiento del CCR; si bien clones de células tumorales acabarán generando resistencia, también, a estas drogas (6). Surgen así los primeros trabajos que, aplicando técnicas de alto rendimiento, pretenden conocer aquellas variables genéticas que permitan clasificar los tumores y determinar su pronóstico. Inicialmente los *microarrays* de ADN se aplicaron de una manera no supervisada, es decir, sin una selección previa con genes cuya expresión se sabe alterada en CCR, por lo que proporcionaban una información muy global. Aún así, definieron perfiles de expresión que permitían diferenciar entre mucosa colónica normal, adenoma o carcinoma (31;32). El empleo de datos supervisados implicaba trabajar con una muestra inicial (*training set*) y posteriormente validar los resultados (*validation set*). Se mostraron así diferentes perfiles génicos para cáncer de colon derecho o izquierdo, incluso según si asociaban o no MSI (33;34). Pese a que la información generada no tuvo más que un mero interés biológico, en su conjunto estos trabajos han tenido repercusión clínica al distinguir grupos de mal pronóstico o con más riesgo para la aparición de metástasis en los que aplicar tratamientos más agresivos y realizar seguimiento más estrecho (26;32). Han encendido, además, una luz para el estudio de las rutas moleculares que participan en la transformación del epitelio colónico y han permitido identificar posibles dianas terapéuticas.

Un trabajo de referencia en el estudio de las resistencias intrínsecas a 5-FU es el realizado por Scherf y cols. por ser el primero en integrar una gran base de datos de perfiles de expresión en el campo molecular de la farmacología (35). Los autores generaron una gran matriz de datos derivada de la exposición de diferentes quimioterápicos a un panel de 60 líneas celulares no específicas de CCR (NCI60), que previamente no habían recibido ningún tratamiento. Encontraron una correlación negativa entre la expresión de dihidropirimidín deshidrogenada (DPD), principal responsable del catabolismo de 5-FU, y la respuesta a éste. Otros autores encontraron una correlación negativa con la expresión de TS y la respuesta a 5-FU (36). Mariadason y cols. emplearon un panel de 30 líneas celulares específicas de CCR para identificar genes que se relacionaran con la respuesta a 5-FU. Utilizando una estrategia de validación interna o cruzada ("*leave one out*"), identificaron 50 genes que predecían esta respuesta. Entre ellos: genes implicados en la replicación y reparación

de ADN, en el procesamiento y tráfico de proteínas, y en apoptosis. Destacar el gen Bak, pro-apoptótico, y cuya sobre-expresión guardaba una correlación positiva con la respuesta a 5-FU. Este hallazgo fue validado demostrando que Bak, tras el tratamiento, pasaba a localizarse en el interior de la mitocondria, lo que lo relacionaba con la liberación del citocromo C y el fenómeno de apoptosis. Algunos genes implicados en el metabolismo de los folatos guardaron una correlación negativa con la respuesta a 5-FU. En este trabajo no se estableció ninguna relación entre el estado de p53 o de MMR y la respuesta a 5-FU. Un reanálisis posterior identificó, con la información generada por el propio *array* de ADN, otra firma génica de 149 genes predictivos de respuesta a Irinotecán (37).

De otros trabajos empiezan a surgir moléculas nuevas cuya expresión difiere en células resistentes a 5-FU: survivina, molécula antiapoptótica parece sobre-expresada en células resistentes o galactina 4, con la que se observa un efecto contrario (38). Las chaperonas son enzimas que participan en el procesamiento y plegamiento de las proteínas, y en la protección frente al estrés oxidativo. Maxwell y cols. encuentran que la sobre-expresión de chaperonina 10 protege a la célula del daño de 5-FU, que actúa sobre ellas como un agente genotóxico (39). Hallazgo confirmado por otros autores (37).

Los perfiles de expresión génica no sólo sirven para determinar la resistencia intrínseca y la probabilidad de respuesta a los tratamientos, sino para analizar las rutas moleculares que se activan o se reprimen por la acción de un determinado quimioterápico, e incluso las modificaciones de los genes antes y después de los tratamientos.

El primer trabajo que compara el perfil de expresión génica en pacientes con cáncer, antes y durante el tratamiento, estudia el transcriptoma de biopsias de CR antes y a las seis semanas de finalizar un esquema neoadyuvante con 5-FU en infusión continua y Mitomicina. Tras el tratamiento, se comprobó una disminución en la expresión de genes que codificaban proteínas relacionadas con el ARN, con la síntesis de proteínas -como las proteínas ribosomales-, factores de iniciación de la traslación, genes implicados en el plegamiento de las proteínas o en el metabolismo celular - particularmente en la síntesis de ATP. La traducción clínica de todo ello era la respuesta a los antineoplásicos. Muchos de aquellos genes eran regulados por c-myc, normalmente sobre-expresado en CCR. El tratamiento con 5-FU parece producir una disminución en la expresión de genes regulados por c-myc pero no se demostró que indujera expresión de p53 (40). Y es que en otros trabajos con cultivos celulares sólo la expresión simultánea de c-myc y p53 hacía a las células sensibles a 5-FU por lo que

en caso de mutaciones en p53 parecía que debían evitarse estrategias terapéuticas que basaran sus efectos en inducir sobre-expresión de c-myc (41).

La pérdida en la función o inactivación de p53 se relaciona con resistencia a la apoptosis inducida por 5-FU. Con el fin de identificar genes, dianas de p53, que puedan mediar en estos efectos se han analizado, por SAGE, los diferentes perfiles de expresión génica, tras tratamiento con 5-FU, en dos líneas celulares (HCT116), contrarias en la expresión de p53. El gen que codifica la ferredoxin reductasa (FR) mitocondrial fue inducido por 5-FU, por un mecanismo dependiente de p53. El producto de este gen se localiza en la mitocondria y su sobre-expresión suprime el crecimiento de células colorrectales. Su bloqueo, pues, es esencial para la viabilidad de las células de CCR y una inhibición parcial del mismo se traduce en un descenso en la sensibilidad de 5-FU para inducir apoptosis. Parece que FR contribuye a la apoptosis, mediada por p53, a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo) en la mitocondria y pudiera ser uno de los mecanismos por los que 5-FU induciría apoptosis en células de CCR que no tengan mutaciones en p53 (42).

Ejemplos de otros genes sobre-expresados por 5-FU, a través de p53, son: timosina β -10 (con función estructural), SSAT (implicado en el metabolismo de las poliaminas espermita y espermidina), MAT8 (también llamado FXYD3) y anexina II (expresados en las superficies celulares) o chaperonina 10 (gen mitocondrial) (39). Todos estos genes poseen un sitio de unión para p53, lo que explica que este gen regule su expresión cuando son inducidos por 5-FU.

En el caso concreto del CR se han realizado recientemente dos estudios que analizan perfiles de expresión antes del tratamiento QRT, en un trabajo, y antes de la RT en otro. En el primero de ellos se encontraron 54 genes cuyos perfiles de expresión predecían la respuesta al tratamiento con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 86% (43). En el otro estudio se encontró un perfil de 33 genes que predecían la respuesta al tratamiento con RT preoperatoria con una sensibilidad del 82% (44).

Pese a la importante información derivada de todos estos trabajos, la principal limitación con la que nos encontramos es su aplicación en la práctica clínica; el disponer de muestras tumorales de pacientes con un seguimiento clínico prolongado con el fin de corroborar que determinados perfiles de expresión génica son realmente una correcta herramienta de predicción de respuesta o refractariedad a los tratamientos.

4. CÁNCER DE RECTO: ASPECTOS CLÍNICOS

La mayoría de los CCR son, desde el punto de vista anatomopatológico, adenocarcinomas. El resto de variedades histológicas son extremadamente infrecuentes e incluyen linfomas y tumores de origen mesenquimal como leiomiomas, liposarcomas y sarcomas de Kaposi.

4.1. Epidemiología

El CCR es el tercer tumor más frecuente en ambos sexos. En España se estima que el número de casos nuevos por año se sitúa en torno a los 21.000 en ambos sexos frente a 11.900 defunciones. El número de casos prevalentes originados en los últimos años es de 64.000, 28.000 mujeres y 36.000 varones (2).

Los tumores de colon y recto suelen analizarse conjuntamente debido a los posibles errores de clasificación de los tumores de la unión del recto con el sigma. La mortalidad es elevada, constituyendo la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres. La tendencia reciente a la estabilización de la misma puede reflejar las mejoras terapéuticas obtenidas con un diagnóstico precoz, por tratarse de tumores bastante accesibles a la exploración con sigmoidoscopio y a la generalización de las colonoscopias completas en grupos de riesgo identificados.

La mortalidad e incidencia en España son sustancialmente menores que la de los países del norte de Europa, estando nuestras tasas por debajo de las tasas promedio de Europa, pero con una mortalidad ya superior a la de Francia, Italia y Reino Unido (45).

La edad es el factor epidemiológico más importante. La incidencia aumenta de forma espectacular a partir de los 50 años de edad y es muy similar en hombres y en mujeres.

Se ha demostrado una asociación entre distintas características de la dieta y el riesgo de desarrollar CCR. La dieta es otro factor importante. Una ingesta de más de 17 gramos de fibra al día se relaciona con un menor riesgo de padecer CCR (46). También parece existir una relación inversa con la ingesta de calcio y el ejercicio físico (47). Por el contrario la incidencia de CCR aumenta con dietas ricas en grasa y en carnes rojas (48).

Como factor epidemiológico también hay que citar los tumores de origen familiar. La presencia de mutaciones heredadas en algunos genes, como APC, hMSH1 y hMLH2 aumenta la incidencia de CCR en portadores de las mismas (49).

4.2. Curso evolutivo

4.2.1. Consideraciones anatómicas

No existe una definición anatómica uniformemente aceptada para el recto. Con frecuencia se considera que comienza en los últimos 15 centímetros (cm) del intestino grueso, que es donde suelen detectarse cambios en la musculatura de la pared del intestino grueso y donde empieza a convertirse en un órgano retroperitoneal. Sin embargo, a la hora de planificar la estrategia terapéutica oncológica, se entiende por recto a la zona de intestino grueso localizada por debajo del repliegue peritoneal, lo que se sitúa en los últimos 12-15cm dependiendo de las personas. Este dato sólo nos lo puede facilitar el cirujano tras la intervención. Existe un amplio consenso para aceptar que el recto termina en la línea pectínea, a 1-2cm por debajo del anillo anorrectal. A su vez, puede dividirse en tres partes en función de la localización de las válvulas de Houston: tercio inferior, situado entre 3 y 5cm del margen anal, tercio medio, de 5 a 10cm y tercio superior, de 10 a 15cm. No obstante, cabe tener en cuenta que existe una cierta variabilidad interpersonal en la localización de estas válvulas, que puede oscilar entre 1 y 2cm.

4.2.2. Evolución natural

Cuando el tumor no se trata adecuadamente o existe una resistencia al tratamiento realizado, la proliferación de las células neoplásicas ocasionará la infiltración de estructuras adyacentes, la invasión de conductos linfáticos con la consecuente afectación de los ganglios linfáticos de drenaje del recto (mesorrectales, cadenas ilíacas, cadena aórtica). Las células tumorales también podrán penetrar en los vasos sanguíneos de la microcirculación del intestino, y algunas de ellas desplazarse por el torrente circulatorio para dar lugar a las metástasis, con una localización preferente en hígado y pulmón. Con menor frecuencia puede metastatizar en hueso, glándulas suprarrenales, piel, sistema nervioso central, entre otros.

4.3. Diagnóstico y estadificación de la enfermedad

Una vez realizado el diagnóstico histológico, normalmente a través de una biopsia endoscópica del tumor primario, se realiza el estudio de extensión, con objeto de estratificar la enfermedad de acuerdo a la clasificación TNM. Ésta se terminará por definir con los datos patológicos tras la cirugía (pTNM). Actualmente, al administrarse tratamiento QRT preoperatorio, se añade otro prefijo (ypTNM, yatrogénica patológica TNM).

4.3.1. Clasificación TNM del CR

La clasificación del CR mediante el sistema TNM divide la enfermedad en varios estadios en función de la invasión de las capas intestinales del tumor primario (T), del estado ganglionar (N) y de la presencia de metástasis a distancia (M) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación TNM del CCR (50;51)

	T	N	M
Est I	1-2	0	0
Est IIA	3	0	0
Est IIB	4	0	0
Est IIIA	1-2	1	0
Est IIIB	3-4	1	0
Est IIIC	Cualquiera	2	0
Est IV	Cualquiera	Cualquiera	+

T1_s: Intraepitelial (confinado a la membrana basal) o lámina propia (intramucoso) sin extensión a la submucosa a través de la muscularis mucosa

T1: Invade submucosa (lamina propia)

T2: Invade muscularis propia

T3: Atraviesa la muscularis propia invadiendo la subserosa o el tejido pericólico no recubierto de peritoneo

T4: Perfora peritoneo visceral (serosa) y/o invade otros órganos o estructuras, invasión de otros segmentos colónicos a través de serosa (ejemplo.: invasión de sigma por carcinoma de ciego)

Si macroscópicamente está adherido (si microscópicamente no hay tumor sería pT3)

N: (estadificación correcta: al menos 12 ganglios disecados)

N1: Entre 1-3 ganglios

N2: 4 ó más ganglios

M: Enfermedad metastásica

El curso clínico del CR dependerá fundamentalmente del grado de invasión locorregional, definido por la TNM.

4.3.2. Estadificación preoperatorio

A la hora de planificar el abordaje terapéutico para los pacientes con CR es necesario obtener información relativa a la estadificación. Esto nos permitirá determinar si es aconsejable iniciar un tratamiento neoadyuvante, así como si debe realizarse una excisión local o una cirugía radical.

4.3.2.1. Técnicas de imagen empleadas

4.3.2.1.1. Ecografía endorrectal: Es considerada la técnica más precisa en la estadificación local del CR (52). La fiabilidad para evaluar la T es del 85% y la N del 75% (53). En concreto es del 95% para distinguir los tumores confinados en la pared rectal de aquéllos con invasión transmural (54). No es útil en los tumores más proximales del recto y su precisión pierde valor para reestadificar tras la administración

del tratamiento neoadyuvante, debido a su incapacidad para distinguir entre el tejido fibroso y el tumoral.

4.3.2.1.2. Resonancia magnética nuclear (RMN): Su fiabilidad para determinar la T es del 66-92% con una sensibilidad similar a la de la ECO endorrectal (94%) y una menor especificidad (86% vs 69%). Su fiabilidad para detectar adenopatías es menor (50-75%), con una sensibilidad y especificidad del 67% y el 77%, respectivamente (55). Su principal ventaja reside en la capacidad para detectar la invasión de la fascia mesorrectal, que se sitúa próxima al 100%, y el margen circunferencial del CR (56;57). Al igual que la ecografía endorrectal, es poco útil para reestadificar tras el tratamiento neoadyuvante por los mismos motivos expuestos.

4.3.2.1.3. Tomografía axial computarizada (TAC) abdómino-pélvica: Útil para la detección de metástasis intra-abdominales. Su fiabilidad para estadificar la T (70%) y la N (54-70%), son claramente inferiores a la ecografía endorrectal (58). El estudio SPICTRE (*Spiral CT in Rectal Cancer*) investiga la distancia entre el tumor y la fascia mesorrectal con una técnica moderna de TAC. Los datos preliminares indican que la TAC es un buen factor de predicción de la afectación del margen circunferencial en tumores de recto medio y alto, donde este órgano está rodeado de una capa de grasa fina (59).

4.3.2.1.4. Tomografía por emisión de positrones (PET): Útil para detectar la presencia de enfermedad regional, a distancia y recaídas tras una resección curativa.

4.4. Tratamiento del cáncer de recto

4.4.1. Aspectos generales del tratamiento

En los últimos años el planteamiento terapéutico del CR ha cambiado de forma sustancial. El reconocimiento de que la alta incidencia de recidivas locales es debida a la falta de esterilidad tumoral del margen quirúrgico ha llevado al desarrollo de la ETM. Consigue una notable disminución de dichas recidivas por lo que se considera, en el momento actual, el tratamiento quirúrgico estándar del CR de tercio medio y bajo (60). El concepto de ETM fue introducido por Heald en 1979 reproduciendo otros autores los buenos resultados de su primera serie (61;62). Pese a ello, la experiencia del cirujano es un factor de vital importancia en el éxito de la cirugía del CR con descensos en las tasas de recaídas locales, a los dos años, del 15% al 6% tras una formación en la técnica de ETM (63).

La tasa de recaídas locales tras una cirugía óptima está relacionada con el estadio T y N, con tasas de recidivas locales del 20-40% en tumores localmente avanzados sin afectación ganglionar o más limitados pero con ganglios positivos y del 40-60% cuando están presentes los dos factores de riesgo (63;64). Estos porcentajes son aplicables para el riesgo de enfermedad a distancia en función de la presencia de los mismos factores de riesgo anteriormente descritos. Se deduce, pues, la importancia de la definición del riesgo individual de recaída para decidir la pauta terapéutica (65).

4.4.2. Tratamiento de la enfermedad localizada

Con los datos que disponemos en la actualidad, el tratamiento quirúrgico exclusivo queda limitado a aquellos tumores precoces o iniciales ($T_{1-2}N_0$) en los que la SG, a los cinco años, se sitúa en un 90%. Los esfuerzos por alcanzar en algo estos resultados, en la enfermedad localmente avanzada, se han sucedido en las últimas décadas. Así, en 1989, la Conferencia de Consenso del *National Health Institute* declaró que la QRT postoperatoria debería ser considerada el tratamiento estándar en los estadios II y III de CR por demostrar una mejoría significativa en términos de supervivencia, metástasis a distancia y control local de la enfermedad (66). Un paso más se dio al demostrar que la RT preoperatoria mejoraba en un 5% la supervivencia, frente a la RT postoperatoria, además de disminuir en un 9% la tasa de recidivas locales (67). Se cuestionó, también, si tras una adecuada ETM se seguían derivando los beneficios de la RT preoperatoria. Un estudio aleatorizado holandés (CKVO-9504) ha intentado contestar a esta pregunta: con un seguimiento de cinco años la tasa de fallo local sigue siendo significativamente más baja con RT de curso corto preoperatoria (6% vs 12%), sin cambios en la SG (64% vs 63%). Además, la RT preoperatoria consigue reducir el volumen tumoral favoreciendo la reseccabilidad de tumores inoperables al diagnóstico, aumentando el porcentaje de cirugías "curativas" e incluso permitiendo la realización de técnicas conservadoras del esfínter anal en casos seleccionados (68;69). Otra de sus ventajas es la disminución de la enteritis rádica tardía al excluirse del campo de tratamiento asas de intestino delgado. En términos de biología tumoral, la RT preoperatoria es más efectiva que la postoperatoria debido a la mayor oxigenación de las células tumorales antes de la cirugía, al destruirse con ésta numerosos vasos sanguíneos. Entre los posibles inconvenientes destacan el retraso en el tratamiento quirúrgico y la posible aparición de cambios inflamatorios que dificulten la cirugía (70).

Con estos antecedentes, en los últimos años se han desarrollado estrategias de tratamiento combinado con QRT preoperatorias. En concreto, tres estudios aleatorizados han comparado la QRT preoperatoria con la postoperatoria en el CR T3:

el Intergrupo 147, el NSABP R-03 y el alemán CAO/ARO/AIO-94. Los dos estudios norteamericanos se han cerrado prematuramente por lo que el poder estadístico es inadecuado para evaluar los objetivos de supervivencia, toxicidad y preservación de esfínteres (71;72). El estudio europeo CAO/ARO/AIO-94 empleaba 50,4 Gy de RT de curso largo y 5-FU en infusión en la primera y en la quinta semana, y ha sido positivo a favor de la estrategia preoperatoria. Con una mediana de seguimiento de cuatro años, los resultados demuestran que la administración preoperatoria permite preservar el esfínter en un mayor número de pacientes (diferencia significativa del 20% a favor de la neoadyuvancia). El fallo local fue significativamente superior en el grupo postoperatorio (13% vs 6%; $p=0,006$). No hubo diferencias en la incidencia de metástasis a distancia (36% vs 38%) ni en la SG (75% a los cinco años) pero sí una menor toxicidad (diferencia significativa de un 13% en la toxicidad aguda grado 3-4 y de un 10% en la toxicidad crónica) (5). En nuestra experiencia, con un esquema de UFT® y RT preoperatorios, y otro con Oxaliplatino y Raltitrexed, se reproducen los resultados mencionados (73;74).

La QRT preoperatoria mejora, pues, el control local, la preservación del esfínter en tumores del tercio medio-inferior y reduce la toxicidad aguda y crónica por lo que se ha implantado en la mayoría de los centros como opción de elección en el estadio II y III del CR.

Otros dos recientes estudios intentan contestar a la pregunta de cuál es la aportación de la QT a la RT preoperatoria, el FFCO 9203 y el 22921 de la EORTC. El primero de ellos evalúa el beneficio en la supervivencia que supone añadir QT a la RT. Concluye que la QRT incrementa la esterilización de los especímenes quirúrgicos, el control local y, moderadamente, la toxicidad aguda, si bien no aumenta la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a cinco años ni la preservación de esfínter (75). El ensayo 22921 de la EORTC, fue diseñado para contestar cuál es el momento idóneo para administrar la QT en relación con la RT. Evalúa la adición de la QT a la RT preoperatoria o postoperatoria frente a ausencia de QT en la supervivencia total, intentando detectar una diferencia del 8% a los cinco años. No se cumple el objetivo principal, que es el incremento de la SG. La SLE a cinco años con QT y sin QT es del 58,2% y 52,2%, respectivamente ($p=0,13$). Nuevamente la QRT preoperatoria logra un incremento significativo del porcentaje de resecciones anteriores (52% vs 55%; $p=0,05$), en comparación con la RT preoperatoria. Como era esperable, la tasa de metástasis a distancia fue reducida por la QT, siendo la secuencia más eficaz la QRT preoperatoria seguida de QT sistémica postoperatoria. Un dato interesante es que la QT postoperatoria compensó la falta de QRT preoperatoria en el fallo local. La tasa de

fallo local para la QRT sin QT adyuvante es del 8,7% y la de la RT seguida de QT es del 9,6% (4).

Aunque todos estos datos muestran que 5-FU/Leucovorín (LV) en bolo es un régimen beneficioso para reducir las metástasis a distancia y puede mejorar la supervivencia, su beneficio es limitado. En el estudio alemán, la tasa de recaídas locales alcanza el 36%, lo que indica que 5-FU/LV no es un régimen lo suficientemente activo ya que no parece mejorar la tasa de enfermedad a distancia ni incrementar la supervivencia. En este aspecto se están investigando nuevos fármacos, tanto quimioterápicos (Capecitabina, Oxaliplatino e Irinotecán) como agentes biológicos (Bevacizumab y Cetuximab). Es importante incorporarlos al tratamiento adyuvante y neoadyuvante del CR, al igual que en el cáncer de colon (76;77). Los estudios de fase II de QRT con Oxaliplatino asociados a 5-FU/LV, Capecitabina o Raltitrexed demuestran elevadas tasas de respuestas patológicas completas (RPc) que oscilan entre un 15% y 25%. Hay que destacar que los pacientes que obtienen una RPc son los que consiguen mejores resultados en control local, en cirugía conservadora y en SG y SLE (78). Estos datos deben ser confirmados en estudios de fase III. La combinación de Oxaliplatino con Raltitrexed, en neoadyuvancia, alcanza tasas de respuestas objetivas en el 40-50% de los casos, con toxicidades aceptables (79;80). Además, esta asociación tiene la ventaja adicional de que no produce alopecia. La dosis recomendada en el empleo de la combinación de Oxaliplatino con Raltitrexed como neoadyuvancia, junto con RT, es de 130 y 3mg/m², respectivamente (81). La complejidad de los regímenes que incorporan Bevacizumab, Cetuximab o ambos al tratamiento multimodal del CR obliga a identificar mejor los grupos pronósticos mediante factores clínico-patológicos y factores moleculares y genéticos para obtener el máximo beneficio de cada opción terapéutica.

4.4.3. Tratamiento de la enfermedad diseminada

El CCR metastásico es una enfermedad incurable con una supervivencia a los cinco años prácticamente nula, excepto en los pacientes en que se puede practicar una resección quirúrgica de la enfermedad metastásica. El tratamiento de la enfermedad diseminada se basa en la combinación de citotóxicos con la esperanza de aumentar así la tasa de respuesta y evitar la formación de resistencias. 5-FU es el fármaco esencial en el tratamiento del CCR cuyos resultados se pueden mejorar cuando se combina con otras drogas. En monoterapia produce un 10-15% de respuestas objetivas, algo más cuando se modula con LV y un 40-50% en combinación con Oxaliplatino o Irinotecán (82). En la enfermedad metastásica, otros análogos

funcionalmente pueden emplearse en lugar de 5-FU, como las fluoropirimidinas orales (Capecitabina, UFT® y Tegafur) o Raltitrexed (ZD1694).

Capecitabina fue diseñado con el objeto de disminuir la toxicidad digestiva de 5-FU e incrementar su actividad. Tras su absorción oral es metabolizado en el hígado y activado por la enzima TP presente en mayor concentración en las células tumorales. Estudios de fase III han demostrado una eficacia superior a esquemas clásicos de 5-FU en bolo modulado con LV. Resultados preliminares de fases III en combinación con Irinotecán u Oxaliplatino han demostrado ser una alternativa a la infusión continua de 5-FU (83).

UFT® es otra fluoropirimidina oral que ha demostrado, en la enfermedad avanzada, equivalencia a 5-FU. Es una combinación de Ftorafur (profármaco de 5-FU) y uracilo. Éste último inhibe la enzima catabolizadora de 5-FU o DPD (84;85).

Tegafur ha mostrado eficacia similar con un perfil de tolerancia más favorable (86).

Irinotecán, también conocido por las siglas CPT-11, es un inhibidor de la enzima topoisomerasa I que ha mostrado ser activo en CCR, tanto en monoterapia como en combinación con 5-FU y LV o con Raltitrexed. La combinación de 5-FU en bolo y LV con CPT-11 (esquema IFL) ha demostrado ser superior a la combinación exclusiva de 5-FU y LV (87), y su administración con 5-FU en infusión continua (esquemas tipo FOLFIRI) ha demostrado similar actividad a las combinaciones con Oxaliplatino (88).

Oxaliplatino es un platino que actúa directamente sobre el ADN formando puentes inter e intracatenarios. Se ha utilizado tanto asociado con 5-FU y LV como con Raltitrexed o fluoropirimidinas orales con buenos resultados. Su administración con 5-FU y LV en bolo seguido de una perfusión continua de 46 horas (régimen FOLFOX) se ha convertido en un estándar de tratamiento, al haberse mostrado superior al esquema de combinación IFL, con medianas de supervivencia próximas a los 20 meses (89-91). Hasta la fecha no podemos decir que exista un esquema de elección en primera línea de enfermedad metastásica. Los dos trabajos más significativos en este aspecto son el de Tournigand y cols. y el de Grothey y cols.. En el primero de ellos, comparan el régimen FOLFOX en primera línea seguido de FOLFIRI tras la recaída o viceversa, sin encontrar, entre los esquemas, diferencias en la tasa de respuestas ni en la SG (88). Grothey y cols., no encuentran diferencias de eficacia entre la combinación de Capecitabina con Oxaliplatino (XELOX) o con Irinotecán (XELIRI) (92). Pese a que debido al escaso número de pacientes de estos estudios no se pueden sacar conclusiones definitivas sí parece evidente la equivalencia de los regímenes de Irinotecán u Oxaliplatino cuando se combinan con 5-FU en infusión continua o Capecitabina. En la práctica diaria, la elección de uno u otro se basa en el perfil de efectos secundarios.

El desarrollo de nuevos agentes biológicos aporta nuevos datos de interés al tratamiento del CR. Cetuximab es un anticuerpo monoclonal que se une de manera competitiva al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), impidiendo la activación del receptor por parte de los ligandos endógenos, llevando en última instancia a reducir la proliferación, aumentar la apoptosis y disminuir la angiogénesis, la invasividad y las metástasis (93). Su eficacia en pacientes con CCR metastásico que han progresado durante o inmediatamente después de una pauta con Irinotecán se ha establecido en dos estudios de fase II realizados en Estados Unidos y en un estudio de fase II aleatorizado europeo. En el primer estudio americano (IMCL CP02-0141) en pacientes con CCR metastásico que expresaba EGFR y eran resistentes al tratamiento con Irinotecán, los pacientes fueron tratados con Cetuximab en combinación con Irinotecán, a la misma dosis que habían recibido previamente. La tasa de respuesta objetiva evaluada por los investigadores fue del 22,5% (19,3% según un comité independiente), con una mediana de duración de la respuesta de seis meses, demostrando que la combinación de Cetuximab e Irinotecán era muy activa en pacientes con CCR avanzado refractario (94). El segundo estudio (IMCL CP02-0144) evaluó la actividad antitumoral de Cetuximab en monoterapia con una tasa de respuesta del 10,5% según los investigadores (9% según el comité de evaluación independiente) y una duración de la respuesta de cinco meses y medio (95). En el estudio europeo aleatorizado BOND en una población de pacientes intensamente tratados, en la que el 100% eran refractarios a Irinotecán y el 63% a Oxaliplatino, la eficacia de la combinación de Cetuximab con Irinotecán fue superior a la de Cetuximab en monoterapia, en cuanto a la tasa de respuesta objetiva, la tasa de control de la enfermedad y la supervivencia libre de progresión (SLP). La combinación con Cetuximab logró una mediana de supervivencia más prolongada, si bien este incremento de casi dos meses (25%) de la SG no alcanzó significación estadística debido al tamaño insuficiente de la muestra y a que el 50% de los pacientes que progresaron durante la monoterapia de Cetuximab recibieron Irinotecán más Cetuximab como rescate, obteniéndose un control de la enfermedad del 41%. Los análisis de subgrupos pusieron de manifiesto que la respuesta al tratamiento fue independiente del número de líneas de QT previas, y la probabilidad de obtener una respuesta no se correlacionó con el grado de expresión de EGFR en el tumor. Sin embargo, la presencia y la intensidad de la toxicidad cutánea sí se asociaron con la eficacia clínica, observándose una tasa de respuesta, un tiempo hasta la progresión y una supervivencia significativamente mejores en los pacientes con una reacción cutánea más importante (grados 2 y 3) que en los pacientes sin reacción cutánea o un grado 1 en ambos grupos del estudio (96). Posteriormente se realizó otro ensayo

clínico con Cetuximab en monoterapia (IMCL CP02-9923) en pacientes que habían fracasado tanto a Irinotecán como a Oxaliplatino y Fluoropirimidinas. La tasa de respuestas fue independiente de si los pacientes habían fracasado primero a Irinotecán y posteriormente a Oxaliplatino o viceversa. En resumen, estos datos indican que Cetuximab puede revertir la resistencia del CCR metastásico a la QT citotóxica. Además no aumenta la toxicidad propia de la misma (97).

Ya se ha administrado en combinación con los regímenes de QT estándar como tratamiento de primera línea del CCR metastásico que expresan EGFR en cuatro ensayos clínicos de fase I/II. Se han comunicado un 47-76% de respuestas y con el esquema FOLFOX, hasta un 70% (98). Se ha alcanzado una reiterada y prometedora tasa de resecciones quirúrgicas del 24%, logrando de este modo la posibilidad de conseguir largos supervivientes y/o curaciones en una proporción importante de pacientes con CCR metastásico no seleccionado (98;99). Borner y cols., publicaron resultados preliminares de eficacia (respuestas parciales) de XELOX (30%) vs XELOX + Cetuximab (57%) (100). El grupo alemán AIO ha comunicado este año una tasa de respuestas de la combinación XELOX + Cetuximab del 71 vs un 41% de XELIRI + Cetuximab ($p=0.058$) (101). Es probable que a lo largo de este año conozcamos finalmente los resultados de un fase III (Crystal: FOLFIRI vs FOLFIRI + Cetuximab) y de un fase II (Opus: FOLFOX4 vs FOLFOX4 + Cetuximab) aleatorizado en primera línea de CCR metastático que permitirán establecer su papel de forma más adecuada.

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Es el único que por ahora tiene la aprobación en primera línea de tratamiento de CCR metastático en combinación con cualquier régimen que contenga 5-FU en base a estudios de fase III. Bevacizumab parece no ser activo en monoterapia. Su limitación más importante es que el estudio de fase III en el que se combinaba con CPT-11 era dentro de un régimen de 5-FU en bolo completamente abandonado (esquema IFL), tanto por su excesiva toxicidad como por su baja eficacia demostrada en estudios fase III previos (102). Son múltiples los datos sobre seguridad en el uso de Bevacizumab, tanto los que provienen de los estudios fase II y III, como de su uso expandido, que ha sido más frecuente con el esquema FOLFOX, a pesar de que no había datos que lo soportaran. Entre los efectos secundarios más relevantes destacan la aparición de fenómenos venosos o arteriales tromboembólicos, embolismo pulmonar, perforación, sangrado, hipertensión y retrasos en cicatrización, todos ellos con una incidencia muy baja pero a tener en cuenta.

Recientemente se ha completado un amplio estudio aleatorizado de fase III (ECOG 3200) en el que se compara Bevacizumab (10 mg/kg cada dos semanas), solo o en asociación con Oxaliplatino/5-FU/LV (FOLFOX-4), y FOLFOX-4 solo como tratamiento

de segunda línea tras el fracaso de IFL (103). Un análisis preliminar de la toxicidad indica que la adición de Bevacizumab no modifica sustancialmente la toxicidad de FOLFOX. La combinación se toleró bien, aunque se observó un aumento de la incidencia de hemorragia, tromboembolismos e hipertensión. Se esperan con interés los resultados en cuanto a eficacia. Hay datos preliminares de beneficios en supervivencia en el esquema FOLFOX en segunda línea de tratamiento, en pacientes refractarios a CPT-11 (104).

En cuanto a resultados de eficacia más recientes destacan los del estudio NO16966 y los del estudio TREE 2. El primero es un fase III comparando inicialmente XELOX vs FOLFOX4 y luego modificado incluyendo Bevacizumab o placebo en ambos brazos. La presentación un poco peculiar de los datos muestra (no hay datos sobre la tasa de respuestas) una SLP de siete meses y medio (XELOX) vs ocho meses y medio (FOLFOX4). En el caso de XELOX hay diferencias significativas en la SLP cuando se asocia Bevacizumab frente a placebo (9.3 vs 7.4; $p=0.0026$) pero curiosamente no las hay en el caso de FOLFOX4 (9.4 vs 8.6; $p=0.1871$). No se aportan datos de SG (105). En el análisis final de los estudios aleatorizados TREE 1 y TREE 2, la adición de Bevacizumab (TREE 2) incrementa las tasas de respuestas, la SLP y la SG cuando se asocia al esquema XELOX o FOLFOX frente a estos mismos esquemas sin Bevacizumab (TREE 1), pero sin que entre estos se aprecien diferencias significativas (TREE 2). Destaca en cualquier caso en el estudio TREE 2 una mediana de SG de 27 meses para el esquema XELOX y de 26 meses con el esquema FOLFOX (106).

Recientemente se han incorporado nuevos fármacos como Panitumumab, anticuerpo monoclonal IgG2 totalmente humano que se une con alta afinidad al EGFR. El bloqueo de la vía de señalización de EGFR en las células tumorales por Panitumumab determina no sólo la inhibición de la tirosina quinasa del receptor y la proliferación celular, sino también otros efectos que son críticos para la supervivencia tumoral, crecimiento y metástasis (107). En Septiembre de 2006 se obtuvo la aprobación por parte de la FDA de Panitumumab para el tratamiento de pacientes con CCR metastático (108). En Europa está pendiente de autorización de comercialización en la EMEA.

En cualquier caso dos son los resultados más visibles que se derivan de todas estas nuevas opciones y estrategias; el primero es que la SG se ha doblado, la SLP se acerca en algunos casos al año y las tasas de respuesta sobrepasan casi siempre el 50%. El segundo, más importante y que se deriva del primero, es que la filosofía con la que tratamos el CCR metastático ha pasado de ser puramente paliativa a potencialmente curativa en un número creciente de casos.

5. DETERMINANTES PRONÓSTICOS DEL CÁNCER COLORRECTAL

El pronóstico de un paciente afecto de CCR viene determinado por la situación evolutiva de su proceso, el tratamiento que reciba, el estado clínico que presente y la biología de su neoplasia. A pesar del desarrollo de la cirugía y de los tratamientos QRT, la SG al cabo de cinco años es, en términos medios, del 60%. Resulta fundamental analizar los factores pronósticos que informen sobre la evolución de la enfermedad, y los factores predictivos que lo hagan sobre la respuesta a los tratamientos, para con ello tratar mejor al enfermo.

Un estudio realizado por Moertel y cols. indica que tras la cirugía la supervivencia es tan sólo del 45% y aumentaba al 65% en aquellos pacientes que recibían QT adyuvante. Estos datos lo que indican es que cerca de la mitad de los pacientes que reciben tratamiento se hubieran curado sin él y que el 35% de los pacientes fallecen a pesar del mismo, sin poder realizar un pronóstico a priori de quiénes son los que realmente se beneficiarán (109). La identificación de subgrupos de pacientes con alto riesgo de recaída y el conocimiento de los factores predictivos de respuesta o de toxicidad puede permitir instaurar tratamientos de forma individualizada, tanto en estadios precoces como avanzados. El desarrollo de nuevas tecnologías moleculares de alto rendimiento permitirá caracterizar de forma precisa las huellas genéticas del tumor y del paciente. Estos datos facilitarán, previsiblemente, la identificación de factores pronósticos y predictivos individuales.

Ya hemos mencionado que el sistema de estadificación clínicopatológica o sistema TNM, componen el mejor indicador pronóstico. En el consenso del Colegio Americano de Patólogos del año 1999 se definieron cuatro categorías pronósticas. Categoría I: factores pronósticos demostrados, categoría IIA: factores pronósticos muy estudiados pero pendientes de validación, categoría IIB: factores prometedores pero insuficientemente estudiados, categoría III: factores apenas investigados, categoría IV: factores bien estudiados sin valor pronóstico. En sus resultados incluyeron en la categoría I: la extensión locorregional del tumor (pT, pN), la invasión sanguínea o linfática, el tumor residual tras cirugía con intención curativa, la afectación de los márgenes quirúrgicos y la elevación preoperatoria del antígeno carcinoembrionario (CEA), en la categoría IIA: el grado tumoral, los márgenes radiales y el tumor residual en las piezas tratadas preoperatoriamente, en la categoría IIB: el tipo histológico, el fenotipo asociado a MIS (respuesta linfoide del huesped, histologías mucinosa y medular), MSI de alto grado (MSI-H), LOH en el brazo largo del cromosoma 18 (18q) y la configuración de los bordes tumorales (infiltrantes versus exofíticos), en la categoría III: el contenido de ADN y otros marcadores moleculares no citados antes como la

invasión perineural, la densidad de microvasos, las proteínas y carbohidratos asociados a la célula tumoral, la fibrosis y la respuesta inflamatoria peritumoral, la diferenciación neuroendocrina focal y los índices proliferativos, en la categoría IV: el tamaño tumoral y la configuración global del tumor. El papel pronóstico de la mayoría de los factores genéticos y epigenéticos ha sido, por lo tanto, insuficientemente estudiado (110).

Los factores pronósticos de supervivencia en el CCR pueden evaluarse a partir de datos clínicos, biológicos y de respuesta al tratamiento.

5.1. Evaluación de datos clínicos

5.1.1. Estadificación de la enfermedad

Es la herramienta clínica de mayor utilidad pronóstica. Se obtiene combinando las técnicas de imagen convencionales con el estudio de la pieza quirúrgica. En la actualidad la clasificación TNM elaborada conjuntamente por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer, se considera de elección (UICC) (51) (Tabla 3). Debe destacarse como limitación de la estadificación la variabilidad inter-observador (entre patólogos) (111;112) particularmente en la identificación de un mínimo número de ganglios disecados: la TNM requiere al menos 12. En la tabla 4 se ilustra la relación entre la clasificación TNM y la supervivencia.

	SG a 5 años
Est I	>90%
Est II	60-80%
Est III	30-60%
Est IV	<5%

Tabla 4. Relación entre la estadificación tumoral y la supervivencia global, según series históricas

En series más recientes, con la incorporación de tratamientos adyuvantes se han comunicado supervivencias a los cinco años, de forma conjunta para los estadios IIA-IIIIC, del 58-70% (113). En la tabla 5 se incluyen las supervivencias alcanzadas con los primeros esquemas empleados en adyuvancia en CR (114-116). En el estadio IV los nuevos esquemas de QT como FOLFIRI o FOLFOX han logrado una supervivencia próximas a los 20 meses (89;117).

Tabla 5. Supervivencias alcanzadas con los primeros esquemas de adyuvancia en CR

Ensayo	Tratamiento	% SLE	% SG
GITSG 7175 (116)	Cirugía	47	43
	RT	55	56
	FU-MCCNU	55	52
INTERGROUP (66)	RT	43	47
	FU+MCCNU+RT	63 (significativo)	58 (significativo)
GITSG 7180 (113)	FU+MCCNU+RT	54	66 (3 años)
	FU+RT	68	75
INTERGROUP 86-47-51 (115)	FU IC+RT	63 (significativo)	70 (4años) (significativo)
	FU Bolo+RT	53	60

5.1.2. Calidad de la cirugía

La calidad de la cirugía repercute de forma contundente en el pronóstico del CCR. En el cáncer de colon las recidivas locales son excepcionales cuando los márgenes proximal y distal son mayores de cinco cm. (118). En las resecciones anteriores bajas de recto estos márgenes no son practicables por razones anatómicas y se considera necesario dejar al menos un cm para evitar tasas elevadas de recaídas. De forma particular en el CR medio e inferior, la adecuada ETM logra reducir la tasa de recidivas locales en cirugías con intención curativa a menos del 7% y con una tendencia a mejorar la supervivencia en el grupo con ETM aún en ausencia de un tratamiento complementario a la cirugía (119).

La importancia de la ETM vuelve a ponerse de manifiesto en una reciente publicación en la que se señala que los pacientes con CR inferior tratados con resección abdomino-perineal tienen peor pronóstico que los pacientes a los que se realiza una resección anterior baja, con una mayor tasa de recidivas locales y una supervivencia menor; ello se debe a la elevada frecuencia de afectación circunferencial y perforación que se produce con esta técnica quirúrgica, lo que recomienda la modificación de esta técnica o la utilización de QRT (120). En este contexto es determinante la ausencia de afectación de márgenes radiales (64). Los análisis multivariantes de numerosos estudios han sugerido que la afectación de márgenes circunferenciales es el factor pronóstico más importante de recidiva local, relacionándose también con la aparición de metástasis a distancia. Representa el margen de tejido blando peritoneal o retroperitoneal más cercano al tumor. Se considera que por debajo de un milímetro de margen radial el riesgo de recidiva es alto y es el mínimo recomendado. Los resultados de un estudio alemán comparativo en neoadyuvancia con RT y ETM versus ETM sugieren la necesidad de un margen radial mayor de dos milímetros, al encontrar recaídas hasta seis veces mayores (38% vs 6%) cuando los márgenes se sitúan en menos de un milímetro o más de dos milímetros, respectivamente (121). Por el momento se sigue recomendando que sea de un milímetro.

5.1.3. Localización tumoral

El CR tiene un pronóstico algo peor que el cáncer de colon si bien por encima de la reflexión peritoneal llegan a igualarse. En el caso concreto del cáncer de colon no está claro que existan diferencias pronósticas según la localización más o menos proximal (122;123). En relación con la localización de las metástasis, las pulmonares parecen ser más resistentes al tratamiento quimioterápico que las hepáticas y particularmente refractarias son las metástasis peritoneales (124).

5.1.4. Edad

Los pacientes jóvenes presentan supervivencias más cortas por la mayor frecuencia de tumores mucinosos, de comportamiento agresivo que suelen detectarse en estadios avanzados. A igualdad de estadio no existen diferencias en supervivencia respecto a los pacientes mayores (125). En los ancianos parece ser más frecuente la invasión locorregional de los tumores sin que ello se traduzca en un comportamiento menos agresivo de la enfermedad (126).

5.1.5. Sexo

Es más frecuente que las mujeres experimenten toxicidades graves con los tratamientos basados en 5-FU, particularmente en bolus (127).

5.1.6. Síntomas y estado general

El deterioro del estado general y la historia de síntomas previos al diagnóstico, incluida la pérdida de peso, parecen comportar un peor pronóstico (123;128). No se ha atribuido valor pronóstico a la duración de los síntomas (129). Existe amplia evidencia de que la obstrucción y, en menor grado, la perforación se asocian a un peor pronóstico hasta el punto de considerarse relevantes para la indicación de tratamiento adyuvante en estadios II en la práctica clínica, sin que esta conducta se haya validado aún prospectivamente (130).

5.1.7. Transfusiones previas

La necesidad de transfusiones durante el perioperatorio del tumor primario o de las metástasis se ha asociado con un peor pronóstico que incide particularmente en el periodo post-operatorio, lo que traduce cirugías de mayor morbi-mortalidad y estadios más avanzados de la enfermedad (131;132).

5.1.8. Cifra de plaquetas

No se ha podido demostrar una relación pronóstica entre la cifra de plaquetas, y la presencia en el interior de sus gránulos de VEGF, y el fenómeno de angiogénesis (133).

5.2. Evaluación de datos biológicos

5.2.1. Análisis patológico del tumor

5.2.1.1. Tamaño y morfología tumoral

El tamaño tumoral carece de valor pronóstico (110). Los tumores exofíticos son menos propensos a la diseminación que los ulcerados y se han asociado a supervivencias más largas en estudios multivariantes (134).

5.2.1.2. Parámetros de invasión local

5.2.1.2.1. Invasión locorregional. Clasificación R: La clasificación R o de tumor residual, definida por la AJCC/UICC en 1997 (R0: no tumor residual; R1: tumor residual microscópico; R2: tumor residual macroscópico), ha demostrado que la presencia de células tumorales malignas en los márgenes de resección debe ser considerada equivalente de enfermedad residual y es un importante factor pronóstico adverso validado (135). La determinación de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante también parece asociar un peor pronóstico (136;137). En esta situación no es un factor validado suficientemente, no se puede definir en función suya grupos de riesgo en los que basar la administración de tratamientos post-quirúrgicos tras una inducción (138).

De la importancia de la T y la N ya se han mencionado los datos más relevantes. Algunos grupos no han encontrado diferencias pronósticas si se realiza una resección en bloque de los órganos afectados. Diversos estudios multivariante han demostrado que la penetración en peritoneo visceral es un factor pronóstico independiente. En la definición de situaciones T4 con afectación peritoneal local, la presencia de células tumorales libres en la superficie peritoneal predice particularmente la recurrencia intraperitoneal. La existencia de focos tumorales en la mucosa o submucosa del intestino adyacente (“lesiones satélites”) no se considera enfermedad M1. Se ha denominado “brote” tumoral o “desdiferenciación focal” (*tumour budding*) a la presencia de focos de células cancerosas inmediatas al frente invasivo del tumor. Este hallazgo, pendiente de validación, podría tener un elevado poder pronóstico de afectación nodal. La presencia de nódulos patológicos en la vecindad del tumor ha planteado conflictos en cuanto a la naturaleza de éstos. Sin presencia de tejido

linfático residual no es posible definir que se trate de un ganglio, por lo que la actual clasificación TNM considera que un nódulo tumoral mayor de tres milímetros de diámetro en el tejido adiposo pericólico o perirrectal se clasifique como metástasis en ganglio linfático regional. Un nódulo tumoral de tres milímetros o menos de diámetro, se clasifica en la categoría T como extensión no contigua, o sea, T3 (51). La invasión perineural se asocia a una mayor tasa de recidivas locales ha demostrado valor pronóstico adverso en diferentes estudios multivariantes, no así la fibrosis peritumoral (139).

5.2.1.2.2. Afectación ganglionar: Es un factor pronóstico adverso de primer orden, tan sólo por detrás de las metástasis a distancia. Cuanto mayor es el número de ganglios afectados peor es el pronóstico de la enfermedad. No existe uniformidad respecto al número preciso de ganglios que deba utilizarse como factor pronóstico, aunque el punto de corte en la clasificación TNM se ha situado en cuatro (140).

El estudio ganglionar mediante inmunohistoquímica (IHQ) o RT-PCR frente a citoqueratinas u otros marcadores tumorales como CEA, MAGE o c-Met puede detectar enfermedad residual en más de un 30% ganglios negativos tras el estudio convencional (141). Para este propósito también se están realizando estudios moleculares del ganglio centinela. Sin embargo estos parámetros no han sido aún validados y no se ha demostrado su utilidad pronóstica (142). La presencia de micrometástasis ganglionares (tumor menor de dos milímetros o detectado por análisis molecular) ha mostrado significado pronóstico sólo en algunos estudios y requiere de una validación definitiva; mientras tanto, las micrometástasis deben asignarse como pN1. Otro aspecto no validado, aunque de potencial importancia, es el tamaño ganglionar ya que el estudio de los ganglios de mayor tamaño podría hacer innecesario el análisis de los 12 recomendados (143). La ecoendoscopia puede determinar mejor la afectación ganglionar, en función del tamaño y las características ecográficas, que la TAC al poder existir infiltración en ganglios menores de cinco milímetros. La RMN puede ser una técnica prometedora, sobre todo con la utilización de contraste como el USPIO (144).

5.2.1.2.3. Afectación vascular: La invasión vascular linfática y sanguínea venosa se ha relacionado, respectivamente, con una mayor incidencia de metástasis ganglionares y hepáticas. Sin embargo, su valor pronóstico ha sido cuestionado por la diversidad metodológica en su valoración.

5.2.1.3. Características histopatológicas de la célula tumoral

Dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO), la mayoría de los tipos histológicos no tienen importancia pronóstica. Las únicas excepciones son el carcinoma de células en anillo de sello y el de células pequeñas, estirpes de mal pronóstico y el carcinoma medular con pronóstico favorable.

La producción de mucina o coloide se ha sugerido típicamente como un factor pronóstico adverso (145). Sin embargo, tal conclusión se ha basado en estudios univariantes. El único estudio multivariante disponible se realizó en pacientes que debutaron con obstrucción intestinal, de por sí un claro factor pronóstico adverso (146). La forma clínica más común es aquella en que la mucina se deposita en el espacio extracelular. Estos tumores mucinosos se presentan con mayor frecuencia en recto y sigma. Son más comunes en pacientes jóvenes, como sucede en el HNPCC, y son más agresivos que los adenocarcinomas clásicos (145). Probablemente sólo los tumores mucinosos con MSI tengan mejor pronóstico. La MSI es un factor que se presenta con mayor frecuencia relativa en tumores mucinosos. Los tumores de células en anillo de sello, en los que la mucina se acumula en el compartimento intracelular, aunque muy poco frecuentes (1-2%) son particularmente agresivos y diseminan precozmente al peritoneo. Sin embargo, debe señalarse que no todos los estudios han encontrado un peor pronóstico particularmente si se considera el estadio de la enfermedad (147).

Los carcinomas de células pequeñas son de peor pronóstico pero no se ha demostrado que la diferenciación neuroendocrina tenga impacto negativo sobre la supervivencia.

Tradicionalmente, los tumores escirros se han asociado con peor pronóstico que el adenocarcinoma clásico, pero no existen datos claros al respecto.

Recientemente ha sido reconocido por la WHO la entidad de carcinoma medular, una forma histológica poco frecuente de tumores que antes se clasificaban como carcinomas indiferenciados, que no forman estructuras glandulares y presentan un patrón de crecimiento sólido acompañado de infiltración linfocitaria. El carcinoma medular se asocia con MSI, disfunción de genes reparadores del ADN y, clínicamente, con HNPCC y un mejor pronóstico (148).

Finalmente, existen evidencias en estudios multivariantes de la relación entre el grado de diferenciación (referido al peor patrón, no el predominante) y el pronóstico de la enfermedad. Las evidencias son claras cuando se comparan tumores de alto y bajo grado de diferenciación, pero subclasificaciones más precisas en los grados presentan gran variabilidad interobservador.

5.2.1.3.1. Respuesta linfoide frente al tumor: Son múltiples los estudios multivariantes que han encontrado un pronóstico favorable en los tumores que presentan infiltración linfoide tumoral o peritumoral (110). No obstante, existe controversia por lo que necesita de estudios confirmatorios. La infiltración masiva por linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) es un hallazgo asociado a MSI y, probablemente por este motivo, se asocie a mejor pronóstico (69). Ya se ha mencionado que es un aspecto típico de los carcinomas medulares.

5.2.2. Biología tumoral

5.2.2.1. Ciclo, crecimiento y diferenciación celular

5.2.2.1.1. Proliferación celular: Para el estudio de la proliferación celular la mayoría de los trabajos han utilizado técnicas de IHQ, que permiten de forma sencilla determinar diversos marcadores. Las principales dianas investigadas han sido PCNA (*Proliferating Cells Nuclear Antigen*), Ki-67 y su epítipo Mib-1. PCNA es una ADN polimerasa asociada a ciclina D y a quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), máximamente elevada al final de G1 y durante la fase S. Ki-67 y Mib-1 se expresan en todas las fases celulares salvo en G0. De los estudios que han abordado estos marcadores, particularmente en estadios II y III, no existe evidencia clara de su capacidad pronóstica en los que han incluido mayor número de pacientes (149;150). De forma interesante, sí se ha relacionado que, tras el tratamiento con QRT del CR, el cambio en la expresión de Ki-67, en el sentido de aumento dinámico en su expresión, ofrece mejor pronóstico (151).

5.2.2.1.2. Genes supresores y proto-oncogenes: La función de la proteína supresora p53, cuyo gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, se altera tardíamente en más de la mitad de los casos de CCR (152). La estabilización de su expresión ante respuestas normales a un error genético o como resultado de mutaciones permite su detección mediante IHQ. En CCR, la IHQ es positiva y las mutaciones detectables en el 50% y 45% de los casos, respectivamente. La concordancia entre la positividad por IHQ y el hallazgo de mutaciones es deficiente. Se estima que la correlación es del 70% (153). Son pocos los estudios en los que las mutaciones han mostrado valor pronóstico en el análisis multivariante. Los dos estudios más largos que han investigado el estado mutacional y la sobre-expresión de p53 no han encontrado asociación pronóstica (154;155). Sin embargo, mutaciones específicas, en particular las presentes en el dominio de unión al cinc L3, sí parecen tener valor pronóstico (156). Se ha sugerido que el estudio de mutaciones en p53 en ADN circulante o la cuantificación de ARNm podrían servir como marcadores

pronósticos alternativos (157). Menos reproducibles aún son los datos que correlacionan alteraciones de p53 con el estadio de la enfermedad o la presencia de metástasis hepáticas (158).

Uno de los efectores de p53, el inhibidor de CDKs p21^{WAF/CIP1}, tendría importancia pronóstica cuando se mide su expresión dinámicamente tras el tratamiento QRT, como ocurre con Ki-67. En este caso, la disminución en su expresión se ha asociado a una mayor SLE (151).

Bcl-2 es un proto-oncogen inhibidor de la apoptosis. La expresión de Bcl-2 podría ser un factor predictivo de respuesta a 5-FU si bien no confirmado en todos los trabajos (159;160).

La evaluación simultánea de ambos factores, p53 y Bcl-2, no ha demostrado valor predictivo a la respuesta a 5-FU en pacientes con CCR avanzado (161-163).

5.2.2.1.3. Timidilato Sintetasa (TS)

a) TS como factor pronóstico de supervivencia. TS es un enzima limitante para la síntesis de timidina, y por tanto de ADN, que aumenta notablemente en la fase S del ciclo celular asociándose a proliferación celular. TS cataboliza el paso de desoxiuridilato monofosfato (dUMP) a desoxitimidín monofosfato (dTMP). La expresión de TS se ha relacionado con el pronóstico de la enfermedad y con la respuesta a 5-FU. Aún no está claramente definido cuál es el mejor método para su determinación: si IHQ o RT-PCR. Aquí La principal objeción a la evaluación por IHQ es la gran variabilidad en los distintos trabajos con porcentajes de sobre-expresión que oscilan entre el 19 y el 76% de los tumorales, en las diversas series. La evaluación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa es más precisa pero no exenta de limitaciones como la variable proporción de células tumorales en las muestras, que interfieren en los resultados, y su cuantificación relativa a genes *house-keeping* (164).

Hay datos que indican que la expresión medida en el tumor primario es distinta que en las metástasis (165); se han descrito mayores niveles en las metástasis hepáticas que en el primario (124), en las metástasis que en las hepáticas y en las linfáticas que en las hepáticas (166).

En la mayoría de los estudios que se han publicado incluyendo más de 400 enfermos, la sobre-expresión de TS intratumoral se ha relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad, con independencia del estadio. Sin embargo, algunos de los trabajos más recientes, también con un elevado número de casos, no han podido confirmarlo (149;167).

b) TS como factor predictivo de respuesta. El esquema de administración de 5-FU determina su mecanismo dominante de acción. En infusión continua su efecto se ejerce principalmente alterando la síntesis de ADN, en la fase S del ciclo celular, a través de la inhibición de TS. El metabolito activo de 5-FU, 5-flúor-2'-desoxiuridina monofosfato (5-FdUMP), compete en dicha reacción formando un complejo ternario con TS y metilen-tetrahidrofolato, que puede generarse a través del aporte de ácido folínico, inhibiendo el proceso. La infusión en bolus ejerce un efecto citotóxico ciclo-independiente debido a la incorporación de 5-flúor-uridilato trifosfato (5-FUTP) como falso metabolito al ARN. Algunos autores han encontrado una relación inversa entre los niveles de TS y la respuesta a 5-FU, y mayor supervivencia en adyuvancia, cuando 5-FU se utiliza en administración continua y no en bolus (168). In vitro se ha demostrado que los niveles elevados de TS se asocian a resistencia a fluorpirimidinas y que la administración de éstas determina un aumento en su expresión como mecanismo de resistencia adquirido (169;170). La investigación de estos fenómenos in vivo es más confusa.

Parece claro que los niveles elevados de TS en las metástasis predicen refractariedad a inhibidores de TS (162;171). Sin embargo, cuando el sustrato analizado es el tumor primario, la relación entre la expresión de TS en el primario y la respuesta al tratamiento es controvertida, tanto en adyuvancia como en enfermedad diseminada (165;172). El empleo de TS como factor predictivo único para la selección de tratamiento adyuvante o de enfermedad diseminada requiere validación en estudios prospectivos aleatorizados (173).

De interés parecen los datos sobre el papel predictivo de respuesta del análisis de los polimorfismos del promotor de TS. En pacientes afectados de cáncer de colon homocigotos para triples repeticiones (3R/3R), Elsaleh y cols. no encontraron beneficio del tratamiento con 5-FU adyuvante, y sí en homocigotos para dobles repeticiones (2R/2R) y heterocigotos (2R/3R) pudiendo representar un mecanismo de resistencia intrínseco (174). Similares conclusiones fueron obtenidas respecto a la probabilidad de infraestadificación tras el tratamiento neoadyuvante en CR (175) y en pacientes con CCR avanzado que recibieron tratamiento con Capecitabina (176).

5.2.2.1.4. TGF: El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) posee, como factor de crecimiento, capacidad de regular la proliferación y el crecimiento celular. La evidencia disponible sugiere que se trata de un factor pronóstico adverso independiente de otras variables clásicas (177). La disminución en la expresión del factor de crecimiento transformante α (TGF- α), por IHQ, también se ha sugerido que puede tener valor pronóstico adverso (178).

5.2.2.1.5. p27: La proteína p27/kip1 es un inhibidor de CDKs que regula la progresión a través del ciclo celular. Si bien hay algún trabajo discordante, un número amplio de estudios retrospectivos han mostrado que la disminución en la expresión de p27, a nivel de proteína o mensajero, se asocian a menores supervivencias (179;180).

5.2.2.2. Transducción de señales

5.2.2.2.1. K-ras: La proteína K-ras desempeña un papel importante en la transducción de señales de crecimiento y proliferación. Las mutaciones activadoras de K-ras se han encontrado en un 20-40% de los pacientes con CCR y es una alteración temprana que sucede en el paso de adenoma precoz a tardío. El 80% de las mutaciones oncogénicas que se han detectado se han localizado en los codones 12 y 13. Las mutaciones activadoras han demostrado un valor pronóstico adverso en cuatro de los cinco estudios más importantes (152). El mayor de ellos, el estudio RASCAL encontró un valor pronóstico independiente asociado a mutaciones específicas (181). Particularmente, el cambio de glicina a valina en el codon 12, que sucedía en el 10% de los pacientes, comportaba un peor pronóstico. El análisis por subgrupos mostraba que el valor pronóstico se perdía en los estadios B2 (pT3N0). Este estudio concluye que no tiene interés el estudio global del estado mutacional, como algunos autores sugieren. La coexistencia de mutaciones en p53 sólo ha demostrado un peor pronóstico en unos pocos de los estudios que han abordado esta hipótesis (182). El estudio mutacional de K-ras en ADN circulante y en ganglios linfáticos locorreionales podría servir para seleccionar grupos de riesgo entre pacientes en estadios II (183;184). Apenas existe información pronóstica de la proteína ras/p21 a través de IHQ.

5.2.2.2.2. Familia de receptores HER: Se trata de una subfamilia de receptores con actividad tirosin-quinasa, con un papel todavía mal conocido en CCR. HER2, codificado por el proto-oncogen c-erbB-2, se expresa en un 20-40% de los tumores colorrectales. No existen evidencias claras de su papel pronóstico (185). Igual sucede con EGFR (HER-1), cuya expresión se ha detectado en un 50-70% (186). Su expresión en el tumor primario no se correlaciona con la expresión en las metástasis (187). La expresión de EGFR en CR se asocia a resistencia al tratamiento RT preoperatorio (188) pero no se ha encontrado asociación pronóstica con supervivencia en otros estudios en CCR (189). Recientemente ha sido publicado un estudio con QRT neoadyuvante en CR en el que la expresión de EGFR, medida por IHQ, se relacionaba con un aumento en la SLE, no así con la SG. Se necesitan más trabajos que validen la

posible interacción de los tratamientos neoadyuvantes con la expresión de EGFR (190). Se empieza a analizar si determinados polimorfismos en el gen del EGFR condicionarán una mayor sensibilidad a la QRT en los pacientes con CR (191).

5.2.2.3. Apoptosis´

El desequilibrio en los heterodímeros Bcl-2/Bax (antiapoptótico/apoptótico), por aumento del primero o disminución del segundo se ha asociado a un pronóstico adverso, pero existe escasa información al respecto (151;189).

5.2.2.4. Angiogénesis

Toda proliferación tumoral de más de dos milímetros requiere del desarrollo de nuevos vasos que le proporcione oxígeno y nutrientes, proceso conocido como angiogénesis. Es el principio de la diseminación tumoral a distancia a través de un riguroso equilibrio entre la activación de factores proangiogénicos y la represión de mediadores antiangiogénicos. La angiogénesis puede analizarse a través de la densidad vascular en el tumor (mediante recuento de células endoteliales marcadas con anticuerpos frente a factor VIII, CD31 u otros marcadores) y de la valoración de otras moléculas reguladoras del proceso, entre las que VEGF ha sido la más investigada. Algunos autores han encontrado peores supervivencias en pacientes con mayor densidad de microvasos o aumento en la expresión de VEGF, pero los resultados son contradictorios (192;193). La enzima TP es una molécula proangiogénica, al estar involucrada en el metabolismo de fluorpirimidinas se hablará de ella en el apartado correspondiente.

5.2.2.5. Invasividad y metástasis

5.2.2.5.1. CEA: En el epitelio colónico normal se encuentra una co-expresión de miembros de la familia CEA, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En el CCR existe un cambio, respecto al tejido normal, en el perfil de expresión de algunos de aquellos miembros, que pueden hallarse incluso suprimidos. La determinación de CEA en sangre guarda relación con la masa tumoral. Estudios retrospectivos y alguno prospectivo han sugerido que niveles preoperatorios elevados de CEA asocian un peor pronóstico (194;194;195). Sin embargo, no existen evidencias sobre el beneficio de administrar tratamiento adyuvante a estos enfermos. Para algunos autores cuando se considera el estadio desaparece la asociación pronóstica (196).

En el seguimiento de la enfermedad, la elevación sérica de CEA tras la cirugía del tumor primario o de las metástasis hepáticas es un factor de mal pronóstico de la

recidiva. La monitorización seriada con CEA ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 80 y 70%, respectivamente, en la detección de la recidiva local y metastásica (197). La sensibilidad parece máxima para la detección de las metástasis hepáticas (cercana al 100%, frente a un 60% en el diagnóstico de las recidivas loco-regionales). Los meta-análisis han demostrado que la monitorización del CEA postquirúrgico mejora la supervivencia de los enfermos (197). Aunque sean datos de estudios retrospectivos, la disminución de los niveles de CEA en pacientes en tratamiento QT se ha asociado a respuesta a dichos tratamientos (198).

5.2.2.5.2. DCC/18q: El gen DCC se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 y codifica una proteína transmembrana homóloga a moléculas de adhesión, con probable regulación de funciones de proliferación, diferenciación e invasividad. Su expresión se halla disminuida en CCR y la LOH en 18q21 ocurre hasta en cerca del 70% de los tumores, habiéndose propuesto un papel supresor. Sin embargo, esta función ha sido recientemente cuestionada, pues es rara la inactivación del segundo alelo y los modelos *knock-out* no han mostrado una mayor propensión al desarrollo de tumores (199). Más aún, otros genes con posibles funciones supresoras se encuentran próximos en 18q21 y podrían ser los responsables de la oncogénesis secundaria a las deleciones en 18q. Los resultados del papel pronóstico independiente para las LOH-18q o para la pérdida de expresión de la proteína DCC en estadio II, con supervivencias similares a los estadios III, son contradictorios (200-202). Son necesarios estudios prospectivos que validen este marcador.

5.2.2.5.3. Moléculas relacionadas con el plasminógeno: Se trata de un destacado grupo de moléculas de las que se está tratando de discriminar cuáles son las de mayor valor pronóstico. Diversos estudios han encontrado peores supervivencias en pacientes con sobre-expresión de los activadores (tisular y tipo uroquinasa, tPA y uPA respectivamente) del plasminógeno, o de otras moléculas relacionadas, como el receptor de uPA (uPAR) o el plasminógeno, en estadios localizados de CCR (203;204). En el estudio más amplio publicado los niveles séricos preoperatorios de uPAR se asociaban a menor SG (205). No hay evidencias sobre su capacidad predictiva de respuesta a los tratamientos.

5.2.2.5.4. MMPs: Las MMPs componen una familia de hasta 15 miembros. No existen estudios confirmatorios de su valor pronóstico (206-208). Se ha sugerido que los niveles preoperatorios elevados de TIMP-1, una glicoproteína inhibidora de MMPs, se asocia a supervivencias más cortas (209).

5.2.2.6. Ploidía tumoral

La aneuploidía es un fenómeno que aumenta en el CCR de forma paralela al estadio de la enfermedad. La mayoría de los estudios han demostrado que es un factor pronóstico adverso con carácter independiente, aunque no de primer orden (210;211).

5.2.2.7. MSI

El HNPCC y un 15% de los CCR esporádicos se caracterizan por alteraciones en los genes MMR habitualmente debidas a mutaciones y metilación de promotores, respectivamente. La pérdida de la función reparadora induce mutaciones en el ADN microsatélite (fenotipo MSI) y secundariamente alteraciones en otros importantes genes implicados en la tumorigénesis del CCR. La MSI se define a través de un panel consenso de cinco marcadores mono y dinucleotídicos. La inestabilidad en dos o más de los mismos se considera alta (MSI-H); en uno, baja (MSI-L); y en ninguno, ausente o estable (MSS). El examen de estos marcadores moleculares es de particular interés pronóstico, pues los tumores HNPCC, que se presentan habitualmente en pacientes jóvenes, múltiples, pobremente diferenciados, mucinosos, se comportan, paradójicamente dada la histología, con menor agresividad (212). La MSI de los tumores esporádicos, que es menos frecuente en términos relativos pero más abundante en cifras absolutas de pacientes, también se ha asociado a un mejor pronóstico. Ello es así al menos en los subgrupos de pacientes jóvenes y en estadios II y III de la enfermedad (213;214). La metilación de ADN es responsable de la mayoría de los casos de MSI presente en los tumores CCR esporádicos y, sin embargo, más de la mitad de los tumores que presentan metilación difusa de islas CpG son tumores MSS. Parece que los tumores con metilación de ADN se asocian a un peor pronóstico, pero cuando en estos se añade un fenotipo MSI, desaparece el pronóstico adverso, como si hubiera quedado compensado (214). En síntesis, el fenotipo MSI-H conferiría un pronóstico favorable incluso en pacientes con un factor pronóstico negativo como parece ser el fenotipo metilador. Pese a que es un parámetro por validar, el fenotipo metilador podría ser un factor independiente de supervivencia asociado a respuesta a 5-FU (215). Recientemente se ha confirmado que los pacientes con MSI-H presentan un mejor pronóstico que aquéllos con MSI-L o MSS, pero además entre los que reciben tratamiento adyuvante basado en 5-FU y exhiben genotipo tumoral MSI-H no se deriva beneficio de dicha terapia. Sí lo obtuvieron los pacientes MSS y MSI-L (216). No obstante, son necesarios más estudios para definir el posible beneficio de la QT adyuvante en pacientes con tumores

localmente avanzados y fenotipo MSI (217). El papel de la MSI en la enfermedad avanzada está menos estudiado.

5.2.2.8. Otros marcadores

Algunos estudios han sugerido que la elevación preoperatoria de CA19.9 tendría un valor pronóstico adverso (197). Existen datos similares sobre el antígeno CA242 (218).

5.3. Farmacogenética y evaluación de tratamientos

En un paciente con CCR diseminado la probabilidad de respuesta a una primera línea de tratamiento de combinación de citostáticos es superior al 50%. Los pacientes que responden se benefician de modo individual en una mejor supervivencia, que ya hemos descrito que en la actualidad alcanza los 18-20 meses. Las probabilidades de respuesta, supervivencia y tiempo medio a progresión dependen del tratamiento empleado (219). La administración de una segunda línea de tratamiento también ofrece la posibilidad de nuevas respuestas y mejoría en supervivencia (220). Las probabilidades de respuesta a líneas sucesivas son mayores cuando hubo sensibilidad a tratamientos previos y viceversa, la refractariedad es factor pronóstico de una menor tasa de respuestas debido al desarrollo de resistencias cruzadas. En este contexto, desconocemos cuáles son las secuencias y duraciones óptimas de las pautas de tratamiento, por lo que la identificación de factores predictivos de respuesta y toxicidad es del máximo interés. Algunos factores moleculares predictivos de respuesta se han mencionado ya por su posible papel pronóstico en supervivencia. En la tabla 6 se resumen los principales factores moleculares utilizados en la respuesta a los diferentes quimioterápicos implicados en el tratamiento del CCR (221).

Tabla 6. Principales factores moleculares predictivos de respuesta a diferentes quimioterápicos en CCR

Agentes QT	FP de respuesta	FP de respuesta en estudio
5-FU	Niveles TS, polimorfismos promotor TS, expresión TP, expresión DPD, MSI	Niveles E2F-1, expresión gen p53, expresión gen Bcl-2, fenotipo metilador
Capecitabina	Niveles TS, TP, DPD	
Raltitrexed	Niveles TS	
Irinotecán	Expresión gen Topo I	Genes implicados en apoptosis (PARP, genes implicados en reparación ADN (p53, fenotipo metilador, mutaciones NFκβ)
Oxaliplatino	Expresión gen ERCC-1, ERCC-2 (XPD), polimorfismos XRCC-1 (sustitución Arg399Gln en exon 10)	

TS: timidilato sintetasa, TP: timidín fosforilasa, DPD: dihidropirimidín deshidrogenasa, MSI: inestabilidad de microsatélites, PARP: poli (ADP-ribosa) polimerasa, ERCC-1: *excision repair cross-complementing group*, XPD: *xeroderma pigmentosum group D gene*, XRCC-1: *X-ray cross-complementing group 1 gene*

A continuación se detallan otros factores moleculares principalmente involucrados en el terreno de la farmacogenética y farmacodinámica del CCR.

5.3.1. Factores predictivos de respuesta/toxicidad a 5-FU y otras fluorpirimidinas

Los factores que a continuación se mencionan además de ser factores predictivos en relación con 5-FU, deben ser considerados como tales en terapias con otras fluorpirimidinas como Capecitabina o Tegafur. Se ha detallado previamente el papel de la enzima TS. En la tabla 7 se menciona el nivel de evidencia que tienen estos factores (221).

Tabla 7. Factores predictivos de respuesta al tratamiento con 5-FU

	Nivel de evidencia
IHQ negativa o baja expresión de ARNm de TS	I
Polimorfismos 3R/3R en promotor de TS	I
IHQ negativa o baja expresión de ARNm de DPD	II
IHQ negativa o baja expresión de ARNm de TP	II
p53 nativa o IHQ negativa	II
IHQ positiva o sobreexpresión de BCL-2	II
MSI positiva o IHQ negativa para hMLH1 ó hMLH2	II

5.3.1.1. TP. Otros activadores de 5-FU

TP, conocido como factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas-like (PDGF-like) por sus propiedades angiogénicas, es un enzima con la propiedad mencionada y estimulador del crecimiento tumoral. Se halla involucrado en la activación, a través de fosforilación, de 5-FU en sus metabolitos activos. Su expresión

ha sido inversamente relacionada con la supervivencia en CCR avanzado en estudios retrospectivos (222). Otros trabajos han encontrado una asociación entre los niveles reducidos de TP tumoral (midiendo expresión de ARNm o proteína por IHQ) y respuesta a 5-FU (223;224). Sin embargo hay estudios contradictorios y faltan estudios prospectivos. Otros enzimas involucrados en la activación por fosforilación de 5-FU, a través de otras rutas, son la fosforilasa del ácido orótico (orotato-fosforibosil-transferasa u OPRT-asa) y la uridín-fosforilasa (UP o UMPK). Datos preliminares sugieren que la disminución en la expresión o actividad de OPRT podría tener valor predictivo de resistencia a 5-FU (225;226).

Capecitabina se convierte en 5-FU en el interior de la propia célula tumoral por la acción de la TP intratumoral. La falta de TP se asocia con menor nivel de 5-FU intracelular y, consecuentemente, una menor respuesta (227).

5.3.1.2. DPD

El 80-90% de 5-FU se cataboliza a través de la enzima DPD, que además interviene en la absorción intestinal del mismo. Por ello, la variabilidad en dicho enzima es uno de los factores más importantes que determinan la distinta exposición tisular a FdUMP y los efectos secundarios de 5-FU. Numerosos trabajos han estudiado los niveles de expresión de DPD intratumoral y su actividad enzimática, tratando de correlacionar dichos parámetros con pronóstico, predicción de respuesta a 5-FU y toxicidad a éste. De forma general, se trata de un parámetro que, como otros, necesita validación prospectiva. La baja actividad de DPD intratumoral se asocia a una mayor tasa de respuestas a 5-FU in vitro y en xenoinjertos (166;228). Estos hallazgos preclínicos se encuentran en concordancia con el hallazgo de que el nivel de expresión de DPD en muestras tumorales de pacientes se relaciona con la tasa de respuestas a 5-FU. Los niveles bajos de ARNm de DPD en el tumor se asocian con disminución en el tiempo de recaída tras la adyuvancia basada en 5-FU, particularmente en los casos con aumento en la expresión de TS (229). Especialmente destacado es el estudio de Salonga y cols. en el que el 100% de los pacientes que presentaban represión conjunta de DPD, TS y TP (evaluado por PCR cuantitativa) presentaban respuesta a 5-FU, asociado a una mayor supervivencia, frente a un 0% de los pacientes con niveles elevados (230). Resultados parecidos han sido publicados por otros autores (166;231).

En lo que se refiere a la toxicidad de 5-FU, diversos autores la han relacionado con la actividad de DPD en células mononucleadas en sangre periférica. La disminución de la actividad de DPD puede asociarse a niveles séricos excesivos de 5-FU que condicionan toxicidades inesperadas (232). Se han identificado mutaciones puntuales

en el gen de DPD asociadas con menor actividad enzimática y, por tanto, mayor toxicidad por 5-FU (233;234). No obstante, la actividad de DPD está sujeta a notables variaciones, incluso circadianas, dependiente también del porcentaje de monocitos circulantes, y una actividad normal no descarta la posibilidad de toxicidades graves (235).

5.3.2. Factores predictivos de respuesta/toxicidad a Raltitrexed

Es un inhibidor específico de TS, si bien posee un mecanismo de acción y un perfil de toxicidad diferente a 5-FU. Ello no impide que niveles elevados de TS tanto en el tumor como en las metástasis sea un factor predictivo negativo de respuesta igual que sucede con 5-FU (236). El aumento de TP se relaciona directamente con la tasa de respuesta a Raltitrexed. La explicación deriva de la imposibilidad de supervivencia celular a la ausencia de timidina tras la inhibición colateral de TS (237). Algún estudio con pocos pacientes no encontró relación entre la expresión por IHQ de DPD y la respuesta a Raltitrexed (238). El nivel de expresión génica de DPD tampoco parece influir en el tipo de respuesta a Raltitrexed.

5.3.3. Factores predictivos de respuesta/toxicidad a Irinotecán

Irinotecán es un análogo semisintético de las camptotecinas con actividad antitumoral a través de la inhibición de la topoisomerasa I. Basándonos en datos clínicos y preclínicos, los determinantes de respuesta a Irinotecan son la topoisomerasa I, genes implicados en apoptosis y en la reparación del ADN. Los pacientes respondedores parecen tener una mayor expresión del gen topoisomerasa I que favorecería la acción de sus inhibidores. Un aumento en los niveles de ARNm de topoisomerasa I podría ser un factor predictivo de respuesta, si bien se requieren más estudios que lo avalen suficientemente (239). Irinotecán se metaboliza en el hígado a diversos metabolitos. La escisión de la molécula por enzimas con actividad carboxilesterasa libera SN-38, metabolito con actividad citotóxica dos o tres órdenes de magnitud superior al fármaco parental. La toxicidad de Irinotecán se ha asociado a la presencia de altos niveles de SN38. Otra ruta de metabolización, por la que se liberan a plasma los metabolitos APC y NPC, es a través del sistema de citocromos P450, CYP 3A4. La detoxificación de éste se realiza a través de beta-glucuronidación por la enzima UGT (UDP glucuronosil transferasa), con la consecuente formación de SN38G. El glucurónido se excreta vía biliar al intestino delgado donde las glucuronidasas bacterianas lo escinden en SN-38 y ácido glucurónico.

La enzima UGT1A1 es el principal responsable de la glucuronidación de la bilirrubina y diversos xenobióticos, presentando múltiples isoformas asociadas con actividad

enzimática reducida (algunos de estos genotipos se consideran responsables del síndrome de Gilbert y del síndrome de Crigler-Najar II). Determinados genotipos, como el polimorfismo UGT1A1*28, identificados según el número de repeticiones del dinucleótido TA en la caja TATA del promotor, se asociaron con toxicidades grado 3-4 a Irinotecán (240). Otros estudios retrospectivos han apoyado estos datos, incluyendo esquemas de combinación de Irinotecán y 5-FU (241). Recientemente se han asociado los polimorfismos UGT1A7*2 y UGT1A7*3 a respuesta tumoral a Capecitabina e Irinotecán, y ausencia de toxicidad digestiva severa en pacientes con CCR metastásico. No se ha encontrado ninguna relación con los polimorfismos de UGT1A1, UGT1A6 o TS (242).

5.3.4. Factores predictivos de respuesta/toxicidad a Oxaliplatino

Oxaliplatino forma adductos con el ADN, dificultando la progresión de la horquilla de replicación. Una deficiencia de las enzimas reparadores del ADN genera un acúmulo de lesiones genéticas que predisponen al desarrollo de tumores. Una vez desarrollado el mismo la deficiencia en este funcionamiento puede ofrecer la ventaja de una mayor sensibilidad a quimioterápicos que operan a través de la formación de adductos. Dentro de las enzimas reparadores, deben destacarse las que actúan a través de la vía NER (*Nucleotide Excision Repair* o reparación por excisión de nucleótidos), como ERCC1, XPD (*Xeroderma Pigmentosum group D gene*, también llamado *excision repair cross-complementing group 2 gene* o ERCC2) y XPA; las que actúan vía BER (*Base Excision Repair* o reparación por excisión de bases), como *X-ray cross-complementing group 1 gene* o XRCC1; y las involucradas en la vía DSBR (*Double Strand Break Repair* o mecanismo de reparación por recombinación homóloga), como XRCC3. Estudios in vitro han mostrado que niveles reducidos de ARNm de ERCC1 se correlacionan con respuesta a Cisplatino y Oxaliplatino (243). Estudio in vivo también lo corroboran (244;245). Algunos polimorfismos en el codón 399 del exón 10 de XRCC1 se asocian a una menor actividad reparadora y a una menor capacidad de inducir apoptosis. Ésta última sería la razón por la que estos polimorfismos podrían asociarse a mayor resistencia a Oxaliplatino-5FU (246). También se ha asociado a un polimorfismo de nucleótido único en XPD (XPD751) con menores respuestas a Oxaliplatino-5FU que el genotipo normal (247). Los resultados de estos estudios de enzimas reparadoras y sensibilidad a Oxaliplatino han de ser confirmados por otros autores y validados prospectivamente.

6. MECANISMOS DE RESISTENCIAS TERAPÉUTICAS

El vencimiento de las RTs es uno de los grandes retos en Oncología. El mecanismo por el que las células tumorales desarrollan RTs es complejo. Pueden pre-existir al tratamiento (resistencias intrínsecas o de novo) o desarrollarse durante o después del mismo (resistencia adquirida). En ocasiones no sólo se produce una resistencia a los fármacos empleados sino a otros con diferente mecanismo de acción, fenómeno conocido como resistencia múltiple a drogas (MDR). El estudio de los mecanismos implicados en las RTs es relativamente reciente y su mejor conocimiento ayudará a particularizar los tratamientos para conseguir mejores resultados oncológicos (248).

Los fármacos anticancerosos basan su eficacia en una selectividad terapéutica al actuar predominantemente en la célula tumoral y en menor grado en la normal. La justificación de los tratamientos radica en la existencia de dianas diferencialmente presentes en el tumor frente a los tejidos y órganos circundantes. En este contexto, el ciclo celular ha sido la diana clásica de los quimioterápicos, habida cuenta de que una característica diferencial obvia de los tumores es la proliferación celular. En las últimas décadas, el estudio de las RTs frente a los quimioterápicos se ha abordado de una forma dirigida tratando de identificar las dianas moleculares y el metabolismo de los fármacos como principal fuente de resistencias. En la tabla 8 se muestran algunos de los fármacos utilizados en clínica y su mecanismo de acción (249).

Tabla 8. Quimioterápicos utilizados en clínica (249)

Clase de compuesto	Mecanismo de acción	Compuestos prototipo	Impacto en ciclo celular
Agentes que dañan el ADN	Inducción de alquilación de ADN o entrecruzamiento clastogénico	-Cisplatino -Mostaza Nitrogenada -Ciclofosfamida -Clorambucilo	Parada en G1/S, apoptosis mediada por p53 o parada en G2/M. Regulación de p21 y secuestro de PCNA
Inhibidores de microtúbulos	Inhibición de polimerización de tubulina e interrupción de formación de huso	-Taxanos -Vincristina /Vinblastina	Parada en el punto de control de ensamblamiento del huso mitótico
Depleción de ribonucleótidos	Análogos de nucleósidos de purina que inhiben: -ADN polimerasa -Ribonucleótido reductasa -Elongación cadena ADN	-Hidroxiurea -Gemcitabina	Aumento de p21 inducido por p53 y parada en punto de control G1. Muerte celular de células defectuosas que pasan a fase S
Antimetabolitos	Inhibición de la timidilato sintetasa y de la síntesis de ADN	-Metotrexate -Arabinósido de Citosina -5-Fluorouracilo	Parada en puntos de control de S y G2/M mediada por p53
Inhibidores de la topoisomerasa	Inhibición de la ADN polimerasa y de la replicación del ADN	-Análogos de las camptotecinas -Etopósido	Daño en fase S que causa parada en puntos de control de fase S y G2/M. Aumento de p16 y parada en G1/S

Sin embargo, en los últimos años crecientes evidencias indican que las RTs pueden depender en mayor grado de la regulación al alza de un umbral para la muerte celular debido a la activación de rutas oncogénicas (250). Así se han relacionado las mutaciones en genes como Ras o p53 con las RTs a diversos quimioterápicos (251).

Resulta, por tanto, de gran interés el conocimiento de los mecanismos de muerte celular pues la modulación de los mismos puede resultar en un aumento del índice terapéutico. Muchas líneas de investigación en cáncer se centran en reconducir a la célula tumoral hacia procesos de muerte celular como la apoptosis. Si la célula consigue reparar un daño producido al ADN proseguirá su ciclo y si no, optará entre dos opciones: morir (rutas apoptóticas o no apoptóticas) o mantenerse en situación quiescente (senescencia). Dado que la proporción de células tumorales que siguen rutas no apoptóticas parece aumentar por efecto de los tratamientos quimio o radioterápicos, la combinación de dichas terapias con fármacos que produzcan muerte celular no apoptótica podría ayudar a vencer las RTs.

A continuación se describen los mecanismos conocidos de muerte celular, de RTs y las principales teorías de selección clonal en dichas RTs.

6.1. Mecanismos de muerte celular

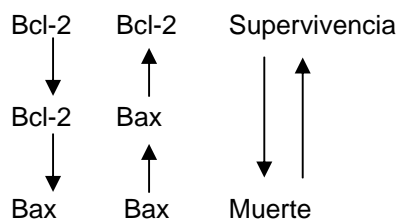
6.1.1. Ruta apoptótica

Es la más conocida de las muertes celulares programadas. Fisiológicamente es esencial en el desarrollo embrionario, el equilibrio homeostático y en la función del sistema inmune. Está mediada por las caspasas, una familia de cisteín-proteasas, normalmente expresadas en forma de precursores inactivos (pro-caspasas).

Existen dos rutas de activación de la apoptosis: la extrínseca y la intrínseca. La primera de ellas comienza con la unión de los ligandos Fas-L o el factor de necrosis tumoral (TNF) a sus respectivos receptores de superficie celular, Fas y TNFR, que activarán a la caspasa 8. Para ello, es necesaria la participación de FADD, que actúa como una proteína adaptadora, y que junto con el receptor formará el complejo DISC (*Death-Induced Signalling Complex*). Éste permite la activación de varias moléculas de pro-caspasa 8, facilitando su interacción y autocatálisis (252). La segunda es la ruta mitocondrial o intrínseca, activada por estímulos tanto intracelulares (gen p53) como extracelulares (inducción de oncogenes, hipoxia, etc.) ante un daño al ADN. Desencadena toda una cascada de señales que converge en la mitocondria con la liberación del citocromo C. Éste junto con otras moléculas pro-apoptóticas formarán el apoptosoma, un gran complejo proteico que contiene el citocromo C, APAF1 (proteasa apoptótica activadora del factor 1) y la caspasa 9. El apoptosoma actúa sobre ADNsas

responsables de la fragmentación del ADN (CAD, *Caspase-Activated DNase*), condensando así a la cromatina nuclear y conduciendo a la apoptosis (253-257). Un aspecto muy importante es que el proceso más regulado de toda la ruta mitocondrial es el de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Es decir, una vez es liberado el citocromo C toda la cascada de señales siguientes es irreversible. De este control se encarga la familia Bcl-2, a la que pertenecen proteínas con funciones opuestas: supresoras de apoptosis, como Bcl-2 o Bcl-xl, y efectoras, como Bax, o Bak. Bax y Bcl-2 forman, entre sí, heterodímeros u homodímeros y la proporción relativa de ambos determina la susceptibilidad final a la apoptosis, como muestra la figura 4. Bad es sustrato para la fosforilación de moléculas de supervivencia como AKT o Raf-1. Cuando no se encuentra fosforilado ejerce efectos pro-apoptóticos (258).

Figura 4. Dimerización de proteínas Bcl-2



Existen, además, una serie de proteínas mitocondriales que pueden modificar la muerte celular independientemente de la activación de las caspasas, como la endonucleasa G o AIF (factor inductor de apoptosis). Otras moléculas como DIABLO (también conocida como SMAC) u OMI (denominada, también, HTRAZ) favorecen la activación de las caspasas por su acción inhibidora sobre las IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis).

Las IAP están implicadas en la regulación de las rutas de supervivencia bien evitando la activación de las caspasas o inhibiendo la actividad catalítica de las enzimas maduras. Poseen además un mecanismo dependiente de la ubiquitina por el que destruyen a las caspasas o a otras proteínas mitocondriales pro-apoptóticas, como SMAC. Survivina pertenece a la familia de las IAP y se encuentra sobre-expresada en la mayoría de los tumores. Esto traduce una alteración en su regulación transcripcional. Su transcripción es un proceso estrechamente regulado que aumenta en el momento de la mitosis celular. Parece evitar la acumulación de daños en el ADN que conducirían a una mitosis aberrante. Diversas rutas oncogénicas confluyen aumentando la expresión de survivina. Estas rutas son AKT/PI3K, Ras, p53, APC y PML, entre otras. Estudios in vitro parecen dar a esta proteína un papel citoprotector. Su sobre-expresión inhibe tanto la vía intrínseca como extrínseca de apoptosis.

Comparativamente con otras IAP, survivina podría ser más selectiva y actuar previo a la iniciación de la apoptosis mitocondrial. Diversos estudios retrospectivos han demostrado que la sobre-expresión de survivina en cáncer es un factor de mal pronóstico asociado a una menor SG, un aumento en la tasa de recurrencias, una mayor resistencia a los tratamientos y a una reducción en el índice apoptótico. Estudios de perfiles de expresión génica en CCR lo corroboran. Por ello se han iniciado los primeros ensayos clínicos fase I con oligonucleótidos antisentido frente a survivina como diana terapéutica. Se sabe también que su unión a las proteínas Hsp90 la protege de su degradación. El bloqueo de esta interacción podría desestabilizar el papel de survivina en el desarrollo tumoral, favoreciendo su degradación por el proteasoma y la activación de la caspasa 9. Más adelante se comentará el papel regulador de la apoptosis que desarrollan p53, AKT/PI3K y NFkB.

6.1.2. Rutas no-apoptóticas: Senescencia, necrosis, autofagia y catástrofe mitótica

6.1.2.1. Senescencia

Puede definirse como una “muerte en vida”, en el sentido que la célula tras un periodo inicial de gran proliferación, en el que se produce un acortamiento de los telómeros, interrumpe el crecimiento perdiendo su clonogenicidad, pero manteniendo íntegras todas sus membranas. Está regulada por la activación de genes supresores como p53, p21^{WAF1}, p16^{INK4A} y la proteína Rb, lo que sugiere que una de sus funciones más importantes sea la supresión del desarrollo tumoral, hipótesis que se ha demostrado en modelos tumorales. Puede ser inducida por estrés celular, activación oncogénica o por agentes capaces de producir un acortamiento en los telómeros, con la consecuente activación de varios inhibidores del ciclo celular. Cualquier fallo en el programa de senescencia puede contribuir al desarrollo tumoral, siendo este proceso, por tanto, una potencial diana terapéutica.

6.1.2.2. Necrosis

Es un proceso de destrucción celular traumática, con la consecuente liberación al exterior de todos los componentes intracelulares produciendo, así, una reacción inflamatoria. Estas células muertas son degradadas por los fagocitos. Cuando no es exógena subyacería un fallo en las rutas fundamentales que mantienen la homeostasis celular. Se desconocen, aún, las vías de señalización implicadas en este tipo de muerte celular.

6.1.2.3. Autofagia

Es junto con el proceso de proteólisis, mediado por la ubiquitina en el proteosoma, un mecanismo de degradación de proteínas innecesarias. La principal función fisiológica de la autofagia es garantizar la supervivencia celular en momentos de falta de nutrientes, a través del catabolismo de componentes intracelulares y la eliminación de organelas dañadas manteniendo la homeostasis celular. Comienza con la formación de vesículas autofágicas o autofagosomas a partir, principalmente, de las membranas del retículo endoplásmico y englobando tanto organelas como proteínas. En un paso posterior se fusionan con los lisosomas degradando el contenido del autofagosoma.

Cualquier daño en la mitocondria o en el retículo endoplásmico libera numerosos oxidantes endógenos al interior celular potenciando la acumulación de mutaciones y la activación de la autofagia como defensa natural. Los fallos en este tipo de muerte celular guardan, pues, clara relación con la aparición de neoplasias pues favorecen la acumulación de mutaciones.

Se conocen al menos dieciséis genes relacionados con este proceso. La vía de PI3K está implicada en su control. En ella, m-TOR regularía negativamente la formación y expansión de los autofagosomas lo que explica que rapamicina (inhibidor de m-TOR) bloquee la progresión del ciclo celular induciendo este tipo de muerte celular. Otros factores que pueden regular negativamente la ruta de señalización de m-TOR son la privación de aminoácidos, de nutrientes o factores de crecimiento. PTEN, gen supresor que regula negativamente la ruta de AKT, parece favorecer la autofagia. Por ello es posible que tanto la activación de AKT como de m-TOR o la pérdida de función de PTEN pudieran inhibir tanto la apoptosis como la autofagia contribuyendo con ello a la aparición de neoplasias. Otros oncogenes como Ras o Myc inhiben parcialmente la autofagia lo que les relaciona, de igual forma, con la génesis tumoral.

6.1.2.4. Catástrofe mitótica

El punto de control del ciclo celular G2/M, situado al final de la fase G2, determina si la célula debe entrar en fase M y dividirse. Cualquier daño en el ADN se detecta en este punto, con la consecuente activación de numerosas moléculas que conducen a su reparación, al bloqueo del ciclo celular (senescencia) o a la apoptosis, si el daño no puede repararse. Si existe un fallo en algún punto de este proceso, la célula entra prematuramente en fase de mitosis (antes de que se haya replicado o reparado el ADN), lo que causa una mitosis aberrante y, con ella, una muerte celular por catástrofe mitótica. Ésta puede ser inducida por agentes que dañen los microtúbulos o el huso

mitótico, como Paclitaxel, que produce una metafase anormal en la que las cromátidas no pueden separarse correctamente.

Poco conocemos de los mecanismos moleculares que controlan la catástrofe mitótica. A modo de resumen, la activación del punto de control G2, ante un daño al ADN, comienza con la de moléculas como ATM o ATR que a su vez activarán a las quinasas de control CHK1 y CHK2 que fosforilarán a CDC25. Ésta junto con la diana de p53, 14-3-3 σ , son responsables de la inactivación de CDK1 (principal regulador de la mitosis) y del bloqueo de G2 hasta que se repare el ADN. p53 también inhibe el punto G2 a través de otras de sus dianas: p21, que al unirse al complejo de ciclinas-CDK1 bloquea, de igual modo, su activación.

Una función crucial de la survivina, recientemente estudiada, parece ser la regulación de la progresión de la mitosis celular. En la figura 5 se refleja un modelo de protección, frente a la catástrofe mitótica, mediado por esta proteína. Su pérdida parece inducir una interrupción del ciclo celular y muerte por catástrofe mitótica a través de un mecanismo independiente de p53 o Bcl-2, si bien, induce la expresión de p53 y p21 indirectamente por la activación de la ruta apoptótica que media p53.

Figura 5. Modelo de protección de la catástrofe mitótica mediado por survivina



A continuación describiremos los principales mecanismos y modelos implicados en las RTs en general, para después analizar el modo de acción de los quimioterápicos empleados en el tratamiento del CCR y las RTs que de ellos se conocen.

6.2. Principales mecanismos de resistencia farmacológica

6.2.1. Alteraciones en la acumulación

La disminución en el almacenamiento intracelular del fármaco es uno de los mecanismos más frecuentes de RTs. Puede deberse a un descenso en la entrada al interior celular, debido a defectos en los sistemas de transporte o más frecuentemente

por un aumento en la salida hacia al exterior o por bloqueo en la ruta intracelular del fármaco. En este sentido, la sobre-expresión de la glicoproteína P y de proteínas relacionadas con la resistencia múltiple a drogas (MRP, LRP, etc.) aumentan la permeabilidad celular favoreciendo la salida al exterior del fármaco.

6.2.1.1. Glicoproteína P

Pertenece a la superfamilia de proteínas de membrana ABC (*ATP-binding cassette*). Utiliza la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para enviar el fármaco del citosol a la matriz extracelular, en contra de un gradiente de concentración. Se codifica en el brazo largo del cromosoma 7 junto a dos miembros de la familia MDR (MDR1 y MDR2/3). Por técnicas de IHQ se localiza en la membrana plasmática de la superficie de células con fenotipo MDR. Sólo las células MDR1 expresan un fenotipo de MDR, por lo que la expresión de MDR2/3 no está implicada en RTs. La expresión de MDR1 puede encontrarse en una gran cantidad de tejidos normales (glándulas suprarrenales, riñón, hígado, ductos pancreáticos, yeyuno, íleon y colon).

Se conoce su papel fisiológico en la eliminación, a través de la bilis y de la luz intestinal, de toxinas resultantes del metabolismo, así como un papel en la protección frente a la entrada de drogas a los conocidos “santuarios” (sistema nervioso central, barrera feto-placentaria, testículos).

Algunos fármacos como los antagonistas del calcio, inmunosupresores o fenotiacinas son capaces de revertir total o parcialmente los efectos derivados por alteraciones en los MDR. El problema en la práctica clínica oncológica es que el tratamiento con estos agentes puede alterar la farmacocinética de los antineoplásicos y aumentar la toxicidad de los mismos.

6.2.2. Alteración de genes reparadores

6.2.2.1. Genes caretakers: Sistema MMR

La principal función de este sistema es eliminar desapareamientos de bases, así como bucles creados por inserción-delección de bases causados a consecuencia de errores que comete la ADN polimerasa durante la replicación del ADN. En general, estas lesiones afectan secuencias no codificantes de ADN suponiendo ganancias o pérdidas de repeticiones cortas en la región de microsatélites y generando inestabilidad de los mismos. Los desapareamientos causados por errores de replicación producen distorsión en la doble hebra del ADN. Este sistema de reparación requiere, por lo menos, seis proteínas (proteínas MMR). Estas proteínas son: MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, MLH1, MLH3, PMS2, Exonucleasa I, ADNasa IV, FEN1. Las

mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para estas proteínas ocasionan lo que se denomina “fenotipo mutador” (también llamado *Replication Error* [RER]), incrementando la frecuencia de mutaciones en el resto del genoma. Son mutaciones que causan, a su vez, otras de oncogenes y de genes supresores de tumores, claves para la adquisición del crecimiento descontrolado. Este sistema es responsable de la reparación del daño producido por agentes alquilantes y su alteración se relaciona por ejemplo con las RTs a Cisplatino (259).

6.2.2.2. Sistema BER

Es el más empleado para eliminar bases incorrectas o dañadas. En función de la base errónea que se deba eliminar se sigue una vía específica. El daño generado por agentes como antraciclinas o alquilantes induce la activación de esta vía. La relevancia clínica de la vía BER en la determinación de resistencias aún es mal conocida (260).

6.2.2.3. Sistema NER

Este tipo de reparación consiste en la eliminación del nucleótido erróneo que posteriormente será reemplazado por otro sintetizado a partir de la cadena molde. Estudios recientes sugieren que para que el sistema NER repare al daño es necesario que, además de darse una distorsión en la cadena de ADN, ésta sufra una alteración en su estructura química. Un desapareamiento de dos nucleótidos produce una distorsión en la estructura del ADN, pero no altera su química; por lo que no sería reconocido por NER.

Los derivados de platino, por su mecanismo de acción, son el prototipo de genotóxicos que inducen activación del sistema NER. Dentro de los componentes de la vía NER, uno de los miembros más importantes es ERCC1, cuya sobre-expresión parece implicada en las resistencias a Cisplatino (261;262) y Oxaliplatino (244).

6.2.3. Inhibición de la apoptosis

Dado que el principal efecto citotóxico de los quimioterápicos es por inducción de apoptosis, las alteraciones en este proceso originan RTs pleiotrópicas, independientes de la clase o de la diana de los fármacos. Con frecuencia las RTs obedecen a la activación de rutas de supervivencia sucedidas durante el desarrollo tumoral, es decir, a transformaciones oncogénicas. Mutaciones en Ras, c-Src, Raf, c-Kit, amplificación de HER-2 o de EGFR son ejemplos de transformaciones oncogénicas que pueden activar rutas de supervivencia y se relacionan con RTs. Los propios tratamientos,

como la QT o la RT pueden activar las rutas de supervivencia, como mecanismo de RTs. Así por ejemplo, fármacos como Cisplatino o la RT inducen NFKB (263).

6.2.3.1. Ras

La familia Ras contiene cerca de 50 variantes conocidas y relacionadas con genes codificantes de proteínas G con diversas funciones (tabla 9).

Tabla 9. Funciones biológicas de algunos miembros de la superfamilia Ras

Familias génicas	Función
Ras y tc21	Control del crecimiento y la diferenciación celular
Rho, rac y cdc42	Organización del citoesqueleto
Rab y Raf	Transporte de sustancias controlando el tráfico intracelular de membrana
Ran	Transporte de ARN y proteínas entre el núcleo y el citoplasma

Los genes Ras están activos en la mayoría de las células humanas. Un 25% de los tumores de estirpe epitelial expresan formas mutadas de Ras, con las tasas más elevadas en páncreas, CCR y pulmón. Las proteínas Ras actúan como mediadoras de la transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular desde los receptores tirosín-quinasa de la membrana celular hasta el núcleo. Las formas mutadas de Ras pierden la capacidad de hidrolizar GTP permaneciendo siempre en su forma activa con la consecuente proliferación celular mediada por un ciclo muy activo en el proceso de síntesis.

Ras está implicado en diversas rutas como MAPK o AKT. Con respecto a ésta última, activa directamente la subunidad catalítica de PI3K, lo que conduce a la formación de PI3P, un segundo mensajero que interactúa con numerosas enzimas, entre ellas AKT (Proteín-Kinasa B).

p21^{Waf1/Cip1} sufre, también, los efectos de Ras. Ésta, inducida por Raf, inhibe la actividad de los complejos CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A, ocasionando el bloqueo de síntesis de ADN y ejerciendo un efecto de regulación negativa limitando la capacidad de Ras para transformar células normales (264).

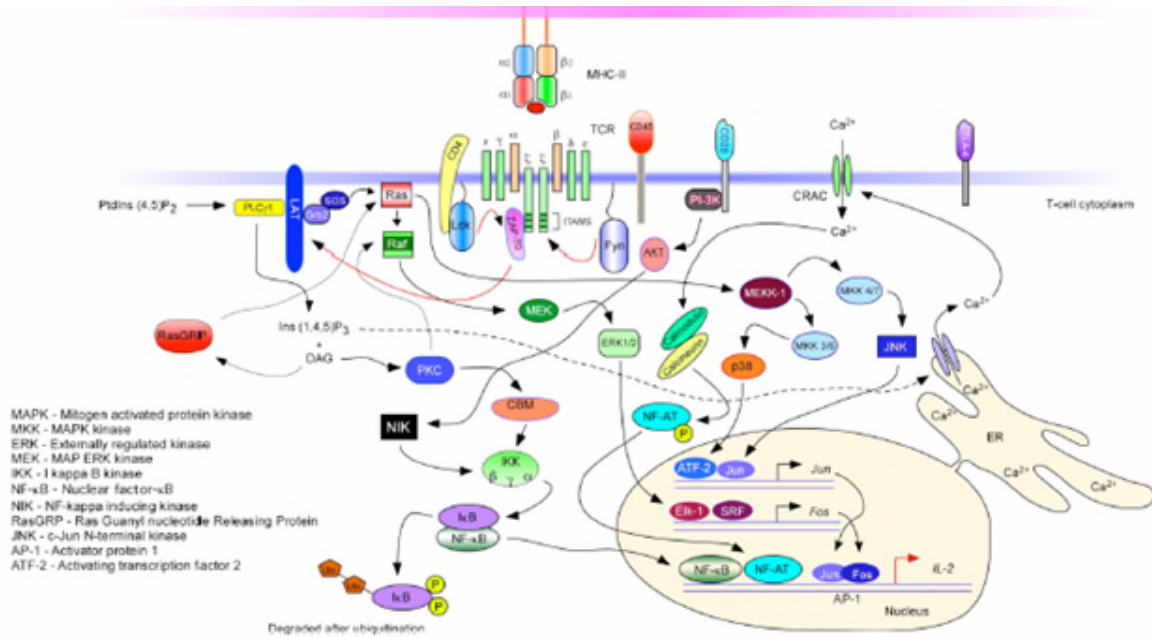
Dentro de las estrategias terapéuticas que se desarrollan frente a Ras destacan los inhibidores de la farnesiltransferasa. Su mecanismo de acción no está aún bien aclarado, pero parece que los resultados sobre el crecimiento tumoral obedecen a la inhibición de una proteína relacionada con Ras: RhoB, y por ello, por un mecanismo Ras-independiente (265).

6.2.3.2. Ruta MAPK (*Mitogen-activated protein Kinase*)

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se expresan en las células de los mamíferos y están implicadas en una vía de transducción de señales en respuesta a mitógenos como el estrés celular, citoquinas inflamatorias o factores de crecimiento (266).

Consta al menos de cuatro niveles de activación secuencial intracitoplasmático que inducen finalmente la expresión génica a través de factores de transcripción. Cada uno de los niveles que configuran este sistema fosforila al inmediatamente inferior. La vía se considera que se inicia con la activación de Ras en respuesta a mitógenos o de Rac/cdc42 en respuesta al propio Ras o a estrés oxidativo, genómico, osmótico o citoquímico. Secuencialmente, el segundo nivel, denominado MAPKKK (quinasas de quinasas de MAP quinasas) se activa por estas dos quinasas. Este nivel está constituido al menos por Raf-1, Tpl-2, MEKK1, ciertas proteínas MLK, ASK1, MEKK4, TAK1, MEKK3 y proteínas TAO. El tercer nivel activado sería el de MAPKK (quinasas de MAP quinasas), compuesto por MEK1/2, SEK1, MKK7, MKK3, MKK6 y MEK5 entre otras. Finalmente se activan las cuatro familias de proteínas efectoras que en sentido estricto serían las MAPKs (Erk1/2, JNK1/2/3, p38 y ERK5) (267). Éstas se translocan al núcleo y directamente activan diferentes factores de transcripción, incluyendo Elk1, Fos y Jun. Los dos últimos se unen para formar el activador de proteína 1 (AP-1), factor de transcripción de unión específica a secuencias de ADN cercanas al gen myc, iniciando su transcripción (figura 6). En última instancia, estas señales intracelulares convergen en un punto: la inducción de ciclinas tipo D, proteínas que forman complejos con las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6. Los complejos proteicos intervienen en la regulación del ciclo celular, por lo que se cree que la vía Ras/MAPK es el punto crítico de unión entre los receptores de señales y la progresión o no de la célula en fase G1. Sin embargo, que la unión Ras-Raf no sea suficiente para la activación de la quinasas indica la necesidad de otras señales para continuar la transmisión (268;269).

Figura 6. Vía de señalización MAPKK/MAPKKK (268;269)



La relevancia de este sistema de transmisión viene dada por las implicaciones que tiene en la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, las respuestas frente al daño genómico así como frente a situaciones globales de estrés. Sin embargo, el entorno químico sobre el que se sitúa la célula tumoral puede generar diversas respuestas que paradójicamente inducen muerte celular. Por ejemplo, ante estímulos de estrés celular como la radiación UV o el tratamiento con genotóxicos, la expresión de JNK o p38 se asocia a muerte celular (270), mientras que la activación de Erk induciría supervivencia (271). La activación de MAPK por la QT es dependiente en última instancia del tipo de tumor. Cisplatino activa a Erk en carcinoma de ovario, neuroblastoma y células HeLa, pero no en queratinocitos (272). La inhibición in vitro de Erk, previo al tratamiento con Paclitaxel o Cisplatino aumenta la sensibilidad y, con ello, la muerte celular inducida por estos agentes en líneas celulares de carcinoma de ovario y de melanoma, respectivamente (273). Por tanto, la evaluación teórica del fenotipo resultante de la modificación de la señalización de esta vía debe tener en cuenta la variación inteARN y la inter-relación entre las distintas variables que configuran el sistema completo. La compensación global entre todas ellas y el predominio de unas sobre otras (por ejemplo, de Erk sobre JNK) podrían inducir efectos contrapuestos.

Recientemente han surgido diversas teorías que sugieren que este sistema de señalización es el que controla el grado de activación metabólica de una célula concreta, permitiéndole el empleo de nutrientes para adquirir un determinado estado de proliferación, diferenciación o, en su defecto, muerte. Igualmente, en células

tumorales, la actividad de esta vía de señalización permite la supervivencia en entornos hostiles, así como la resistencia a la QT (274). Es decir, cuando una célula tumoral se encuentra con una situación de estrés que potencialmente induciría señales que promoverían la muerte celular (por ejemplo, la QT), este sistema se activaría con la "intención" final de promover supervivencia. El predominio químico de estas dos respuestas celulares (vida y muerte) generará el efecto final que, más allá de la diana sobre la que actúe un fármaco citotóxico determinado, observaremos como respuesta celular global (250). En este sentido, la relevancia clínica de la determinación de mutaciones en ciertas proteínas, la expresión de bombas de extrusión de tóxicos o la modulación de la expresión de la diana quedarían en un segundo plano en tumores que tuvieran la capacidad de modular la respuesta posterior, esto es, las rutas de supervivencia o muerte celular inducidas posteriormente al efecto del citotóxico. Esto es uno de los patrones de oro en la investigación traslacional dentro de la Oncología contemporánea.

La activación de la ruta JNK está implicada en la respuesta a apoptosis ante el daño al ADN, el estrés celular y drogas citotóxicas. Parece que en células normales la activación de JNK conduce a la activación de miembros pro-apoptóticos de Bcl-2 y se traduce en una liberación de citocromo c desde la mitocondria. El papel que desempeñan JNK y c-Jun en células tumorales es aún poco conocido. En algunas líneas celulares, la sobre-expresión de c-Jun se relaciona con resistencia al daño en el ADN de ciertas drogas, efecto que se hace reversible mediante ARN antisentido contra c-jun, si bien en otras ocasiones los resultados han sido los contrarios (272;275). Además el modo de activación de JNK parece tener un papel diferente en apoptosis y/o supervivencia. Una activación mantenida de JNK es necesaria para la apoptosis en respuesta a Cisplatino o a RT. Por el contrario, en determinadas líneas celulares, la activación transitoria de JNK, por ejemplo por TNF- α , conduce a supervivencia (276). Otro aspecto importante es su relación con otras rutas. La activación de AKT podría suprimir los efectos apoptóticos de la activación de JNK, así como JNK modular rutas de supervivencia como la de NF κ B (274;277).

Típicamente MAPK p38 es activada por la acción de las radiaciones UV o citoquinas inflamatorias. Recientemente se ha descubierto que la estimulación de célula T a través de TCR (receptor para el antígeno del linfocito) es una vía alternativa de activación de p38 (figura 6) (278).

6.2.3.3. Vía PI3K/AKT

PI3K fosforila fosfolípidos de inositol y produce fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) quien activa la polimerización de actina y ocasiona cambios profundos en el citoesqueleto y membranas celulares.

Algunas formas de PI3K activan serín-treonín-quinasas (AKT/PKB y P70S6K) con la consecuencia final de fosforilar la proteína ribosomal S6, importante en la transición G1-S del ciclo celular. PI3K y AKT, son considerados proto-oncogenes y su activación es inhibida por el gen supresor tumoral PTEN. De todas las vías de señalización que se activan con la fosforilación de PI3K, la mediada por AKT presenta un interés particular debido a su papel en la inhibición de la apoptosis y la promoción de la proliferación celular, procesos ambos cruciales para la tumorigénesis.

La proteína quinasa m-TOR es fosforilada y, por tanto, activada, en respuesta a los estímulos que también activan la vía PI3K/AKT. Las propiedades antiproliferativas de Rapamicina o su análogo éster CC1-779 se deben a la inhibición de m-TOR, poniendo en marcha la síntesis de proteínas necesarias para el paso de G1 a S en el ciclo celular en diversos tipos tumorales, particularmente con inactivación de PTEN (279).

La vía PI3K/AKT es la principal ruta de supervivencia activada por Ras. Además, se sabe que PI3K inhibe la actividad catalítica de algunas caspasas y que desempeña un papel en la proliferación celular, la motilidad, la neovascularización, la viabilidad y la senescencia, encontrándose sobre-expresada en las células tumorales (280).

Bad, miembro de la familia Bcl-2, es fosforilado por AKT, induciendo la expresión de Bcl-xl, molécula antiapoptótica. De igual forma, FKHR (conocido como FOXO3A) es un factor de transcripción que al ser fosforilado por AKT, favorece la expresión de sus dianas: proteínas pro-apoptóticas como Fas-L y Bim.

Estudios in vitro con inhibidores de PI3K, como LY294002, un derivado flavonoide que presenta un mecanismo de acción competitivo junto a una capacidad inhibitoria reversible del lugar de unión de la enzima al ATP, parecen mostrar actividad antitumoral en modelos tumorales de ratón al aumentar la citotoxicidad a Paclitaxel y RT. En células tumorales de cáncer de mama parecen bloquear la resistencia inducida por Ras (281).

6.2.3.4. NFKB

Es una familia de factores de transcripción que regulan la respuesta inmune e inflamatoria. Además protegen a la célula de la apoptosis inducida por la QT. NFKB es un heterodímero compuesto, entre otras moléculas, por las subunidades p50 y p65/Rel A (282). En células no estimuladas, se encuentra en el interior del citoplasma asociado

con una familia de moléculas inhibitorias conocidas como IKBs. La activación de NF κ B implica la fosforilación de estas IKBs a través de una IKB quinasa (IKK). Se conocen dos tipos de quinasas que fosforilan a las IKBs: una quinasa inducida por NF κ B, y MEKK1. Una vez han sido fosforiladas las IKBs se unen a la ubiquitina y se digieren en el proteasoma; los heterodímeros p50/p65 libres se translocan al núcleo donde activan la transcripción de los genes de respuesta a NF κ B. Algunos de éstos están implicados en la apoptosis como Fas-L y de la familia de proteínas inhibidoras de caspasas (cIAP) (283). Quimioterápicos como Adriamicina, Cisplatino o Paclitaxel inducen rutas de supervivencia dependientes de la transcripción de NF κ B y de las rutas de apoptosis de JNK y p38.

Se trabaja en el desarrollo de pequeñas moléculas que inhiban IKKs, cuya actividad permite la activación constitutiva de NF κ B. De igual modo, tanto la QT como la RT pueden aumentar la sensibilidad a la apoptosis, a través de otros mediadores como TRAIL (284).

6.2.3.5. p53

La principal función de p53 es actuar como “guardián” del genoma. La transcripción de p53 es importante para el desempeño de sus funciones apoptóticas. Induce la expresión de proteínas directamente implicadas en apoptosis como TRAIL-R1, TRAIL-R2, BAX, NOXA, PUMA y CD95. En el 50% de las neoplasias humanas se detectan mutaciones en p53, lo que afecta a su capacidad para activar la expresión de genes pro-apoptóticos. La QT suele ser menos activa en tumores con mutaciones en p53, explicando el valor pronóstico que tiene el estudio de esta proteína (285). Por el contrario, tumores sin alteraciones en p53 presentan, con frecuencia, alteraciones y/o defectos en las rutas que estabilizarían p53 en respuesta al estrés.

IASPP1 es un inhibidor de p53 que trabaja como una proteína transformante con Ras, E1A y E7. La expresión de IASPP confiere resistencia a la apoptosis inducidas por radiación y Cisplatino, y se ha encontrado aumentada en carcinomas de mama con p53 nativa y expresión de ASPP normal (286). De todas formas los resultados son frecuentemente contradictorios, habiéndose relacionado las mutaciones en p53 con resistencias a la QT en tumores como los de pulmón y ovario, y no, sin embargo, en otros casos.

El restaurar la actividad de p53 en células tumorales tiene importancia terapéutica pues su pérdida se relaciona con resistencias, por ejemplo, a los derivados de platino y a la RT. Diferentes abordajes se han intentado en este sentido. Uno de ellos es la transferencia génica, a través de adenovirus con p53 nativa. La combinación de este procedimiento con la administración de QT como Cisplatino, Adriamicina, 5-FU,

Metotrexate o Etopósido en modelos animales con injertos de distintos tumores produce un aumento en la apoptosis y una mayor supresión en el crecimiento tumoral que la administración de la QT sólo (287). Aunque se han comunicado algunos resultados prometedores, esta estrategia se ha visto dificultada por las limitaciones vectorológicas existentes para la transferencia génica. Otra línea de investigación es el empleo de pequeñas moléculas que puedan transformar p53 mutado en su forma nativa (288).

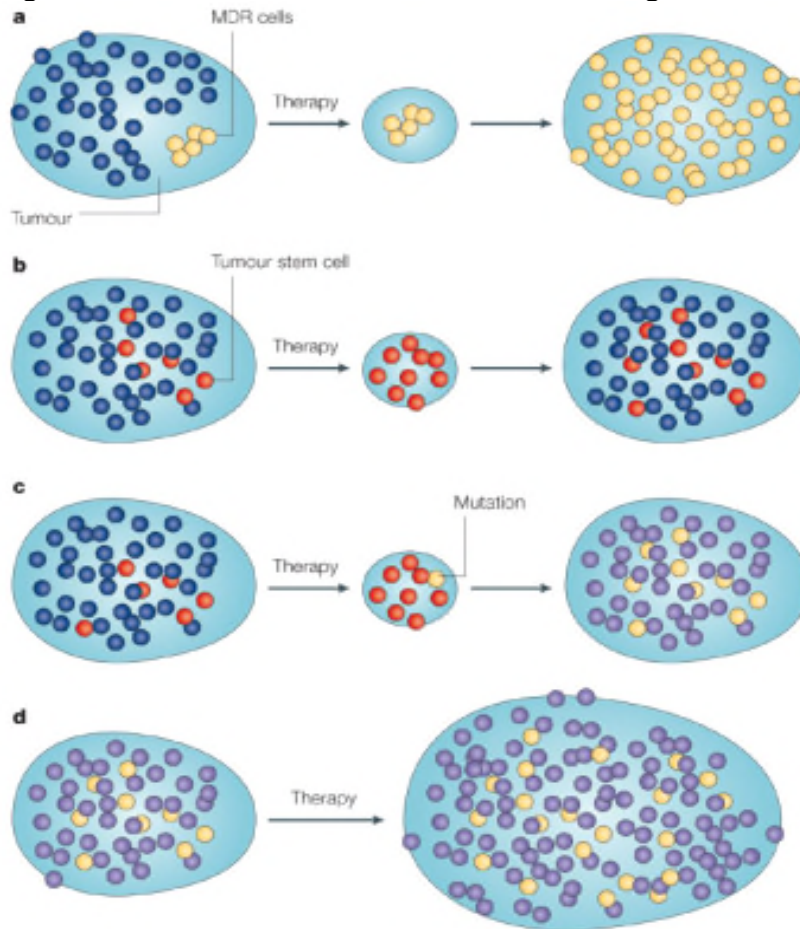
6.3. Células madre tumorales y modelos de RTs

El descubrimiento de la existencia de células madre en los tumores sólidos añade una nueva perspectiva al estudio de las RTs. Representan una pequeña proporción del conjunto de células malignas y su origen se desconoce. Estas células poseen similares propiedades a las del sistema hematopoyético, por lo que por su capacidad de auto renovación puede originarse el propio tumor. Las células madre, pese a su gran capacidad de división permanecen normalmente en situación quiescente, que corresponde a la fase G0 del ciclo celular. Todavía no conocemos quién ni cómo determinan esta propiedad de auto renovación que ocasiona, en caso de error, la acumulación de mutaciones. Sea como fuere, estas células madre con fenotipo tumoral originan progenitores con capacidad de dividirse pero sin la posibilidad de repararse a largo plazo. Las células madres tumorales poseen muchas de las características de las células madre normales: relativa quiescencia, expresión de transportadores ABC (especialmente ABCB1, ABCC1 y ABCG2) que les confieren resistencia múltiple a drogas y resistencia a la apoptosis. Propiedades todas ellas de inmortalidad y de RTs.

La presencia del sistema de transporte ABC permite aislar estas células en estudios *in vitro*. Debido a los transportadores ABCG2 y ABCB1 las células madre tumorales no pueden teñirse con fluorescente Hoechst 33342 o rodamina 123, por lo que se les diferencia fácilmente del resto de la población marcada. Por ello, en los estudios de citometría de flujo, se las denominó como “población marginal o colateral” (*side population*, SP). Si estas células se reinfundían en ratones, reconstituían la médula ósea, gracias a sus propiedades pluripotenciales.

A partir de las propiedades inherentes de las células madre tumorales pueden plantearse diversos modelos que expliquen las RTs (figura 7).

Figura 7. Modelos de resistencia tumoral a drogas



En el más convencional de ellos (modelo a), no se valoraría la existencia de células madre tumorales pero sí existiría una pequeña subpoblación tumoral, más o menos diferenciada, con alteraciones genéticas que les conferirían MDR, entre otras cosas. El tratamiento seleccionaría un clon intrínsecamente resistente que llegaría a dominar en el tumor. En el modelo b, éstas mediarían la resistencia a las drogas por la pre-existencia en ellas de transportadores ABC. Tras la QT, poblarían el tumor que quedaría formado por una población heterogénea de células madre tumorales y sus descendientes más o menos diferenciados. En el modelo de resistencia adquirida (modelo c), las células madre tumorales, que expresan transportadores ABC sobreviven al tratamiento mientras que sus descendientes, en mayor o menor medida diferenciados, morirían tras el tratamiento. Determinadas mutaciones, activación o amplificación de genes aparecerían en las células madre tumorales supervivientes, lo que les conferiría un fenotipo resistente. Por último, hay un modelo de resistencia intrínseca (modelo d) en el que tanto las células madre como las diferenciadas tienen una resistencia intrínseca al tratamiento, que resultaría ineficaz desde el principio. La verosimilitud de la importancia de las células madre no ha podido ser avalada en estudios que han empleado inhibidores de los sistemas de transporte. Los resultados

de los ensayos clínicos, en que se han empleado quimioterápicos e inhibidores de los transportadores, han sido decepcionantes. Sin embargo, no se ha explorado suficientemente la importancia de eliminar las células madre tumorales plurirresistentes. En tumores sólidos, donde apenas existe destrucción tumoral desde el primer ciclo, es improbable que una reducida población de células madre sea la responsable de las RTs, pero en tumores de mayor sensibilidad y rápido recrecimiento post-tratamiento, la hipótesis tiene mayor consistencia. Para evaluar adecuadamente el interés de eliminar las células madre tumorales se necesitarían inhibidores frente a los distintos transportadores, evaluar el efecto sobre la población tumoral diana, agentes eficaces frente a dichas células madre-no olvidemos su habitual quiescencia y por ello quimiorresistencia-, y una ventana terapéutica que evitase una excesiva toxicidad en las células madre de otros compartimentos. Nuevas estrategias habrán de diseñarse para abordar estas hipótesis. El empleo, por ejemplo, de inhibidores de la vía *Hedgehog-Patched*, como Ciclopamina, ofrecería actividad frente a las células madre.

A continuación se resumen los principales mecanismos de RTs conocidos de los agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento del CCR: 5-FU y fluoropirimidinas orales, Irinotecán y Oxaliplatino.

6.4. Mecanismos de resistencia terapéutica a Fluoropirimidinas

6.4.1. Expresión de TS

La resistencia intrínseca a las fluoropirimidinas parece relacionarse con la presencia de niveles elevados de TS en el tumor (171;289). Tanto la presencia elevada de ARNm como de la propia proteína son un factor predictivo de no respuesta a 5-FU. Como se mencionó en el apartado de determinantes pronósticos, TS es también un factor predictivo de supervivencia en CCR (162;290). Los niveles de TS son distintos en las diferentes afectaciones metastásicas. La mayor expresión en las metástasis pulmonares explica la especial resistencia al tratamiento de las metástasis pulmonares y la mejor respuesta de la afectación hepática a 5-FU (291;292).

El aumento de TS guarda relación con un incremento en los niveles de E2F-1 (124;291), aspecto que se detallará más adelante. La zona promotora del gen TS es polimórfica. El polimorfismo consiste en dobles o triples repeticiones en tándem de 28 pb. Los alelos con triple repetición (3R/3R) van asociados a alta expresión y, por tanto, a elevados niveles de proteína, lo que confiere a los pacientes mayor grado de resistencia a las fluoropirimidinas. En las formas heterocigotas 3R/2R se describen respuestas intermedias (293). Se ha descrito un SNP (polimorfismo de un solo

nucleótido) en la segunda repetición de los alelos con tres repeticiones que altera la activación transcripcional de TS, comportándose como si tuviese dos repeticiones. Recientemente, Marcuello y cols. han demostrado su asociación con la respuesta. (Br J Cancer 2004 91 678). En cultivos celulares se han identificado diversas mutaciones en el gen de TS que pudieran ser responsables de RTs, si bien este resultado no se ha podido constatar en muestras tumorales de pacientes resistentes al tratamiento con fluoropirimidinas (294;295).

6.4.2. Expresión de E2F-1, CDK1

Las proteínas implicadas en la síntesis del ADN entre las que además de TS se encuentran dihidrofolato reductasa (DHFR), TP, ribonucleótido reductasa (RR), PCNA y ADN polimerasa se transcriben en el final de G1 y en la fase S del ciclo celular. La regulación del punto de restricción G1-S depende de la fosforilación del gen Rb. En condiciones de reposo la proteína Rb se encuentra formando un complejo con el factor de transcripción E2F-1, que permanece inactivo mientras está unido a Rb. Una vez es fosforilada la proteína Rb, ésta se separa de E2F-1 que inicia la transcripción nuclear activando genes necesarios para la entrada en la fase S (síntesis del ADN). La sobreexpresión de E2F-1 se ha relacionado en cultivos celulares con un aumento en los niveles de TS y, en menor medida de TP y DHFR; y a su vez con RTs (296-298). Se han medido los niveles de ARNm de TS y de proteína así como de E2F-1 tanto en metástasis pulmonares como hepáticas de CCR para tratar de analizar la diferente respuesta que presentan a las fluoropirimidinas. Las metástasis pulmonares parecen expresar más niveles de ARNm de TS y de E2F-1 que las correspondientes hepáticas, lo que explicaría su mayor resistencia a los tratamientos con 5-FU u otras fluoropirimidinas (291;299). No se ha evaluado la relación entre TS y otras isoformas de E2F.

Recientemente se ha publicado un trabajo en líneas celulares de CCR en el que 5-FU podría activar la ruta de CDK1 y cómo su inhibición potenciaría los efectos citotóxicos de 5-FU dando lugar a un secuestro precoz de la célula en fase S, que se traduce en una condensación cromosómica prematura y muerte celular (300). Podría ejercer efecto en la regulación de la entrada de G1 a fase S (301-303) y que su inhibición potenciara el efecto citotóxico mediado por radiaciones ionizantes y otros quimioterápicos como Adriamicina y camptotecinas (302;304;305).

6.4.3. Expresión de UMPK (uridín-citosina monofosfato-quinasa)

En cultivos celulares se ha relacionado la ausencia de expresión de UMPK, también denominado uridín fosforilasa, con resistencia adquirida al tratamiento con 5-FU (perfusión de 4h). Se desconoce cuáles serían los mecanismos responsables de la represión de UMPK (306).

6.4.4. Expresión de OPRT-asa

OPRT-asa es otra de las enzimas implicados en la activación de 5-FU. Niveles bajos de la misma, parecen relacionarse con resistencias *in vitro* a 5-FU, si bien no se ha demostrado que en pacientes resistentes existan niveles bajos de este enzima (307).

6.4.5. Expresión de TP

TP se halla involucrada en la activación, a través de fosforilación, de 5-FU en sus metabolitos activos. Capecitabina se transforma en 5-FU en el interior de la propia célula tumoral por la acción de TP intratumoral. La falta de TP se asocia con una menor concentración de 5-FU intracelular y, consecuentemente, con una menor respuesta. Posee propiedades angiogénicas por su actividad como PDGF-like sin que por el momento se conozca si pudiera desempeñar un papel en la progresión del CCR (308).

6.4.6. Expresión de DPD

Es el principal responsable del catabolismo de 5-FU, además de participar en su absorción intestinal. Por ello, su variabilidad es uno de los más importantes factores que determinan la distinta exposición tisular a FUMP, y los efectos secundarios de 5-FU. El déficit de DPD se relaciona con toxicidad a 5-FU y Capecitabina. Tanto niveles bajos de ARNm como de la propia proteína se han relacionado con respuesta a esquemas que contengan 5-FU (309). Trabajos en líneas celulares relacionan la sobre-expresión de DPD con resistencia a 5-FU (310).

6.4.7. Proteínas reguladoras de la apoptosis

Independientemente del estado de p53, los niveles relativos de Bcl-2, Bcl-xl y Bax determinan la resistencia al tratamiento prolongado con 5-FU, para simular más el tratamiento *in vivo*, en las líneas celulares de CCR (311). Si bien no se ha podido establecer una relación pronóstica (160).

6.5. Mecanismos de resistencia terapéutica a Irinotecán

6.5.1. Expresión de PARP-1

PARP-1 es un enzima constitutivo que en respuesta a una rotura de ADN cataliza la síntesis de nuevos polímeros facilitando la reparación del ADN y la actuación de otras proteínas entre las que se encuentra p53. Trabajos *in vitro* con AG14361, un inhibidor de PARP-1 de cinética constante han mostrado que a bajas concentraciones (<5nM) y en cultivos celulares de CCR potencia los efectos, entre otros, de Irinotecán. De una forma indirecta, se deduce que la sobre-expresión de este enzima o de cualquier otro intervenga en la reparación de excisión de bases (vía BER), podría estar implicada en las RTs a Irinotecán (312).

6.5.2. Familia de las proteínas ABC: ABCG2

Está implicada en la salida de Irinotecán del interior celular. En líneas celulares expuestas a dosis crecientes de SN38 se demuestra la formación de clones resistentes en los que sin que varíe la expresión de topoisomerasa I, hay una mayor amplificación de ABCG2. La mayor expresión de esta proteína se traduce en una disminución de SN38 en el interior de la célula. La inhibición de la función de ABCG2 revierte esta resistencia, lo que viene a confirmar su implicación en su resistencia (313). Estos autores también encuentran, *in vivo*, una mayor expresión de ABCG2 en las metástasis hepáticas tras tratamiento con Irinotecán (313).

6.6. Mecanismo de resistencia terapéutica a Oxaliplatino.

6.6.1. Alteraciones en el transporte

Los exportadores de cobre ATP7A y ATP7B secuestran platinos, aunque no llegan a eliminarlos (314). El aumento en la expresión de ATP7A se ha asociado a resistencia a Oxaliplatino en líneas celulares de cáncer de ovario (315). Otro transportador de cobre, Ctr1, implicado en resistencia a Cisplatino, no ha sido estudiado en relación con Oxaliplatino.

6.6.2. Genes reguladores de apoptosis

Defectos funcionales en la familia de proteínas de Bcl-2, que controlan la ruta mitocondrial de apoptosis, parecen ser relevantes en la resistencia a Oxaliplatino. En líneas celulares de CCR, se observa resistencia a Oxaliplatino ante la inactivación de Bak (316).

6.6.3. Estudios con arrays de ADN en líneas celulares

El fin es identificar los diferentes perfiles de expresión génica entre células sensibles y resistentes a Oxaliplatino e identificar los mecanismos de resistencia de éste. La ruta mitocondrial es la que parece utilizar predominantemente Oxaliplatino para inducir apoptosis. Una ausencia en la expresión de genes implicados en la ruta de síntesis de ATP, en la cadena de transporte de los electrones, se relacionó con resistencia celular a Oxaliplatino. Otra ruta importante fue la implicada en el desarrollo de la enfermedad de *Huntington*, destacando la implicación de caspasa 8 y calmodulina, ésta última con un papel en el control y crecimiento celular. La última ruta a destacar fue la ribosomal. La expresión de genes que regulan esta ruta, como RPLP1, RPLP o RPS6, contribuye en el control del crecimiento y la proliferación celular por lo que la sobre-expresión de los mismos permitiría poder escapar de la muerte celular tras la exposición a Oxaliplatino (317).

El hallazgo de que en el cromosoma 2 se encuentran tres genes (APACD, IF2 y REV1L) que resultan sobre-expresados en las células resistentes otorga un sentido funcional a la hora de explicar las RTs (317). El gen REV1L codifica tres proteínas (REV1, REV3 y REV7) que, juntas, forman la ADN polimerasa C, capaz de replicar a través de adductos de ADN, en ocasiones produciendo mutaciones en el proceso. Trabajos recientes han demostrado que esta polimerasa es la principal determinante de la mutagenicidad de Cisplatino. La pérdida de polimerasa C se traduce en una hipersensibilidad a Cisplatino y en una notable reducción en la generación de clones resistentes en la población superviviente. La expresión de polimerasa C podría contribuir en la resistencia a Oxaliplatino.

6.6.3.1. Proteína HSP90 y vía de señalización de NFKB

La función de las proteínas HSP90 se centra ampliamente en procesos relacionados con el crecimiento celular. En dichos eventos, su función como chaperona está orientada al plegamiento inicial y final de varias proteínas receptoras de esteroides y proteínas de la vía de señalización del ciclo celular (318;319). Existen dos isoformas de la HSP90 citosólica, HSP90 α y HSP90 β , siendo la expresión de ésta última constitutiva. Geldanamycin, un antineoplásico, afecta de forma negativa a la función de HSP90 α , ya que se asocia al mismo lugar de unión del ATP en la región N-terminal de ésta. La propiedad antitumoral de Geldanamycin está relacionada con la inhibición de quinasas. Su unión y subsiguiente inhibición de HSP90 afectará pues a la función chaperona plegadora de quinasas.

La inhibición transcripcional de Geldanamicina se realiza a través de la activación de NF κ B y AP-1. En líneas celulares se ha demostrado interacción entre Cisplatino y Geldanamicina. Los efectos de la combinación de Cisplatino con 17-alilamino-17-demetoxigeldamicina (17-AAG) parecen depender de la inhibición cuantitativa de la ruta de señalización de JNK (320;321). La combinación de Oxaliplatino con 17-AAG muestra que la activación de JNK no es responsable de la citotoxicidad de Oxaliplatino. Sin embargo sí parece serlo la activación de p38, de forma que si éste se inhibe se produce una resistencia a Oxaliplatino. NF κ B se encuentra constitutivamente activo en algunas líneas celulares y queda inhibido por 17-AAG. Esta inhibición aumenta los efectos citotóxicos de Oxaliplatino. Por tanto, a diferencia del mecanismo de acción de Cisplatino, se deduce una interacción entre 17-AAG, la señalización de NF κ B y la modulación de la sensibilidad celular a Oxaliplatino (322).

6.6.3.2. Proteínas c-Src

Son proteínas sin dominio catalítico propiamente dicho, que poseen dominios SH2 y SH3 y que se conocen como “adaptadores” porque sirven de intermediarios entre los receptores tirosín-quinasa y las siguientes moléculas en la cascada de señalización. Los dominios SH2 (Src-Homology 2) se unen específicamente a residuos de tirosina fosforilados. Los dominios SH3 (Src-Homology 3) también participan en uniones proteína-proteína y se unen, con especificidad de secuencia, a motivos ricos en prolina de no más de diez aminoácidos (323).

c-Src se encuentra sobre-expresado en más del 70% de las neoplasias de colon y representan una potencial diana terapéutica. Estudios recientes describen su papel en la modulación de la apoptosis. *In vitro* la presencia de mutaciones en c-Src aumenta la sensibilidad celular a Oxaliplatino, traducido en una mayor activación ruta extrínseca de la apoptosis. En todas las líneas celulares en las que formas mutadas de c-Src se expresan de forma constitutiva, se observa un descenso en la expresión de Bcl-xL. Parece que la activación de c-Src mutada es también un estímulo apoptótico a través de la regulación negativa de la expresión de Bcl-xL (324).

La práctica habitual de administrar tratamiento preoperatorio con QRT en el CRLA permite plantear estudios dinámicos de genómica de alto rendimiento, al poder disponerse de muestras tumorales previas y posteriores a la QRT. Por otra parte una de estas técnicas -el análisis en serie de la expresión génica (SAGE)- ofrece una capacidad singular para caracterizar el transcriptoma en procesos en los que se desconocen a priori los genes potencialmente involucrados, particularmente cuando se parte de exiguas muestras clínicas.

Introducción

En este estudio hemos realizado, mediante SAGE, un análisis de la totalidad del transcriptoma tumoral en tres pacientes diagnosticados de CRLA y con una pobre respuesta terapéutica en la pieza quirúrgica tras el tratamiento QRT. Así, se ha cribado de forma ciega, no dirigida, una colección de genes potencialmente relevantes de cara al pronóstico, la predicción de respuesta y a los mecanismos de RTs involucrados. Estos genes pueden representar no sólo herramientas a evaluar para la individualización de los tratamientos, sino potenciales dianas terapéuticas.

Hipótesis y objetivos

1. HIPÓTESIS

- La principal causa de muerte de los pacientes con CR son las resistencias a la QT, tanto en la enfermedad localmente avanzada como en la enfermedad diseminada. La identificación de los mecanismos de resistencia permitiría la superación de las mismas, posiblemente, a través de una estrategia mixta, en la que se combinaran QT y terapias que aborden los mecanismos determinantes de la resistencia.
- La resistencia al tratamiento QRT del CR se debe a una multitud de mecanismos moleculares que conocemos sólo de forma parcial. El estudio dirigido e individual de los posibles factores moleculares involucrados en las resistencias es sesgado. Cabe suponer que el análisis sistemático de todas las rutas moleculares del tumor permite identificar los factores celulares relevantes de las resistencias.
- Frente a estrategias de estudio de parámetros individuales, las técnicas de alto rendimiento que evalúan perfiles biológicos, como SAGE, ofrecen la posibilidad de analizar miles de factores que potencialmente podrían estar involucrados en las resistencias farmacológicas.
- El análisis de perfiles de expresión génica a partir de muestras clínicas de CR presenta dificultades derivadas de la escasez de material biológico e inherentes a la metodología del estudio. Considerando que el empleo de la técnica SAGE permitiría realizar una exploración de dichos perfiles a partir de muestras tumorales exiguas y que además realizaría un análisis del transcriptoma, de forma completamente cuantitativa, sería de elección para el análisis de muestras muy representativas. La técnica SAGE ofrecería ventajas en todos estos aspectos sobre otras técnicas como el análisis mediante microarrays de genes.
- La comparación de perfiles de expresión de genes previos y posteriores al tratamiento señalaría cambios en la expresión de genes *potencialmente* involucrados en el desarrollo de resistencias.
- El contexto clínico del CR neoadyuvante ofrece un excelente marco para el estudio evolutivo de los perfiles de expresión génica, pues el análisis mediante SAGE podría realizarse a partir de los especímenes tumorales obtenidos antes y después del tratamiento, es decir, de la biopsia del diagnóstico inicial y de la pieza de resección.
- En el desarrollo de las resistencias tumorales está implicada la biología de tumor, pero también las señales procedentes del estroma y tejido circundante. Resultaría por tanto del máximo interés incluir en las piezas a estudio, no sólo células tumorales, sino también una representación del tejido adyacente.

2. OBJETIVOS

En un grupo de pacientes seleccionados afectados de CRLA que hayan recibido tratamiento preoperatorio con QT y RT, que dispongamos de una correcta estadificación pre y post-tratamiento, que muestren una pobre respuesta terapéutica en la pieza quirúrgica y de los que dispongamos de un seguimiento clínico detallado pretendemos:

1. Determinar el transcriptoma del CR de estos pacientes antes y después del tratamiento.
2. Evaluar los cambios evolutivos del transcriptoma a través de comparaciones, primero, en el mismo paciente (“intra-paciente”), y después entre pacientes (“inter-pacientes”).
3. Seleccionar una colección de genes que hayan cambiado significativamente su expresión, en el mismo sentido de sobre-expresión o represión, en los enfermos.
4. Realizar un análisis funcional con los cambios dinámicos en la expresión génica con el fin de relacionarlos con alguna vía de señalización oncogénica por la posible implicación de la misma en los mecanismos de resistencia terapéutica y el futuro desarrollo de nuevas dianas terapéuticas dirigidas precisamente a la reversión de las mismas.

Materiales y métodos

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

1.1. Características generales

Se utilizaron para el estudio enfermos con CRLA, que recibieron tratamiento preoperatorio en un estudio fase II realizado en el Servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz. A continuación se resumen las características de dicho protocolo.

1.1.1. Criterios de inclusión

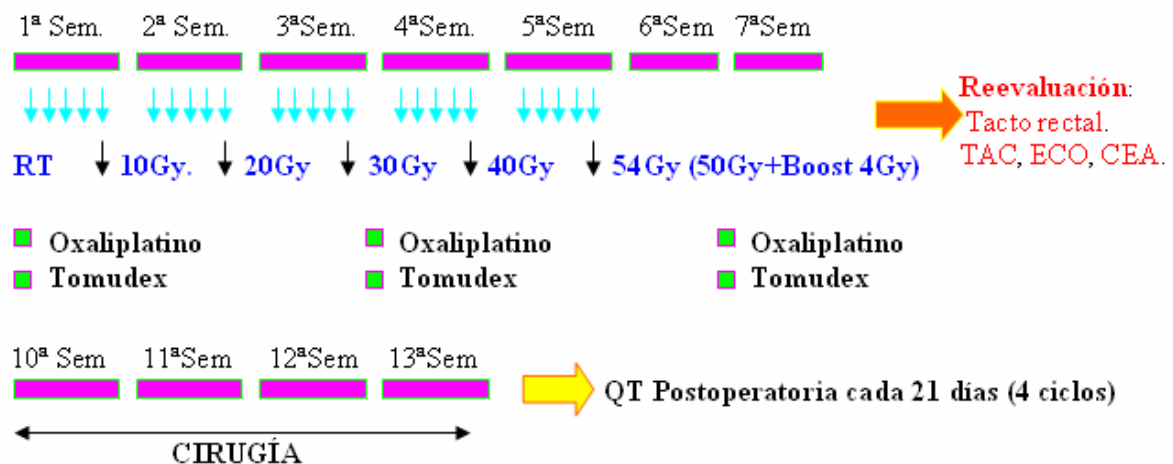
Pacientes con adenocarcinoma de los últimos 10 cm de recto, estadios II (T₃₋₄N₀M₀) o III (T_xN₁₋₂M₀), menores de 75 años, ECOG 0-2 y analítica adecuada (leucocitos >4.000/mm³, plaquetas >150.000/mm³, Bil total <1.5mg/dl, aclaramiento de creatinina >65ml/min).

En este estudio participaron finalmente 48 pacientes.

1.1.2. Criterios de exclusión

Enfermedades concomitantes graves, embarazo, radioterapia pélvica previa, inoperabilidad por enfermedades asociadas.

1.1.3. Esquema de tratamiento quimiorradioterápico (Figura 8)



RT: 30 Sesiones (6 sesiones/sem) desde el día 1 al 33 (1ª-5ª sem).

QT: 3 Ciclos, Días 1, 22 y 43.

REEVALUACIÓN: 3-4 Semanas después de finalizar la RT.

QX: Entre la semana 10ª y 13ª (Días 67 al 91), 6 a 8 semanas después de finalizar la RT.

Figura 8. Esquema de tratamiento quimiorradioterápico

1.1.4. Seguimiento y pruebas

Durante el periodo de seguimiento, los pacientes fueron revisados cada tres o cuatro meses durante el primer año, cada seis meses desde el segundo hasta el quinto año y posteriormente una vez al año. Se solicitaron en todas las revisiones análisis de sangre con marcadores tumorales (CEA y CA 19.9), así como ecografía abdominal y radiografía de tórax que se alternaban con la realización de TAC tóraco-abdominal. Otras pruebas más específicas como la RMN hepática o una PET-TAC se realizaron si la sospecha de recaída no se confirmaba con la TAC. Siempre que se pudo la recaída se confirmó histológicamente.

1.2. Muestras clínicas

Del total de los 48 enfermos incluidos en el protocolo de tratamiento neoadyuvante, se recogieron muestras tumorales en fresco, tanto de las biopsias obtenidas en la endoscopia diagnóstica como de las piezas quirúrgicas post-tratamiento, de 25 pacientes que previamente firmaron el consentimiento informado para la autorización al empleo de dicho material en el presente estudio. Como se puede ver en la tabla 10, que reúne las características de estos 25 casos, fue difícil disponer de todas las variables necesarias para desarrollar los objetivos de nuestro estudio. De hecho, finalmente tres de estos 25 reunían las características adecuadas: se trataba de pacientes homogéneos en su estadificación clínica (cT3N0) y en el escaso grado de regresión post-tratamiento (grado 2 de la clasificación de Dworak), disponíamos de una correcta estadificación clínica y patológica de la enfermedad, de una muestra tumoral tanto pre como posterior al tratamiento de la suficiente calidad (con los criterios que luego definiremos) como para realizar el estudio dinámico del transcriptoma y de un seguimiento clínico suficiente como para poder correlacionar dichos cambios en la expresión génica con resistencia terapéutica.

Tabla 10. Características de los 25 pacientes que autorizaron el estudio dinámico

Número total de pacientes	25
Media de edad (rango)	62 (34-78)
Sexo	
Varones	14
Mujeres	11
ECOG	
0	13
1	11
2	1
CEA preQX	
<5	17
>5	6
Indeterminado	2
Distancia al margen anal	
< 6 cm	11
> 6 cm	14
Media de número de ciclos pre/post (rango)	3/3 (2-6/1-12)
Clasificación clínica del tumor pre QT-RT (cT)	
cT2	4
cT3	15
cT4	3
Indeterminado	3
Clasificación clínica nodal pre QT-RT (cN)	
cN-	10
cN+	5
Indeterminado	10
Clasificación patológica tumoral post QT-RT (ypT)	
ypT0	4
ypT1	2
ypT2	9
ypT3	9
ypT4	0
Indeterminado	1
Clasificación patológica nodal post QT-RT (ypN)	
ypN0	14
ypN1	8
ypN2	1
Indeterminado	2
Tipo de cirugía	
AAP	11
RAB	12
Otras	2
GRT	
GRT 0/1	2
GRT 2	17
GRT 3	3
GRT 4	3
Patrones de recaída	
Local (Pélvica)	3
Distancia	8
Ambas	1
Muertes	2
Pérdidas seguimiento	1
Tiempo medio a la recaída en meses (rango)	21 (7-43)
SLE a 3 años (rango)	77% (69.1-86.3%)
SG a 3 años (rango)	90% (86-96%)

AAP: Amputación abdomino-perineal, RAB: Resección anterior baja, GRT: Grado de regresión tumoral, SLE: Supervivencia libre de enfermedad, SG: Supervivencia global

En la tabla 11 se recoge, con más detalle, las características de los tres pacientes finales sobre los que se centran nuestros resultados.

Tabla 11. Características de los tres pacientes en los que finalmente se realizó el estudio dinámico del transcriptoma

Paciente	A	B	C
Edad	53	71	52
Sexo	V	V	M
ECOG	0	0	0
CEA preQX	>5	>5	>5
Distancia al margen anal	<6 cm	<6 cm	<6 cm
Nº Ciclos pre/post	3/3	2/4	3/3
Clasificación clínica tumoral pre QT-RT (cT)	cT3	cT3	cT3
Clasificación clínica nodal pre QT-RT (cN)	cN-	cN-	cN-
Clasificación patológica tumoral post QT-RT (ypT)	ypT2	ypT2	ypT2
Clasificación patológica nodal post QT-RT (ypN)	ypN0	ypN0	ypN0
Tipo de cirugía	AAP	AAP	RAB
GRT	2	2	2
Patrones de recaída	Distancia (Pulmón)	Distancia (Pulmón)	No
Muertes	Sí	No	No
Pérdidas seguimiento	No	No	No
Tiempo hasta la recaída meses	18	41	-
Supervivencia en meses	55	>60	>60

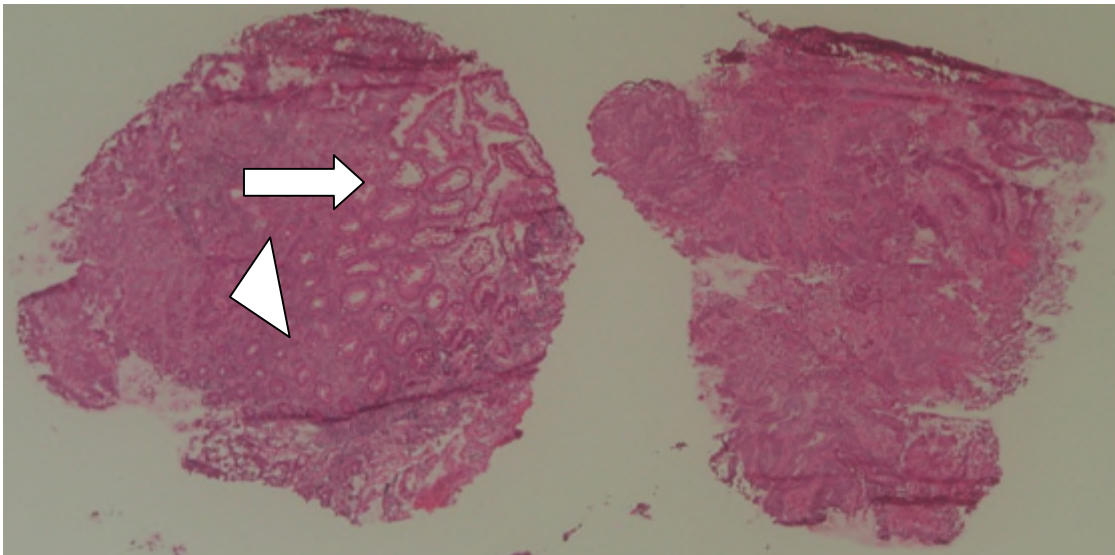
1.3. Recogida de muestras tumorales

Las muestras tumorales previas al tratamiento (biopsias obtenidas en las colonoscopias) y posteriores al mismo (piezas quirúrgicas) se obtuvieron y procesaron por los cauces asistenciales habituales. De acuerdo con el Comité Ético del Hospital La Paz, una parte de las muestras tumorales de las rectoscopias se fijó en formol para su diagnóstico por el Servicio de Anatomía Patológica y el excedente del diagnóstico se congeló para el estudio molecular. Para ello, esta última muestra se introduce en un criotubo, y éste en el interior de un contenedor de nitrógeno líquido a -196°C , disponible en la propia sala de endoscopias del Servicio de Digestivo. Cuando se extraen de dicho contenedor se congelan embebidas en una resina crioprotectora del tejido (OCT). En lo que se refiere a las biopsias obtenidas de las piezas quirúrgicas, la totalidad del espécimen se llevaba, inmediato a su extracción, al Servicio de Anatomía Patológica. Allí, el patólogo analiza la pieza de acuerdo a los criterios estándar para una adecuada valoración de la ETM (procedimiento quirúrgico habitual) y proporciona

una biopsia, de nuevo, en fresco que inmediatamente se congela, bajo las mismas condiciones que la biopsia endoscópica.

Para considerar que las muestras son apropiadas para el estudio molecular se definió arbitrariamente la necesidad de que existiera una riqueza en células tumorales de al menos un 90% en la biopsia endoscópica diagnóstica (muestra pre-tratamiento) y de al menos un 75% en la biopsia tomada de la pieza quirúrgica (muestra post-tratamiento). Para ello, en ambos casos, se cortaron secciones de cinco micras de espesor del bloque congelado. Estas secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron analizadas por el patólogo que certificó el porcentaje de células tumorales presentes en la muestra (figura 9).

Figura 9. Microscopía óptica de muestras seleccionadas para el aislamiento de ARN



En la imagen se observan dos fragmentos de una mucosa intestinal obtenidos por rectoscopia. El fragmento de la izquierda está constituido en su mayoría por glándulas no tumorales (flecha) con un pequeño área en la porción infero-izquierda formada por glándulas tumorales (punta de flecha). El fragmento de la derecha está constituido en su totalidad por tejido tumoral.

Adicionalmente algunas muestras no pudieron ser utilizadas para el análisis SAGE por el escaso rendimiento en la fase inicial de este procedimiento; se comentará más adelante al hablar de la técnica SAGE.

La valoración de la respuesta tumoral al tratamiento es difícil debido a la escasa sensibilidad de las pruebas de estadificación clínicas, como son la TAC, la ecografía transrectal o la RMN. Como se muestra en la tabla 10, no siempre se dispone de una correcta estadificación preoperatoria lo que hace difícil, tras analizar la pieza quirúrgica, definir quién ha sido buen o mal respondedor. Además, y a diferencia de otros tumores como el carcinoma gástrico o esofágico, en el CR no existe una clasificación con evidencia científica comprobada sobre la que podamos basar la

valoración de nuestra respuesta tumoral al tratamiento con QRT. En este sentido, se eligió el grado de regresión tumoral (GRT) como índice de respuesta terapéutica, cuya valoración hace el patólogo, dada su aparente asociación pronóstica (325). Tras revisar los datos bibliográficos disponibles se definen los distintos grados de regresión tumoral de la siguiente manera: 1. GRT 0/1: Ausencia de regresión tumoral, es decir, no evidencia de respuesta al tratamiento QRT; 2. GRT 2: Se observan células tumorales en igual proporción que los cambios por el tratamiento oncológico; GRT 3: Pocos nidos celulares, predominan los cambios fibróticos del tratamiento QRT y GRT 4: Respuesta patológica completa, ausencia de enfermedad tumoral residual (326). En la tabla 10 queda reflejado el GRT que se obtuvo en los pacientes incluidos.

2. ANÁLISIS EN SERIE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (SAGE)

La técnica SAGE dispone de una modificación llamada microSAGE que permite la realización de SAGE a partir de cantidades ínfimas de tejido. Las pequeñas variaciones frente a SAGE son: la hibridación de unos oligo(dT), unidos a unas esferas magnéticas desde el primer paso de lisado, a la cola de poli(A) característica del ARNm, con lo que apenas se pierde material en los lavados iniciales, y la inclusión de tres ciclos más de PCR para mejorar el rendimiento.

El microSAGE se compone de una serie de pasos que finalizarán en la preparación de una molécula compuesta por múltiples fragmentos de transcritos, siendo cada uno de éstos las etiquetas (*tag*) de los genes que se expresan. La secuenciación de muchas de estas moléculas, denominadas concatémicos, y la identificación de a qué genes representan dará un perfil de expresión génica. En la figura 10 se esquematiza este procedimiento.

2.2. Aislamiento del ARNm

Tras la lisis, se aislará el ARNm aprovechando, para ello, una característica diferencial del ARNm para su aislamiento, esto es, la secuencia de poliadeninas (poliA) en su extremo 3'. Para ello se emplean unas esferas magnéticas unidas a unos oligo(dT) (Dynabeads Oligo(dT)₂₅ de la casa comercial Dynal Biotech) que al complementarse con la cola de poliA específica del ARNm permiten su aislamiento.

Se toman 100µl de la solución de oligo(dT) y se añaden a un microtubo. Gracias a la presencia de las esferas magnéticas y con la ayuda de un imán se retira el sobrenadante, conservando exclusivamente los ARNm. Para favorecer la unión de los oligo(dT) con el ARNm se agita la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. El resultado es el ARNm hibridado por su cola de poliA a los oligo(dT) con las esferas magnéticas.

2.3. Síntesis del ADN de cadena sencilla (ADN copia o ADNc)

Utilizamos el kit comercial SuperScript Choice System de la casa GibcoBRL.

Las propiedades de la enzima SuperScript II Retrotranscriptasa (RT) permiten transcribir la información del ARNm a código ADN. El ADN es más estable que el ARN para su manipulación. Para la obtención del ADNc se prepara una reacción que contiene:

- 18µl del tampón de síntesis de la primera cadena de ADN (5x)
- 9µl 0.1M de DTT
- 4.5µl 10mM de dNTPs
- 54µl de H₂O libre de ARNasas (H₂O DEPC): para evitar la degradación del ARN

La reacción se mantiene 2 minutos a 37°C para su estabilización. A continuación se añade, junto con 3µl de la enzima SuperScript II RT, el ARNm aislado del paso anterior. Se agita periódicamente durante 1 hora a temperatura ambiente.

El resultado es una cadena doble formada por la cadena sencilla del ARNm aislado y la complementaria copiada a código ADN.

2.4. Síntesis del ADN de cadena doble (pasos 1 y 2 de la figura 10)

Continuamos utilizando el kit comercial SuperScript Choice System de la casa GibcoBRL.

Es necesario:

- 90µl del producto del paso anterior
- 465µl de H₂O DEPC
- 150µl del tampón de síntesis de la segunda cadena de ADN (5x)
- 15µl de 10mM de dNTPs
- 5µl de E. Coli ADN ligasa
- 20µl de E. Coli polimerasa I
- 5µl de E. Coli ARNse H

Gracias a las propiedades RNAasa de la enzima E. Coli RNase H, se rompe la cadena sencilla del ARNm en múltiples fragmentos. Cada uno de ellos sirve de molde para que junto a la cadena sencilla de ADN, que se mantiene intacta, se sintetice ADN de cadena doble. La E. Coli ADN ligasa liga los moldes al ADN. La E. Coli polimerasa I avanza la síntesis de la cadena. Se dará lugar, por tanto, a ADN de cadena doble.

Se mantiene la reacción durante 2h a 16°C, lavando, al finalizar, en tres ocasiones con un tampón de lavado. Para eliminar el sobrenadante se sitúa el microtubo, de nuevo, en contacto con el imán.

La cadena doble permanecerá unida a las esferas magnéticas y el sobrenadante puede ser eliminado.

2.5. Digestión con la enzima NlaIII (pasos 3 y 4 de la figura 10)

Este paso se realiza para la ruptura del ADN de cadena doble. NlaIII es una enzima de restricción que corta la doble cadena de ADN cada vez que encuentre su diana, la secuencia CATG. Es importante mencionar que el corte no es en forma roma sino en extremos cohesivos. La probabilidad de que dicha secuencia se presente es de 4^4 , es decir, uno de cada 256 nucleótidos por lo que es un enzima de corte frecuente.

El objetivo de este paso es romper la doble cadena de ADN y disponer de una secuencia lo más cercana posible a la cola de adeninas (poliA, extremo 3'), donde se sitúa la información para identificar cada uno de los genes.

Se prepara la siguiente mezcla:

- 173µl de LoTE (figura 13b): gracias a su contenido en sal protege al ADN
- 2µl de BSA (100x): albúmina para aumentar la eficiencia de la enzima
- 4µl del Tampón dla enzima NlaIII (10x) (comercial)
- 5µl de NlaIII (de la casa NEB)

Se mantiene 1 hora a 37°C y se lava dos veces

3mM Tris-HCl (Ph 7.5) 1mM EDTA (Ph 7.5).en dH ₂ O a 4°C

Figura 11b. Tampón de LoTE

El resultado es la ruptura de la doble cadena de ADN en fragmentos, quedándose con la mínima cantidad posible unida a las esferas magnéticas. Se retira el sobrenadante.

El extremo 5'-3' es menor que el 3'-5' por el carácter del corte cohesivo. Los últimos cuatro nucleótidos de la cadena 3'-5' serán GTAC pues son los complementarios a CATG, que ha cortado por última vez la enzima NlaIII (pasos 3 y 4 de la figura 10).

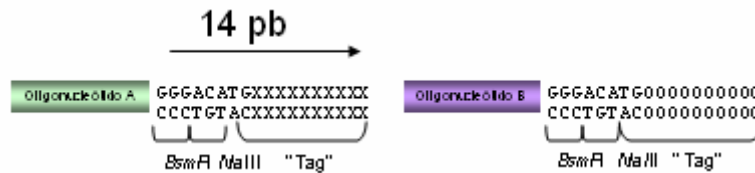


Figura 12. Digestión con BsmFI

A las 10 pb restantes, les llamamos *tag* o etiquetas y son exactamente la secuencia que sirve para identificar cada uno de los transcritos. Es decir, es una secuencia lo suficientemente grande como para que no haya en el genoma otra secuencia de 10pb dispuesta de igual modo. Es una secuencia génica exclusiva, conocida o desconocida (ESTs, *Expressed Sequence Tag*).

La reacción responsable es la siguiente:

	Nuevo Tubo 1	Nuevo Tubo 2
Muestras del tubo 1 y 2 del paso anterior	50% en este tubo	50% en este otro tubo
LoTE	86µl	86µl
Tampón 4 (10x) (NEB)	10µl	10µl
BSA (100X) (NEB)	2µl	2µl
BsmFI 2U/µl (NEB)	2µl	2µl

Se aísla el producto de la digestión, con la ayuda del imán, conservándose ahora el sobrenadante. A continuación se precipita, para separarlo, con etanol al 100% siguiendo la siguiente reacción:

- 133µl 7.5M de NH₄OAc
- 3µl de Glucógeno
- 1000µl de Etanol 100%
- LoTE hasta conseguir un volumen total de 200µl

Gracias a una centrifugación de 14.000 rpm a 4°C durante 30 minutos se obtiene el precipitado. Posteriormente se lava con etanol al 70% y se resuspende en 10µl de LoTE.

Tras este paso, se hacen romos los extremos del ADNc. Para ello se lleva a cabo una reacción con la enzima Klenow de la casa comercial Pharmacia, permitiendo la acción de esta enzima durante 30 minutos a 37°C.

2.8. Unión de los adaptadores (pasos 8 y 9 de la figura 10)

El objetivo es unir la *tag* del adaptador 1 con la del adaptador 2 (formando un *ditag*) (Figura 13).

El programa de PCR es el siguiente:

-1^{er} ciclo: un minuto a 94°C.

-30 ciclos: 30 minutos a 94°C, un minuto a 55°C, un minuto a 70°C.

-Último ciclo: cinco minutos a 70°C.

Se preparan 300 reacciones de PCR para cada genoteca. El producto resultante de la PCR se separa en tres geles de acrilamida al 12% identificando la banda de 100 pb (figura 14).

2.10. Aislamiento de los *ditag*

Los fragmentos procedentes de los 3 geles se recortan de éstos y se precipitan con etanol y acetato de amonio, como en el paso 7. Se resuspenden en 600 µl de Lote y se digieren con enzima NlaIII, para liberar los dos *tag* de los adaptadores 1 y 2.

La reacción de digestión que se lleva a cabo es:

Banda de 100 aislada del gel	600µl
Tampón 4 (10x) (NEB)	70µl
BSA (100X) (NEB)	7µl
Enzima NlaIII	30µl

La reacción se deja a 37°C durante toda una noche.

Tras la digestión se precipita el ADN, como en el paso 7, y se somete a electroforesis en gel de acrilamida al 15%.

Se aísla del gel el producto de 24 pb que corresponde a los dos *tag* (*ditag*) separados de los adaptadores (figura 15).

Banda 100 pb digerida con NlaIII

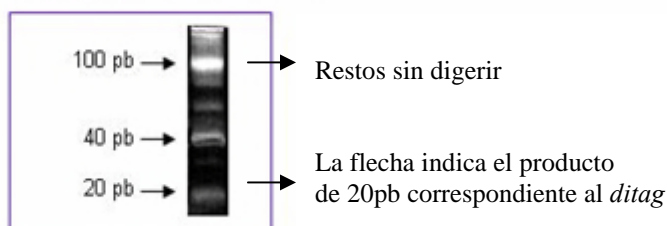


Figura 15.
Electroforesis en gel de acrilamida al 15% con el producto de 100pb tras la digestión por la enzima NlaIII

Este producto se precipita, se resuspende en 7.5µl y se liga entre sí para formar el concatémero.

2.11. Ligación de los *ditag* para formar el concatémero

Para la ligación se prepara la siguiente reacción:

<i>Ditag</i>	7µl
Tampón de ligación (5X)	2µl
T4 ADN ligasa (5U/µl, Gibco BRL)	1µl

Esta reacción se deja durante 3h a 16°C, tras ello se somete a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% y se aísla el concatémero de aproximadamente 800 pb (que se precipitó con etanol al 100%, posteriormente se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 6µl de Lote, como en el paso 7) (Figura 16).

Concatémero:

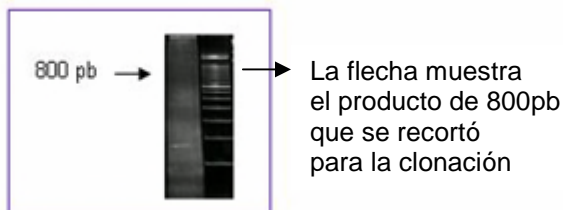


Figura 16.
Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el concatémero de la ligación de las bandas de 20pb

2.12. Ligación del concatémero al vector pZERO (plásmido)

Se utiliza el vector pZERO-1 (Invitrogen) para ligar los concatémeros e introducir este vector en bacterias electrocompetentes (DH10BS Gibco BRL) con gran eficiencia de transformación.

La reacción es:

Concatémeros purificados	6µl
PZERO digerido con SpHI (25ng/µl)	1µl
Tampón de ligación (5X)	2µl
T4 ADN ligasa (5U/µl, Gibco BRL)	1µl

El vector se transforma por electroporación y las bacterias se cultivan en placas de zeozina, para identificar las colonias con inserto. Las resultantes se amplifican por PCR.

2.13. Secuenciación de los concatémeros

Los clones obtenidos se amplifican por reacción de PCR. Para ello se utilizaron los cebadores universales de M13, que están presentes en el vector pZERO flanqueando la zona del inserto.

La reacción es:

10 X PCR Buffer	2.5µl
DMSO (Sigma)	1.25µl
10 mM dNTPs (GibcoBRL)	1.25µl
Primer M13 Directo	0.5µl
Primer M13 Reverso	0.5µl
H ₂ O	18µl
Taq Polimerasa 1U/µl (Biotools)	1µl

Primer M13 Directo: 5'GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'
Primer M13 Reverso: 5'GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3'

Figura 11g.
Cebadores
para la amplificación
de los clones de
concatémeros

El programa de PCR es el siguiente:

-1^{er} ciclo: un minuto a 94°C.

-30 ciclos: 30 minutos a 94°C, un minuto a 53°C, un minuto a 70°C.

-Último ciclo: cinco minutos a 70°C.

Tras ello, se purifican las reacciones utilizando el sistema EdgeBioSystems (Edgebio) sobre una placa de 96 pocillos.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (PCM). Se utilizó un secuenciador multicapilar ABI Prism 3730 (*Applied Biosystems*). Se han obtenido aproximadamente 20.000 *tag* de cada paciente (genoteca). De acuerdo con diversos trabajos, el mínimo de secuencias *tag* que debe componer una genoteca es de aproximadamente 10.000 para que los resultados tengan significado estadístico (25). Así pues, secuenciamos los 10.000 primeros *tag* de las muestras pre-tratamiento y los 10.000 primeros de las biopsias quirúrgicas, lo que hace una cifra global de 20.000 *tag* por cada uno de los tres pacientes, con los que obtuvimos los resultados que se expondrán más adelante.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y SELECCIÓN DE GENES

La generación de las librerías por la técnica SAGE se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de microSAGE, versión 1.0^e, del 22 de Junio de 2000 (disponible en <http://www.sagenet.org>).

La secuencia y la abundancia de cada uno de los *tag* se ha determinado usando el programa informático SAGE 2000 análisis software 4.5 (<http://www.sagenet.org>) (28). Éste crea las genotecas de transcritos y realiza, a su vez, el estudio estadístico que validará los resultados. Para ello emplea el análisis o simulación de *Monte Carlo*. Bajo este nombre se agrupan una serie de procedimientos que analizan distribuciones de variables aleatorias usando simulación de números aleatorios. El Método de *Monte Carlo* da solución a una gran variedad de problemas matemáticos haciendo

experimentos con muestreos estadísticos en una computadora. El método es aplicable a cualquier tipo de problema, ya sea estocástico o determinístico. Generalmente en estadística los modelos aleatorios se usan para simular fenómenos que poseen algún componente aleatorio. Pero en el método *Monte Carlo* el objeto de la investigación es el objeto en sí mismo, un suceso aleatorio o pseudo-aleatorio se usa para estudiar el modelo. Es el método apropiado en situaciones en las que el tamaño muestral es muy pequeño y las variables generadas numerosas.

En el caso de nuestro trabajo, utiliza las proporciones de los *tag* para hacer una simulación y calcular la probabilidad de que se dé la hipótesis nula (que las dos genotecas son iguales y que, por lo tanto, no hay expresión diferencial entre la genoteca previa y la posterior al tratamiento QRT). De forma individualizada, para cada cambio en la expresión de los *tag*, la simulación da un valor final de significación estadística (valor de p), resultado de la comparación entre su nivel pre y post tratamiento. El valor de p establece la probabilidad de que una diferencia de expresión entre las dos genotecas, la pre y la post-tratamiento, sea debida al azar. A medida que este valor de probabilidad se incrementa las diferencias son menos confiables. Por convenio, los grupos que utilizan la técnica SAGE ponen el límite aceptable, para poder confiar en que una diferencia en expresión sea fiable, en un valor de p menor o igual a 0.05. Esto significa que hay hasta un 5% de probabilidades de que la diferencia encontrada sea debida al azar.

El programa presenta el número de genes con diferencias acordes con el valor de p , es decir, que se encuentran expresados de forma diferente entre las dos genotecas con la puntuación que indica el parámetro p . Los datos estadísticos confirman, pues, que el estudio ha tenido éxito. Ello nos permite analizar los *tag* individuales que se expresan de modo diferente entre las dos genotecas.

Para identificar a qué genes corresponden los *tag* encontrados en nuestro estudio, utilizamos la página Web: "SAGE Genie" disponible en la dirección <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>.

A la hora de seleccionar los genes candidatos a resistencias, una vez realizado el análisis estadístico utilizamos el criterio de que su expresión cambiase significativamente en las comparaciones "intrapaciente"; en segundo lugar, hemos evaluado si los cambios en el mismo sentido de sobre-expresión o represión se reproducen en tres o en al menos dos pacientes; y finalmente, hemos considerado su posible valor funcional a partir de los datos procedentes de la literatura. Con estos criterios y tomando el límite de p en menor o igual a 0.05, encontramos un total de 25 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa (se muestran en la tabla 21 de resultados).

Por último, y dada la importancia derivada de los cambios en la expresión génica como mecanismo de resistencia terapéutica, se ha realizado un análisis funcional *in silico* de los genes con cambios significativos ($p < 0.05$) encontrados en cada uno de estos tres enfermos, así como de los 25 genes finalmente seleccionados. El objetivo de este análisis fue intentar relacionar estos cambios dinámicos con alguna vía de señalización oncogénica. Si como posible mecanismo de resistencia terapéutica se aunaran estas modificaciones en la expresión génica en alguna ruta de señalización tumoral, se abriría una nueva línea de investigación enfocada al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas dirigidas precisamente a la reversión de las mismas. Para ello, empleamos la base de datos STRING, disponible en <http://string.embl.de> (327) con la que obtuvimos los resultados que se expondrán más adelante. Adicionalmente se utilizaron las bases de datos <http://alibaba.informatik.hu-berlin.de/methods.html>, <http://amigo.geneontology.org/>, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> y la española <http://www.bioalma.com> sin aportar más información que la base de datos de STRING.

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Las características clínicas y anatomopatológicas de los 25 pacientes incluidos en el estudio se describen en la tabla 11. La media de edad fue de 62 años (rango 34-78). En 14 de 25 pacientes el tumor se encontraba a más de seis centímetros del margen anal. El 16% de los tumores eran cT2, el 59% cT3 y el 11.5% cT4. El 58% de los enfermos tenía ganglios infiltrados en la estadificación clínica, y en la estadificación patológica el 20%. De ellos, en el 14% existía afectación de cuatro o más ganglios.

Todos los pacientes recibieron tratamiento con QT y RT neoadyuvante según el protocolo descrito en el apartado de métodos (figura 8). La media de ciclos administrada previa y posteriormente a la cirugía fue de tres. En el 48% finalmente se practicó una RAB, en el 43.5% una AAP y en el resto una resección local. Se alcanzó una R_{Pc} en el 11.5% de los pacientes analizados. En el extremo opuesto, en un 10% no se obtuvo ningún grado de respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante.

Durante el periodo de seguimiento, los pacientes fueron revisados cada tres o cuatro meses durante el primer año, cada seis meses desde el segundo hasta el quinto año y posteriormente una vez al año. La mediana de seguimiento fue de 47 meses (rango 4-65). Ocho pacientes (33% del total) sufrieron una recaída de la enfermedad. Ésta fue a distancia en 22 enfermos (87%), exclusivamente pélvica en dos casos (8.7%) y hubo un paciente con una recaída mixta (local y a distancia simultáneamente). El tiempo medio a la recaída fue de 21 meses (rango 7-43). La supervivencia libre de enfermedad, a tres años, fue del 77.7% (69.1-86.3) y la supervivencia global, también a tres años, del 90% (86-96).

Tres son finalmente los pacientes sobre los que se centra nuestro trabajo. Los denominaremos paciente A, B y C. Son enfermos que consideramos malos respondedores. Definimos el concepto de mal respondedor en función del grado de regresión tumoral objetivado en las comparaciones de las muestras pre y post-tratamiento. En concreto, presentan un GRT 2 que, como hemos descrito en el apartado de material y métodos, se caracteriza por la presencia de células tumorales en igual proporción que los cambios por el tratamiento oncológico (GRT 2) (326). Además, los pacientes A y B desarrollaron progresión sistémica de la enfermedad, que es en definitiva el dato más definitorio de fracaso terapéutico. Se eligieron los casos con la misma estadificación patológica de la enfermedad (ypT3N0) para disminuir la variabilidad asociada al estadio.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

De los tres pacientes obtuvimos una genoteca de aproximadamente 20.000 *tags*. Así pues, debido a la complejidad del proceso de secuenciación de la técnica SAGE se han secuenciado los 10.000 primeros *tags* de cada una de las tres genotecas, con los resultados expuestos en los anexos 1, 2 y 3, para los pacientes A, B y C respectivamente. En ellas quedan reflejados los genes expresados de manera diferencial y con significación estadística. Se presentan las secuencias de los *tag* individuales, el número de veces que está representado para cada genoteca, el valor de la p, el número de acceso de UniGene para los genes que representan esos *tags* así como la denominación de los mismos. Finalmente, vemos que lo que manejaremos en cada uno de estos tres pacientes son entre 50 y 70 secuencias génicas con un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$), cuyos resultados se exponen en las tablas 12, 13 y 14 para los pacientes A, B y C, respectivamente.

Tabla 12. Secuencias génicas con cambios dinámicos significativos tras el tratamiento QRT en el paciente A

Secuencia <i>Tag</i>	Antes	Después	P
TCCCCGTACA	48	4	0
GGTGGTGTCT	71	23	0
GTTGTGGTTA	34	80	0
TGGAAATGAC	5	37	0
GCAGGGCCTC	86	36	0
ATGTGAAGAG	2	26	1,00136E-05
GGGCTGGGGT	171	104	0,00002
ACTTTTTCAA	57	23	5,99623E-05
CCCATCGTCC	258	185	0,00013
CACCCCTGAT	40	14	0,000249982
GCAGCCATCC	104	63	0,00058
TGCCCTCAGG	10	0	0,000949979
GCCTGTATGA	22	6	0,001434922
GCGCTGGAGT	25	8	0,001930475
GGTTTGGCTT	11	1	0,003008604
AGCAGATCAG	21	44	0,003500462
GCCCCTGCTG	0	8	0,003730655
TACCATCAAT	15	35	0,003859043
CTCCCCAAG	41	20	0,00387013
CTCCACCCGA	26	10	0,004563093
TAGGTTGTCT	28	53	0,004584789
CTGCCAAGTT	8	23	0,005667925
TTGGGGTTTC	12	29	0,007028937
TTGGTCCTCT	42	70	0,007185936
ACATTGGGTG	19	6	0,007210851

Resultados

GAAAAATGGT	15	4	0,007609248
GGGTTGGCTT	41	22	0,008192062
GAGGGAGTTT	72	47	0,009899974
TTCATACACC	13	29	0,011152029
TCCCTATTAA	28	13	0,013469815
GGATTTGGCC	79	54	0,013745666
AAGGGGGCAA	0	6	0,017318964
TTGCTGACTT	0	6	0,017318964
CAATAAATGT	0	6	0,017318964
AGCTCTTGGGA	15	5	0,018875003
GTGCTGGACC	10	2	0,019219637
GGCAAGAAGA	8	1	0,019455194
AACCCGGGAG	29	15	0,019996047
GTGAAGGCAG	47	29	0,020358324
CTTCCTTGCC	2	10	0,023419261
TGCAGTCACT	2	10	0,023419261
AGCACCTCCA	52	34	0,025733352
GCATAATAGG	68	47	0,02575326
GGGCATCTCT	14	5	0,028645039
TTACCATATC	2	9	0,030057073
GTGGTGTGCA	7	1	0,032456994
GAGTGGGGGC	7	1	0,032456994
TGTCTGTGGT	7	1	0,032456994
GCGGCAGCGG	0	5	0,032765388
TAACCAATCA	0	5	0,032765388
CAGTTCTCTG	0	5	0,032765388
TGCAGGCCTG	9	2	0,035423279
GTGGCCACGG	1	7	0,0380373
ATCAGTGGCT	1	7	0,0380373
GACGACACGA	32	19	0,03859508
TCGCCGCGAC	4	12	0,043233871
AGGTCAGGAG	19	9	0,046253443
GAACACATCC	13	5	0,047258973
TGCTGCCTGT	13	5	0,047258973
CCACTGCACT	123	99	0,047370914
CAAGCATCCC	8	2	0,047528505
GCCCCAATA	6	15	0,047915697
CAGCGCGCCC	14	6	0,048520088
CCTCCAGCAG	0	4	0,049652457
TGAGCCCGGC	0	4	0,049652457
GGAGGGATCA	0	4	0,049652457
CTCATCTGCT	0	4	0,049652457
AGCCACCGCA	0	4	0,049652457
CCTCAGGATA	0	4	0,049652457

Antes: N° de veces que se expresa cada secuencia génica antes del tratamiento QRT
Después: N° de veces que se expresa cada secuencia génica después del tratamiento QRT

Tabla 13. Secuencias génicas con cambios dinámicos significativos tras el tratamiento QRT en el paciente B

Secuencia Tag	Antes	Después	P
ACTTTTTCAA	92	23	0
CCCATCGTCC	297	184	0,00001
ATAATTCTTT	29	4	1,33514E-05
GCAGGGCCTC	4	22	0,000166662
TCTCCATACC	36	10	1,27E-04
GGGCTGGGGT	51	90	2,27E-04
GTTGTGGTTA	59	96	0,000769973
GTGCGCTGAG	6	22	0,001177192
CTCCACCCGA	21	5	0,00172921
ATTTGAGAAG	33	12	0,00178349
TGGAATGAC	18	39	0,002449473
AAACTGTGGT	14	2	0,002660473
GGGAGGGGTG	3	15	0,003105839
AGCAGATCAG	20	40	0,004611969
ATGGCTGGTA	25	9	0,006165703
AGCTCTTGGGA	20	6	0,006808241
CGCCGCGGTG	4	14	0,012040099
AAGGGAGCAC	4	14	0,012040099
CTGTTGATTG	13	3	0,01306355
TCCCCGTACA	11	2	0,013428171
GTTTCGTGCCA	18	6	0,015142322
GCCGTGTCCG	7	18	0,016950448
TTCAATAAAA	6	0	0,018742323
CTGCCAAGTT	6	16	0,021723549
CTCCCCAAG	3	11	0,022918979326884
TGTACCTGTA	3	11	0,022918979326884
GCCTGTATGA	17	6	0,023314516
GGGCCGTGGG	0	5	0,030461947
GTCATAGCTG	0	5	0,030461947
AAGGGCAGTG	0	5	0,030461947
ATCAGTGGCT	1	7	0,031841437
GAAGCAGGAC	22	36	0,03249673
TGAGGACACA	5	0	0,03536133
CTCTCACCT	5	0	0,03536133
AAAGTGAAGA	5	0	0,03536133
CAAGGACCAG	9	2	0,036827842
GCTCCCAGAC	3	10	0,03709610303243
TTGGGGTTTC	33	18	0,037693779
CACCTAATTG	39	23	0,038534959
GCCAGCCCAG	5	13	0,040037672
ACATCATCGA	45	27	0,040106455
CGTGGGGTGG	2	8	0,045701504
GTGGCCACGG	2	8	0,045701504

GGGCCAGGA	2	8	0,045701504
GCTGCGCCG	2	8	0,045701504
TCGCCGCGAC	2	8	0,045701504
AGCCCTACAA	49	31	0,045728167
AAGGTGGAGG	32	18	0,046763261
CCACTGCACT	81	100	0,050747223
AGGTGGCAAG	12	4	0,051483154296875
GTTACATTA	4	11	0,051962097

Antes: N° de veces que se expresa cada secuencia génica antes del tratamiento QRT
Después: N° de veces que se expresa cada secuencia génica después del tratamiento QRT

Tabla 14. Secuencias génicas con cambios dinámicos significativos tras el tratamiento QRT en el paciente C

Secuencia Tag	Antes	Después	P
CCCATCGTCC	266	178	0
GGGCTGGGGT	122	60	0
GCAGGGCCTC	52	16	1,00136E-05
GGTGGTGTCT	46	17	6,99759E-05
TCCCCGTACA	29	6	7,99894E-05
TGAAATGAC	10	34	0,00030005
GGATTTGGCC	72	37	0,00030005
GCAGCCATCC	81	48	0,00136137
GTTGTGGTTA	50	86	0,001847744
AGGTCAGGAG	18	4	0,001912594
TCCCTATTAA	18	4	0,001912594
CTGACCTGTG	3	16	0,002735972
GAAGCAGGAC	55	31	0,004073977
CTCCCCAAG	23	8	0,00447309
GCATAATAGG	69	43	0,005334735
GGGAGGGGTG	2	12	0,006062031
AATAGTCCA	19	6	0,00635159
CTTCCTTGCC	5	18	0,00686717
TGCAGGCCTG	9	1	0,009092569
GGGCGCTGTG	0	7	0,009546518
CACCCCTGAT	25	11	0,010100007
GTGACCACGG	6	0	0,01406467
GGAGGGGGCT	6	0	0,01406467
GCGATGGCCG	6	0	0,01406467
ATGTGAAGAG	6	18	0,014186382
AAAACATTCT	1	9	0,014236927
CGCCGCGGTG	12	3	0,014662743
GGTTGGCTT	36	20	0,015847802
AAGGGAGCAC	21	9	0,015994906
CAACATTCCT	0	6	0,016110897064209
GCTGTTGCGC	0	6	0,016110897064209
GAACACATCC	13	4	0,019440174
CCCCCTGGAT	13	4	0,019440174

Resultados

GTTACATTA	3	12	0,020639777
GTCACACCAC	1	8	0,024108052
CAAGGACCAG	2	10	0,025081515
GCGAAACCCC	17	7	0,025354981
CCACTGCACT	104	79	0,026574542
AGGCTACGGA	67	47	0,026602864
CCCGTCCGGA	53	35	0,027137041
TCACCCACAC	4	13	0,027925134
ACCGCCGTGG	5	0	0,02918005
ACCGCCGGG	5	0	0,02918005
GAGTTGGCAG	5	0	0,02918005
AAAAAAAAA	5	0	0,02918005
GTGCTGGAGA	5	0	0,02918005
GCCTGGGCTG	9	2	0,029429078
GGCAAGCCCC	32	52	0,030066133
CGCAAGCTGG	7	1	0,030066133
AGCTCTTGA	14	5	0,030432105
CAAGCATCCC	3	11	0,031113862991333
GCCCCTGCTG	1	7	0,03165555
GTGGCTCACA	1	7	0,03165555
GTGAAACCCT	30	17	0,033388972
AGCAGATCAG	21	37	0,033658743
GTGGTGCACA	0	5	0,033840895
TAGCTCTATG	0	5	0,033840895
CAGGCCTGGC	0	5	0,033840895
GCGGCAGCGG	0	5	0,033840895
GTGCGCTGAG	7	17	0,039714098
AGGTCCTAGC	16	7	0,045808554
TAGTTGAAGT	4	12	0,046189427
GGTGAGACAC	13	5	0,046489953994751
CCGGGTGATG	8	2	0,05285418
TAGGGCAATC	3	10	0,052910089
TGTACCTGTA	3	10	0,052910089

Antes: N° de veces que se expresa cada secuencia génica antes del tratamiento QRT

Después: N° de veces que se expresa cada secuencia génica después del tratamiento QRT

Si agrupamos estos genes por funciones biológicas vemos un predominio claro en la expresión de genes relacionados con la síntesis proteica (20-25%), la respuesta inmune e inflamatoria (8-9%) y los procesos de progresión tumoral (5-6%), la angiogénesis e invasividad (6-10%); sin despreciar una importante proporción de genes relacionados con procesos metabólicos (13.5%) o con una función estructural (6-13%). En las tablas 15, 16 y 17 quedan reflejados la distinta proporción de los genes significativos en cada uno de los pacientes y en las tablas 18, 19 y 20 se enumeran los nombres de los genes con funciones más representativas, también para cada uno de los casos del estudio.

Tabla 15. Paciente A: Función y proporción de genes significativos

Función génica (n: 74)	Número de genes (%)
Síntesis proteica	17 (23%)
Metabolismo	10 (13.5%)
Respuesta inflamatoria/inmune	7 (9.4%)
Progresión celular /tumoral	5 (6.75%)
Angiogénesis/invasión tumoral	5 (6.75%)
Función estructural	5 (6.75%)
Otras	
Estrés oxidativo	3 (4%)
Equilibrio homeostático	3 (4%)
Transducción energía	3 (4%)
Transporte	3 (4%)
Procesamiento ARN	2 (2.7%)
Transducción de señales	1 (1.35%)
Seguridad reacciones xenobióticas	1 (1.35%)
Ciclo celular	1 (1.35%)
Regulación crecimiento	1 (1.35%)
Silenciación cromosoma X	1 (1.35%)
ESTs	6 (8%)

n: número total de genes valorados (p<0.05)

Tabla 16. Paciente B: Función y proporción de genes significativos

Función génica (n: 59)	Número de genes (%)
Síntesis proteica	15 (25.4%)
Función estructural	8 (13.5%)
Angiogénesis/invasión tumoral	6 (10%)
Resp inflamatoria/inmune	5 (8.4%)
Progresión celular /tumoral	3 (5%)
Otras	
Estrés oxidativo	3 (5%)
Equilibrio homeostático	3 (5%)
Ciclo celular	2 (3.4%)
Transducción energía	1 (1.7%)
Transporte	1 (1.7%)
Reparación ADN	1 (1.7%)
Desarrollo	1 (1.7%)
Transducción de señales	1 (1.7%)
Seguridad reacciones xenobióticas	1 (1.7%)
Regulación crecimiento	1 (1.7%)
Silenciación cromosoma X	1 (1.7%)
Transmisión sináptica	1 (1.7%)
ESTs	5 (8.4%)

n: Número total de genes valorados (p<0.05)

Tabla 17. Paciente C: Función y proporción de genes significativos

Función génica (n: 74)	Número de genes (%)
Síntesis proteica	14 (19%)
Metabolismo	10 (13.5%)
Respuesta inflamatoria/inmune	6 (8%)
Función estructural	6 (8%)
Progresión celular /tumoral	5 (6.75%)
Angiogénesis/invasión tumoral	5 (6.75%)
Otras	
Ciclo celular	7 (9.45%)
Estrés oxidativo	4 (5.4%)
Transporte	3 (4%)
Equilibrio homeostático	2 (2.7%)
Transducción energía	1 (1.35%)
Transducción de señales	1 (1.35%)
Seguridad reacciones xenobióticas	1 (1.35%)
Silenciación cromosoma X	1 (1.35%)
Conjugación glutation reducido	1 (1.35%)
ESTs	8 (10.8%)

n: Número de genes evaluados (p<0.05)

Tabla 18. Paciente A: Nombre de los genes relacionados con las funciones más representativas

Función génica	Nombre gen
Síntesis proteica	RPL29, RPL28, RPS24, RPL41, LAMP1P15, RPL27A, RPL2, RPL37, RPL27, RPS3A, EEF2, RPL21, RPL37A, RPL29, WARS, RPS28, RPL19
Metabolismo	UQRCH, KRT5, GAPD, PCYT2, FBX022, KRT17, MMP1, DPP7, PSMB4, UBE2G2
Respuesta inflamatoria /inmune	PSME2, HLA-DR, BAT1, S100A9, BST2, IL17RC, HLA-C
Progresión celular /tumoral	SPARC, SMAD2, LCN2, TFF3, LGALS1
Angiogénesis /invasión tumoral	COL1A1, MMP14, ANGPTL4, HIG2, PH4
Función estructural	TPT1, KALPHA1, ITGB4, COL6A1, SDC1

Tabla 19. Paciente B: Nombre de los genes relacionados con las funciones más representativas

Función génica	Nombre gen
Síntesis proteica	RPS29, RPL29, RPS2, HNRPA1, RPL35A, RPS6, RPL71, RPS24, RPL1, RPL12, RPL19, RPL37A, RPL18A, WARS, EEF2
Función estructural	KALPHA1, HAX1, CFL1, TOMM70A, ZYX, PCYT2, KIFC2, ITGB4
Angiogénesis /invasión tumoral	COL1A1, MMP14, ELMO3, ANGPTL4, PH4, HIG2
Respuesta inflamatoria /inmune	B2M, HLA-C, IGLC2, S100A9, RAT1
Progresión celular /tumoral	SMAD2, TFF3, DPEP1

Tabla 20. Paciente C: Nombre de los genes relacionados con las funciones más representativas

Función génica	Nombre gen
Síntesis proteica	RPL29, RPLP2, RPL28, RPL21, RPS25, WARS, RPS20, RPL19, RPL13, RPL23, EIF2AK1, SNRPD2, RPL10A, EEF2
Metabolismo	UBE2G2, PCYT2, UQCR, MMAB, AASS, UQCRH, DDT, WB5CR21, UQCRB, PSMB4
Ciclo celular	CCNB1IP1, IBRDC2, NASP, SLC25A6, CNC1, HDAC4, SUR02
Respuesta inflamatoria /inmune	B2M, HLA-B, IGLC2, PTMA, HLA-C, BAT1
Función estructural	CFL1, KRT17, LMNA, KRT5, KALPHA1, ITGB4
Progresión celular /tumoral	SPARC, S100A6, DPEP1, SMAD2, TFF3
Angiogénesis /invasión tumoral	COL1A1, MMP14, HIG2, PH4, ANGPTL4

3. PERFIL GÉNICO SIGNIFICATIVO CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL

A partir de estos resultados pretendimos seleccionar aquellos genes con mayores probabilidades de participar con peso en el proceso de las resistencias terapéuticas. En primer lugar utilizamos el criterio de observar los cambios estadísticamente significativos en las comparaciones “intrapaciente”. En segundo lugar, evaluamos si los cambios en el mismo sentido de sobre-expresión o represión se reproducían en tres o en al menos dos pacientes y, finalmente, consideramos su posible valor funcional a partir de los datos procedentes de la literatura. Con estos criterios y tomando el límite de p en menor o igual a 0.05, encontramos un total de 26 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa, que se exponen en la tabla 21. En su conjunto, los genes se regularon unidireccionalmente de la siguiente forma: se encontraron sobre-expresados en los tres pacientes nueve de los 26 genes, y reprimidos siete; sobre-expresados en dos pacientes dos genes, y reprimidos en dos pacientes ocho genes.

Tabla 21. Genes seleccionados por su posible implicación en procesos de RTs y su comportamiento en los pacientes del estudio

Gen	Paciente A Pre/Post (p)	Paciente B Pre/Post (p)	Paciente C Pre/Post (p)	Descripción
SPARC	2/26 (1,00135E-05)	16/18 (0,39625)	6/18 (0,01418)	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
MYO5B	57/23 (≈0)	92/23 (≈0)	54/43 (0.11)	Myosin VB
XIST	4/11 (0,0665)	4/11 (0.056)	3/12 (0,02)	X (inactive)-specific transcript
S100A10	8/13 (0.21739)	2/8 (0,0457)	13/4 (0.01944)	S100 calcium binding protein A10
K-ALPHA-1	4/9 (0,1323)	3/11 (0.02292)	3/10 (0.0529)	Tubulin, alpha, ubiquitous
HLA-C	12/15 (0.4310)	6/22 (0.00118)	7/17 (0.0397)	Major histocompatibility complex, class I, C
COL1A1	5/37 (≈0)	18/39 (0,00245)	10/34 (0.00030)	Collagen, type I, alpha 1
TFF3	26/10 (0.00456)	21/5 (0,00173)	15/15 (0.7)	Trefoil factor 3 (intestinal)
FXYD3	86/36 (≈0)	4/22 (0,00012)	52/16 (≈0)	FXYD domain containing ion transport regulator 3
CKB	40/14 (0.00025)	10/14 (0.23)	25/11 (0.0101)	Creatine kinase, brain
CCNB1IP1	123/99 (0.04737)	81/100 (0,05148)	104/79 (0.0266)	Cyclin B1 interacting protein 1
HIG2	13/14 (0.5348)	9/7 (0.44)	17/7 (0.02536)	Hypoxia-inducible protein 2
PH-4	0/5 (0.032765)	0/3 (0.1165)	0/5 (0.03384)	Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase
CHC1	7/1 (0.032457)	2/1 (0.5)	6/3 (0.22)	Chromosome condensation 1
BAT1	7/1 (0.032457)	3/2 (0.5122)	4/1 (0.1675)	HLA-B associated transcript 1
SELENBP1	15/5 (0.018875)	20/6 (0.0068)	14/5 (0.0304)	Selenium binding protein 1
ANGPTL4	9/4 (0.11)	12/4 (0.052)	5/6 (0.5)	Angiopietin-like 4
SMAD2	258/185 (0.00013)	297/184 (0.00001)	266/178 (≈0)	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
ZYX	8/23 (0.006)	6/16 (0,022)	9/13 (0.3)	Zyxin
GPX2	71/23 (≈0)	13/16 (0.3381)	46/17 (≈0)	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
MMP14	4/10 (0.0815)	3/15 (0.00311)	2/12 (0.006)	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
ITGB4	0/6 (0.017)	3/4 (0.48)	1/5 (0.1035)	Integrin, beta 4
WARS	9/2 (0.0354)	5/3 (0.36992)	9/1 (0.0091)	Tryptophanyl-tRNA synthetase
PCYT2	41/20 (0.0039)	3/11 (0.02292)	23/8 (0.0045)	Phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine
GSTP1	13/10 (0.324)	8/12 (0.2072)	16/7 (0.0458)	Glutathione S-transferase pi
EEF2	52/34 (0.0257)	40/37 (0.48)	45/32 (0.0754)	Eukaryotic translation elongation factor 2

3.1. Análisis funcional del perfil génico seleccionado

Agrupándolos por categorías según la función celular en la que predominantemente destacan quedan los siguientes resultados:

1. Papel en la respuesta inmune: HLA-C, BAT1.
2. Papel en la regulación del ciclo celular: CCNB1IP1, CHC1.
3. Papel en el equilibrio homeostático:
 - 3.1: Función en el reciclaje de membranas: MYO5B.
 - 3.2: Función como reguladores de canales iónicos de membrana: FXYD3, S100A10.
4. Papel en el estrés oxidativo: GPX2, GSTP1.
5. Papel en la angiogénesis: PH4, HIG2, ANGPTL4, COL1A1, MMP-14, ITGB4.
6. Control del citoesqueleto: ZYX, K-ALPHA-1.
7. Papel en la progresión tumoral: SMAD2, SPARC, TFF3.
8. Papel en la síntesis proteica: eEF2, WARS.
9. Otros genes: CKB, PCYT2, SELENBP1, XIST.

Estos mismos resultados se pueden ver en la tabla 22.

Tabla 22. Perfil de 26 genes con su principal función biológica y cambio dinámico objetivado tras el tratamiento QRT

		Paciente A	Paciente B	Paciente C
Respuesta Inmune	HLA-C	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado
	BAT1	Disminuido (NS)	Disminuido	Disminuido (NS)
Ciclo celular	CCNB1IP1	Sobre-expresado	Disminuido	Disminuido
	CHC1	Disminuido (NS)	Disminuido	Disminuido (NS)
Equilibrio homeostático	MYO5B	Disminuido	Disminuido	Disminuido (NS)
	FXVD3	Sobre-expresado	Disminuido	Disminuido
	S100A10	Sobre-expresado	Sobre-expresado	Sobre-expresado
Detoxificación	GPX2	Sobre-expresado (NS)	Disminuido	Disminuido
	GSTP1	Sobre-expresado (NS)	Disminuido (NS)	Disminuido
Angiogénesis	PH4	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado	Sobre-expresado
	HIG2	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado (NS)	Disminuido
	ANGPTL4	Disminuido	Disminuido (NS)	Sobre-expresado (NS)
	COL1A1	Sobre-expresado	Sobre-expresado	Sobre-expresado
	MMP-14	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado
	ITGB4	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)
Función estructural	ZYX	Sobre-expresado	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)
	K-ALPHA1	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado
Progresión tumoral	SMAD2	Disminuido	Disminuido	Disminuido
	SPARC	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado
	TFF3	Disminuido	Disminuido	Sin cambios
Síntesis proteica	eEF2	Disminuido (NS)	Disminuido	Disminuido (NS)
	WARS	Disminuido (NS)	Disminuido	Disminuido
Otros	CKB	Sobre-expresado (NS)	Disminuido	Disminuido
	PCYT2	Sobre-expresado	Disminuido	Disminuido
	SELENBP1	Disminuido	Disminuido	Disminuido
	XIST	Sobre-expresado	Sobre-expresado (NS)	Sobre-expresado

(NS): No estadísticamente significativo

3.2. Variaciones intrapaciente del perfil génico seleccionado

Al tratarse de un estudio ciego del transcriptoma, se identifica un número de genes escasamente caracterizados, y resulta complicado analizar las variaciones intrapaciente de estos 26 genes, algunos con funciones relacionadas y de interés conocido en los procesos tumorales, pero otros muchos con funciones aún por dilucidar y con escaso apoyo bibliográfico. En la tabla 22 se exponen, también, los cambios de expresión tras el tratamiento de cada uno de estos 26 genes de forma individual para cada paciente.

3.3. Variaciones inter-pacientes del perfil génico seleccionado

Más interesantes aún son las observaciones realizadas en la diferente expresión génica “inter-pacientes”. Los resultados, también, los muestra la tabla anterior 22. En la discusión se desglosará la importancia de todos estos genes. Destaca la disminución en la expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular, del equilibrio homeostático, con la defensa del estrés oxidativo, la progresión tumoral o la síntesis proteica. Por el contrario predomina la sobre-expresión de genes relacionados con la inmunidad celular, angiogénesis y el mantenimiento del citoesqueleto.

Se realizó también un análisis funcional, utilizando la base de datos STRING (del inglés, *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), tanto de los 26 genes seleccionados como de cada uno de los genes significativos que resultaron en nuestros tres pacientes. El objetivo era intentar ver si se asociaban con alguna ruta de señalización que pudiera relacionarse con el proceso de resistencia terapéutica.

Quizá por tratarse de un estudio no dirigido, dado el escaso conocimiento funcional no hemos podido encontrar este tipo de asociación. En las figuras 17, 18, 19 y 20 se reflejan estos resultados, para los genes que cambian de forma significativa en cada paciente, y para el global de los 26 genes seleccionados. A través de dicha base de datos se puede ver si existe algún tipo de relación estructural, funcional o de otro tipo entre los genes que introducimos; según se indica por un código de colores en la figura 21. En caso afirmativo existirá una recta, con un código de color en función del tipo de asociación que sea, entre los genes relacionados (ejemplo: S100A9-LCN2, en la figura 17 o SDC1-COL6A1 en la figura 18). Si existiera más de una relación los genes estarán unidas por el correspondiente número de rectas (Ejemplo: HLAB-HLAC en la figura 19). Si no existe relación, cada uno de ellos aparecerá de manera independiente (Ejemplo: PCYT2, SELENBP1, entre otros en la figura 19). Para cada caso concreto de asociación, la base de datos STRING permite acceder al soporte bibliográfico de la misma. El hecho de que se enlacen en cadena varios genes a la vez, no quiere decir que exista una relación directa entre el primero y el último, pues en ese caso debería existir una recta que los uniera específicamente (por ejemplo, en el caso concreto de la figura 17, pudiera interpretarse que entre el gen COL6A1 y TPT1 existe alguna relación en la que participan otros genes intermedios como COL1A1 o FTH1; de haber sido así entre cada uno de los genes existiría una recta de enlace –que como se aprecia no existe-). Es decir, que para cualquier asociación génica va a existir una recta. Cuando entre una serie de genes existen muchas asociaciones lo que se tiende a formar es una especie de red que se aprecia perfectamente en las figuras 17 a 19. Exactamente esa red engloba genes que

codifican para proteínas ribosomales, lo que justifica la gran actividad metabólica y de síntesis proteica que mantienen las células tumorales.

Figura 17. Análisis funcional de los genes con cambios significativos del paciente A

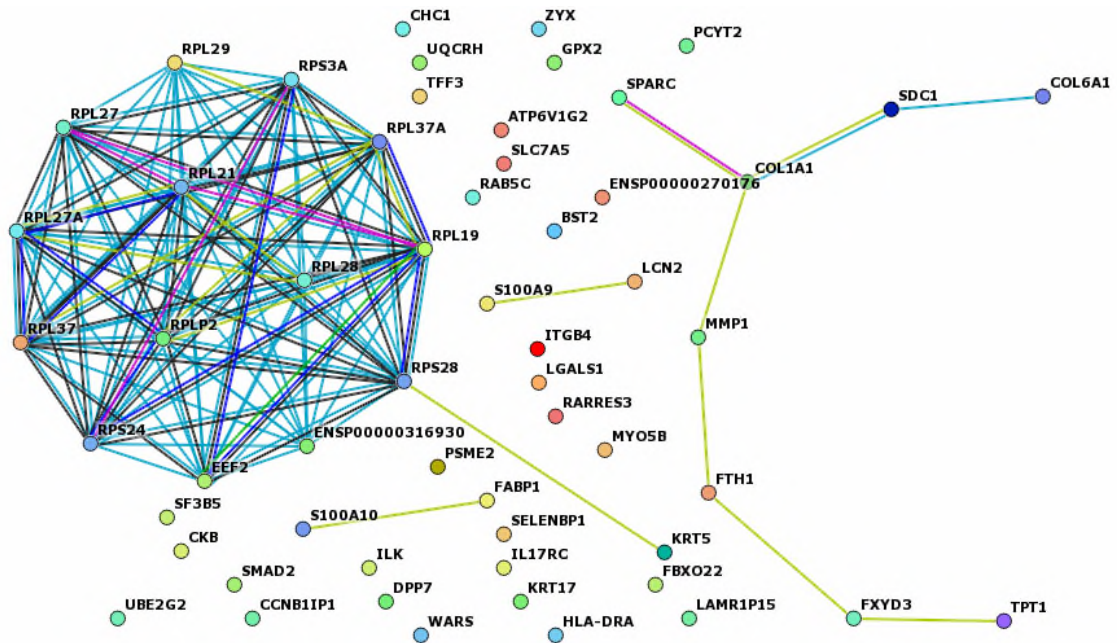


Figura 18. Análisis funcional de los genes con cambios significativos del paciente B

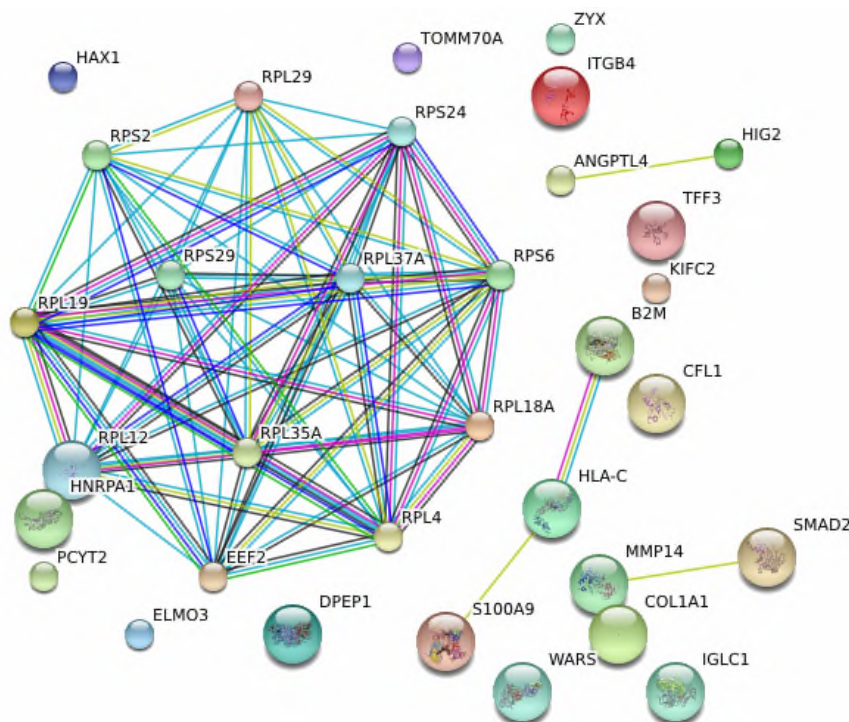


Figura 19. Análisis funcional de los genes con cambios significativos del paciente C

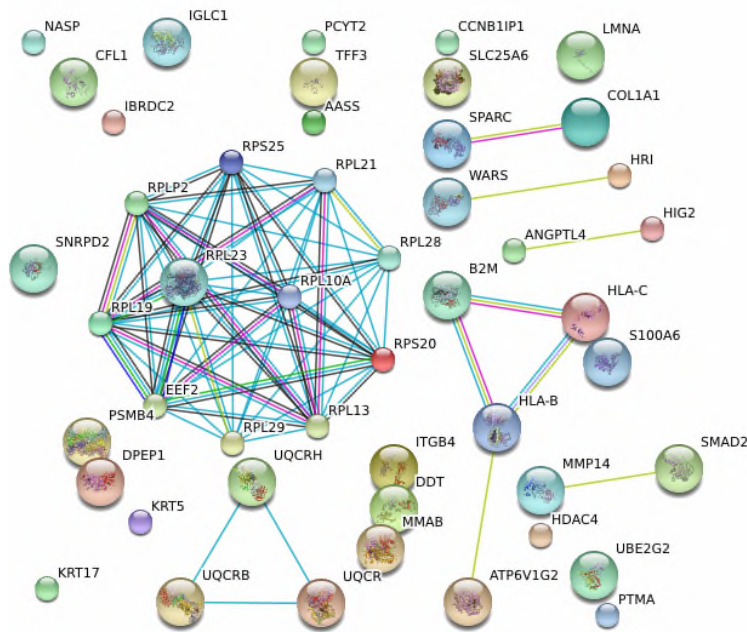


Figura 20. Análisis funcional de nuestro perfil de 26 genes

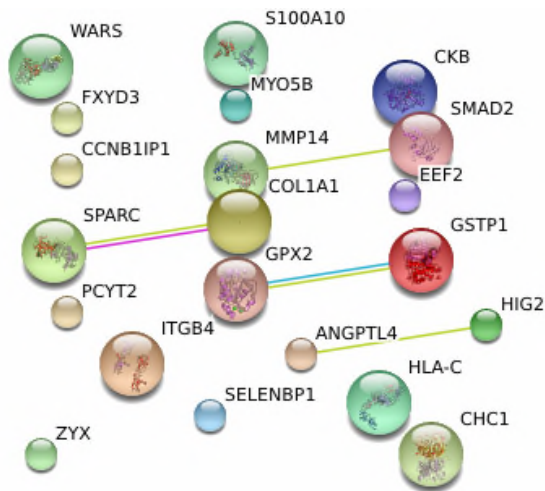


Figura 21. Código de colores para cada tipo de asociación, según la base de datos STRING

- Proximidad en el genoma
- Fusión génica
- Grado de homología o de conservación de la secuencia con otras especies distintas a *Homo Sapiens spp.*
- Co-expresión en *Homo Sapiens spp.* y otras especies
- Datos de relación de estudios *in vitro*
- Relación con algún proceso metabólico
- Mencionadas conjuntamente en alguna publicación
- Homología con otras especies distintas a *Homo Sapiens spp.*

Las principales relaciones funcionales que encontramos en nuestro estudio son por homología o conservación de la secuencia génica con otras especies distintas a *Homo Sapiens spp.* (ejemplo RPS2 y RPL37A), por co-expresión entre *Homo Sapiens spp.* y otras especies (ejemplo RPS29 y RPL37A), por datos derivados de estudios *in vitro* (ejemplo SPARC y COL1A1), por mencionarse conjuntamente en alguna publicación (ejemplo HIG2 y ANGPTL4), y por relacionarse con algún proceso metabólico (ejemplo GPX2 y GSTP1, y el metabolismo del glutatión; o UQCRH-UQCR-UQCRB y la fosforilación oxidativa). No encontramos ninguna relación por proximidad en el genoma ni por fusión génica.

Discusión

La necesidad de desarrollar estudios clínicos que incluyan un largo número de marcadores moleculares, con el fin de predecir las posibilidades de respuesta terapéutica tumoral e investigar posibles mecanismos de resistencia, ha impulsado, en los últimos años, la aplicación de técnicas de alto rendimiento, como los *microarrays* de ADN o el SAGE, en este fin.

1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Dado que la exposición a la QRT induce la expansión clonal de células cancerosas resistentes, la evaluación dinámica de marcadores que se modifican ante dicho tratamiento ha despertado un gran interés, específicamente en el CR (328). El cribaje ciego de genes y el estudio dinámico de los mismos que nos ha permitido hacer la técnica SAGE puede identificar nuevas dianas pronósticas y potencialmente terapéuticas. Las comparaciones de cambios en la expresión génica en un mismo paciente (“intra-paciente”) reducen las fuentes de variabilidad, ofreciendo un interesante contexto para el cribaje de dianas. La gran complejidad de las anomalías genéticas que exhibe el CR sugiere que estudios a gran escala, que criben de forma ciega el mayor número de marcadores posible, pueden ser más informativos que abordajes selectivos en los que se investiguen cambios puntuales en la expresión de unos pocos marcadores.

En este trabajo hemos analizado, mediante SAGE, la expresión del transcriptoma en tres pacientes seleccionados de una cohorte de 25 enfermos diagnosticados de CRLA que recibieron tratamiento QRT neoadyuvante, según el protocolo descrito en el apartado de métodos (figura 8), y que reúnen la característica común de haber mostrado una pobre respuesta al tratamiento preoperatorio con QRT y de partir de una muy similar situación de estadificación clínica (tabla 11). Se han obtenido aproximadamente 20.000 *tag* de cada paciente (genoteca). Como se ha descrito, el mínimo de secuencias *tag* que debe componer una genoteca es de aproximadamente 10.000, para que los resultados tengan significado estadístico (25). Así pues, secuenciamos los 10.000 primeros *tag*, de las biopsias pre-tratamiento, y los otros 10.000 primeros de la biopsia quirúrgica, con los resultados expuestos en los anexos 1, 2 y 3. De este análisis hemos destacado los cambios en la expresión de 26 genes por alterar su expresión significativamente en la comparación “intra-paciente” y, además, por observar un cambio en el mismo sentido de sobre-expresión o represión en dos o en tres pacientes (“comparaciones inter-paciente”) y/o por el interés funcional que dicho gen despierta dentro del proceso de carcinogénesis humana o RTs.

Este estudio pretende cribar de forma no dirigida, como fase previa a posteriores análisis, marcadores moleculares que cambian dinámicamente tras la QRT. Es

evidente que los genes que se han seleccionado habrán de ser confirmados por técnicas alternativas, como *Northern Blot* o PCR cuantitativa múltiple. En concreto, ésta última será la que eventualmente se empleará en una serie más larga de pacientes. Los genes que se confirmen en esta segunda fase habrán de ser validados funcionalmente *in vitro* e *in vivo*. Así pues, con este trabajo se inició un largo y ambicioso proyecto en el que del trabajo multidisciplinar de clínicos y biólogos moleculares se pretende llegar a un mayor conocimiento de los mecanismos de resistencia al tratamiento QRT del CRLA, como base para la identificación de factores predictivos de respuesta y potenciales dianas terapéuticas.

A lo largo de esta discusión, se analizarán las limitaciones inherentes a la metodología empleada, los resultados encontrados y su potencial aplicabilidad clínica.

2. LIMITACIONES METODOLÓGICAS

Antes de analizar los resultados de nuestro trabajo son necesarias unas matizaciones sobre las limitaciones inherentes a la metodología experimental:

2.1. Selección de pacientes con pobre respuesta terapéutica

La valoración de la respuesta tumoral al tratamiento es difícil debido a la escasa sensibilidad de las pruebas de estadificación clínicas, como la TAC, la ecografía transrectal o la RMN. En este trabajo no se empleó la RMN preoperatoria por no realizarse en nuestro centro en el momento de iniciarse el estudio. Esta técnica, como ya se ha mencionado en la introducción, destaca por su sensibilidad para definir la afectación del margen circunferencial del mesorrecto, con lo que mejora la correcta estadificación pre/post tratamiento. Desde el año 2000, y a la luz de diversos trabajos, su empleo comienza a ser un estándar (56). Su tasa de aproximación en la estadificación pre/post tratamiento con QRT, es de un 52% en la T y de un 68% en la N. La mayoría de los fallos son por sobre-estadificación, debido a que no es capaz de discriminar entre fibrosis o persistencia tumoral (329). No obstante, su falta de correlación con los hallazgos patológicos es todavía significativa.

En la serie clínica analizada no siempre se dispone, como se observa en la tabla 10, de una correcta estadificación preoperatorio debido a una insuficiente adherencia a una vía clínica que se instauró progresivamente en los comienzos de este estudio. Ello hace difícil, tras analizar la pieza quirúrgica, definir verdaderamente quién ha sido buen o mal respondedor. Dada esta falta de sensibilidad en la infra-estadificación tumoral, como marcador de respuesta terapéutica, se eligió el GRT (ya definido en material y métodos) como índice de respuesta terapéutica, pues además parece

asociarse con la evolución clínica de los pacientes y es el marcador más aceptado para este propósito (325).

Los 25 pacientes analizados no presentaban la enfermedad en el mismo estadio clínico ni patológico. Sin embargo, los tres pacientes finalmente seleccionados sí parten del mismo estadio clínico que junto con una insuficiente respuesta les hace comparables entre sí. Como iremos mencionando presentan, también, otra serie de características comunes que influyeron en su selección final.

2.2. Reducido número muestral

La selección concreta de tres enfermos de un total de 25 pacientes, y no otros, no es producto del azar. Son tres pacientes de los que disponíamos de un detallado historial clínico y en los que además de haberse administrado el tratamiento QRT neoadyuvante conforme al protocolo, disponíamos de una muestra tumoral tanto pre como post-tratamiento de la calidad suficiente, como para garantizar la realización correcta de su estudio molecular y, lo más importante, mostraban una insuficiente respuesta terapéutica (de hecho sólo los casos de grado de regresión tumoral 4 y 3 con enfermedad mínima residual, en la clasificación de Dworak, parecen asociarse a un claro pronóstico favorable (325)). Pese a que por los datos clínicos pudiera existir algún paciente con peor pronóstico, no se ha elegido por divergir en alguno de estos otros criterios del estudio.

Tres casos no son una cifra representativa de la población, pero el estudio de cambios intrapaciente, es decir, el análisis pre-post en cada paciente, elimina mucha variabilidad irrelevante que aparece al comparar perfiles entre pacientes (derivada de subtipos tumorales, edad, sexo, farmacocinética, etc.).

2.3. Universalidad de los resultados

Pese a que son bien conocidos los beneficios del tratamiento neoadyuvante con QRT del CR, aún no se ha definido cuál es el mejor esquema de QT (330). La mayoría de los trabajos utilizan esquemas basados en 5-FU (5-FU en infusión continua, Capecitabina, UFT® o Raltitrexed) acompañados de una segunda droga (Irinotecán u Oxaliplatino) (331). El esquema terapéutico escogido por nosotros es, pues, una más de las posibles combinaciones terapéuticas apropiadas. Por otra parte, no sólo se incorporan dos agentes quimioterápicos, sino además la RT. Dada la concomitancia de ambos tratamientos no ha sido posible realizar un análisis separado de los cambios desarrollados tras cada tratamiento por lo que es muy difícil saber, a partir de este trabajo, si los cambios encontrados en la expresión de los genes se producen por la

acción de la RT, de alguno de los quimioterápicos en concreto o por todos en su conjunto. Pretendemos así evaluar cambios comunes, que pudieran coincidir en otros esquemas análogos. Estos cambios probablemente están relacionados con mecanismos generales de resistencias, como la modulación del umbral para la apoptosis, más que con mecanismos específicos de refractariedad a dichos agentes concretos. Son fenómenos que se han denominado de “adicción oncogénica”.

Es importante, también, resaltar que no sólo los cambios compartidos entre los tres pacientes pueden ser importantes a la hora de poderlos relacionar con más fuerza con algún mecanismo o proceso de resistencia específico, si no que intrínsecamente, en cada paciente concreto, pueden subyacer mecanismos individuales de resistencia, que no los hace comparables con otros enfermos. La individualización de los tratamientos oncológicos defiende este aspecto importante y real. Existirán rutas oncogénicas cuya activación sea frecuente en la mayoría de los pacientes con CR y mala evolución clínica pero la biología tumoral de los pacientes “malos respondedores” puede ser, evidentemente, muy heterogénea.

2.4. Heterogeneidad de la muestra tumoral

La mayoría de la información que tenemos hoy en día de los mecanismos de resistencia a la QT o a la RT proviene de trabajos en líneas celulares, siendo evidente la limitación que comporta el estudio únicamente del compartimento tumoral, aislado de las señales del estroma y de los tejidos circundantes.

Una de las grandes ventajas de trabajar con muestras de pacientes es que el análisis se realiza de unas condiciones próximas a la realidad clínica, desde el punto de vista biológico, farmacocinético y farmacodinámico. Siempre será discutible cuánto tumor ha de incluirse y es que no está definida cuál es la riqueza de células tumorales más apropiada con la que se debe trabajar. Cuando se manejan muestras clínicas uno de los problemas asociados es la pertinencia o no de enriquecer al máximo la muestra en células tumorales, separándolas del tejido no tumoral (332). La técnica de referencia (*gold standard*), en este sentido, sigue siendo la microdissección (333;334). Comienza a debatirse la necesidad de trabajar con muestras celulares tan puras, ya que el estroma peritumoral se sabe que activa rutas de señalización tan importantes o más que las del propio tumor y que pueden influir en fenómenos de angiogénesis e invasión tumoral (335).

En este estudio consideramos que el interés máximo reside en el análisis biológico del tumor, pero sin ignorar una representación tisular del estroma. Con la macrodissección, técnica empleada por nosotros, garantizamos un enriquecimiento tumoral cercano al 90%, en las biopsias pre tratamiento, y del 75% en las post-tratamiento, desestimando

la microdissección con láser. Esto motiva que los cambios en la expresión diferencial de algún gen concreto, como veremos más adelante, se deba más al mayor predominio de tejido inflamatorio/fibrótico de las biopsias post-tratamiento, como respuesta al tratamiento neoadyuvante, por la diferente proporción tumor/estroma de las biopsias pre/post-tratamiento.

2.5. La técnica

La complejidad de las alteraciones genéticas que caracteriza al CCR sirve de argumento para la puesta en marcha de proyectos dirigidos al estudio de los perfiles de expresión génica, en los que se combinan las tecnologías de alto rendimiento con los datos disponibles de la secuenciación del genoma humano. Estos estudios precisan de un diseño muy riguroso y un análisis detallado de la gran cantidad de datos que generan estas técnicas. La selección de la población a estudiar, el procesamiento de las muestras tumorales o los métodos estadísticos empleados pueden influir en la información obtenida y en la validez del resultado. Por ello, en este tipo de trabajos resulta imprescindible que exista una estrecha colaboración multidisciplinar entre oncólogos, biólogos moleculares y estadísticos.

Hemos seleccionado la técnica SAGE como la de elección para realizar una exploración de los perfiles de expresión génica por sus dos grandes ventajas frente a la tecnología de *microarrays*: su capacidad para analizar de forma cuantitativa y precisa la “totalidad” del transcriptoma del CR, sin limitarse a comparar el nivel de expresión de unos determinados genes previamente elegidos, y la de poder trabajar con cantidades de material tan pequeño como el que ofrece una biopsia rectal tomada por rectoscopia (336). Además no precisa de aparatos sofisticados pudiéndose llevar a cabo en un laboratorio convencional (27). Permite identificar nuevos genes implicados de manera inesperada en el proceso celular a estudio, en nuestro caso los mecanismos de RTs frente a un determinado protocolo terapéutico, utilizando secuencias génicas tan pequeñas como de 10pb (*tag*). Una de las limitaciones importantes, como ya se ha apuntado antes, dada la complejidad y laboriosidad de la técnica, es la imposibilidad de su aplicación a un elevado número de muestras, por lo que debe reservarse para casos del mayor interés clínico y representatividad general, a ser posible.

3. EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Como se describe en los resultados, hemos analizado los genes cuya expresión cambia significativamente ($p < 0.05$), con objeto de cribar las diferencias más claras. En los resultados estadísticamente menos significativos pudiera haber cambios de

expresión de genes importantes funcionalmente, y es que a veces es el balance entre genes, aunque sutil, el que determina el efecto biológico (por ejemplo, apoptosis según ratio bax/bcl-2).

Es tal la cantidad de genes que se regulan diferencialmente en cada paciente que de forma pragmática hemos restringido para su análisis a aquéllos con los cambios más claros (significativos). Los cambios dinámicos en la expresión génica se han considerado más relevantes, de cara a la criba de cambios, cuando la alteración se presentó a) con valor estadísticamente significativo y en el mismo sentido (aumento/disminución de la expresión) en los tres pacientes, b) con valor significativo en uno y una tendencia similar en el cambio, con o sin significación en los otros dos, considerando también el apoyo bibliográfico. El número final de genes seleccionados, de acuerdo a estos criterios, se ha fijado conforme a aspectos logísticos relacionados con los recursos disponibles y el rendimiento de las muestras para su posterior exploración en una segunda fase.

3.1. Cambios dinámicos del transcriptoma tras la QRT

De todo el análisis del transcriptoma seleccionamos 26 genes que, a modo de cribado ciego, están implicados principalmente en mecanismos de inmunidad celular, en el ciclo celular, en el equilibrio homeostático, en el estrés oxidativo, en la angiogénesis, en el mantenimiento del citoesqueleto, en la progresión tumoral y en la síntesis proteica. Existen otros cuatro genes (CKB, PCYT2, SELENBP1 y XIST) con funciones diferentes y no clasificables en ninguna de las categorías anteriores, que también se han analizado.

Estos 26 genes totales, al ser un número asequible, podrán ser explorados para su confirmación en una tarjeta de *Applied Biosystems*, en una futura fase, ulterior a este estudio.

Tal y como hemos planteado en nuestros resultados, la comparación de perfiles de expresión de genes previos y posteriores al tratamiento señalaría cambios en la expresión de aquéllos potencialmente involucrados en el desarrollo de resistencias. La información que hemos obtenido traduce cambios con respecto a un tratamiento QRT concreto.

Se ha intentado realizar, de forma individualizada en cada paciente y también con la selección final de los 26 genes, un análisis funcional con el fin de dar a nuestros resultados una importancia biológica. Quizá sea la selección génica ciega, no cribada, la que no nos haya permitido el unificar los resultados bajo una ruta de señalización concreta que justifica la falta de respuesta a los tratamientos. Como se deduce de las figuras 17 a 20, expuestas en los resultados, hay un predominio muy importante de

genes relacionados con la síntesis de proteínas ribosomales lo que traduce la continua actividad metabólica de las células tumorales. La importancia de este análisis funcional radica en que en oncología el futuro se perfila en el desarrollo de dianas moleculares concretas que por su mecanismo citostático potencien la acción citotóxica de la QT y la RT, y tiene interés conocer, más allá de dianas específicas, rutas involucradas que puedan abordarse a diversos niveles.

Como hemos descrito, también, en el apartado de resultados, se han agrupado estos genes en una serie de subcategorías según la principal función biológica con la que se les relaciona.

1. Inmunidad celular: HLA-C, BAT-1.
2. Ciclo celular: CCNB1IP1, CHC1.
3. Equilibrio homeostático:
 - 3.1: Reciclaje de membrana: MYO5B.
 - 3.2: Reguladores de canales iónicos de membrana: FXYD3, S100A10.
4. Defensa del estrés oxidativo: GPX2, GSTP1.
5. Angiogénesis: PH4, HIG2, ANGPTL4, COL1A1, MMP-14, ITGB4.
6. Control del citoesqueleto: ZYX, K-ALPHA-1.
7. Progresión tumoral: SMAD2, SPARC, TFF3.
8. Síntesis proteica: eEF2, WARS.
9. Otros genes: CKB, PCYT2, SELENBP1, XIST.

Además en la tabla 23 se describen los principales sistemas o genes con los que se puede relacionar a este perfil de 26 genes.

Tabla 23. Características de interés de los genes seleccionados.

Función biológica	Nombre y características del gen	Sistemas o genes relacionados
Respuesta inmune	HLA-C. Receptor superficie celular. Presentación Ag a linfocito T CD8+. Inmunovigilancia.	Ubiquitina-proteasoma: Ubiquitinación del Ag Gen TAP
	BAT-1: Traslación, <i>Splicing</i> ARN, Ensamblamiento ribosómico	TNF- α : Apoptosis.
Ciclo celular	CCNB1IP1: Indirectamente: Relación ciclina B1 (regulación punto de control G2-M).	Aurora A quinasa, p53 y sus dianas (14-3-3 σ y WAF1), Gen HEI10-Ubiquitín ligasa E3.
	CHC1: Fase S: Condensación cromosómica.	Sistema GTP-Ran/GDP-Ran. Importinas α y β .
Equilibrio homeostático	MYO5B. Reciclaje de membrana.	Rab11a.
	FXYD3: Regulador de canal Na,K y Na,H-ATPasa. Supervivencia celular.	
	S100A10. Regulador de canal Calcio.	Sistema de activación del plasminógeno
Detoxificación	GPX2 Protección del daño de peroxidasas. Dependiente del selenio	
	GSTP1. Protección del daño de peroxidasas. Implicado en el metabolismo de platino	
Angiogénesis	PH4. Hidroxilación HIF-1 α	VHL: Degradación vía ubiquitina-proteasoma de $\beta\beta\beta\alpha$.
	HIG2. Gen supresor tumores.	Sistema Wnt/ β -catenina
	ANGPTL4. Pro-angiogénico. Metabolismo lípidos, diferenciación de tejidos adiposos, adaptación al ayuno.	Gen PPAR- γ (antiangiogénico).
	COL1A1. Su proteína: Principal componente del estroma de tumores sólidos. Papel en oncogénesis.	Integrina β 1 y Cdx2. Otros: Proteína-tirosina quinasa, quinasa de adhesión focal, de serina/treonina, de fosfolípidos, GTPasas de bajo peso molecular.
	MMP-14. Degradación de componentes de matriz extracelular, invasión tumoral: proteólisis. Angiogénesis.	β -Catenina.
	ITGB4. Migración celular, adhesión celular, organización del citoesqueleto. Indirectamente activación, diferenciación y proliferación celular	Laminina. P53, p21, p27, c-myc. Otros: Proteína-tirosina quinasa, quinasa de adhesión focal, de serina/treonina, de fosfolípidos, GTPasas de bajo peso molecular.
Función estructural	ZYX Regula polimerización de actina. Papel en oncogénesis.	
	K-ALPHA1. Mantenimiento del contorno celular, formación del huso mitótico, transporte axonal.	Gen APC.
Progresión tumoral.	SMAD2. Segundo mensajero específico vía de señalización TGF- β .	Vía de señalización TGF- β .
	SPARC. Migración y metástasis. Angiogénesis TFF3. Citoprotector. Antiangiogénico.	Alteraciones epigenéticas estroma Src, Rho, STAT3.
Síntesis proteica	eEF2. Fase de elongación síntesis proteica	m-TOR, MAPK.
	WARS. Triptófano t-ARN sintetasa	IFN.
Otros.	CKB: Generación energía a nivel cerebral.	Relación con sistemas que demanden energía.
	PCYT2. Biosíntesis de fosfatidilcolina y etanolamina.	
	SELENBP1. Antioxidante. Regulación de rutas de señalización y supervivencia.	GPX1, PI3K/AKT, ASK1.
	XIST. Único transcrito del cromosoma X inactivo.	BRCA1.

Centrándonos en las variaciones “intra-paciente” encontradas no siempre ha resultado fácil establecer una relación entre los cambios en la expresión de los genes seleccionados y el mal pronóstico y resistencia al tratamiento de estos pacientes, quizá por tratarse la respuesta al tratamiento de un proceso muy complejo resultado de la confluencia de muchas rutas de señalización.

3.2. Estado de activación de los genes seleccionados en nuestros pacientes

3.2.1. Genes relacionados con inmunidad celular: HLA-C y BAT-1

Los genes HLA-C y BAT-1 se han encontrado regulados en los pacientes estudiados. Ambos genes han sido incluidos en la categoría de “inmunidad celular”. El gen HLA-C se encuentra sobre-expresado tras el tratamiento en los tres pacientes y, sin embargo, BAT-1 se encuentra reprimido, aunque sólo en uno de los pacientes de manera estadísticamente significativa. Apoyándonos en los datos disponibles en la literatura, es difícil relacionar la sobre-expresión de los genes relacionados con la inmunidad celular con el mal pronóstico o los mecanismos de quimiorresistencia, ya que lo habitual es encontrar el fenómeno contrario como forma de escape de los fenómenos de inmunovigilancia (337). Recientemente Watson y cols. publicaron un trabajo con *microarrays* de tejidos con 450 enfermos de CCR en el que no encuentran diferencias en los tiempos de supervivencia en los casos con sobre-expresión de moléculas MHC de clase I, familia a la que pertenece HLA-C, o en los contrarios, posiblemente debido a que la tarea de inmunovigilancia sea desempeñada, en estos últimos casos, por el sistema *natural killer* (338). Son necesarios más estudios para conocer el sentido de la sobre-expresión de HLA-C encontrada en nuestros resultados.

Sí es concordante con la bibliografía la represión de BAT-1 presente en los tres pacientes. BAT-1 es un importante regulador negativo de la producción de citoquinas inflamatorias, especialmente TNF- α (339). Por tanto, la represión de BAT-1 da lugar a un aumento de la producción de TNF- α . TNF- α es una citoquina pro-crecimiento celular. Se ha descrito que el aumento de TNF- α se comporta como un mutágeno endógeno que produce transformación celular, este efecto lo lleva a cabo a aumentando la producción de ROS (340). En conclusión, la represión de BAT-1 favorecería la inducción de mutaciones que pudiera estar interfiriendo con los mecanismos de inducción de apoptosis mediados por el tratamiento.

3.2.2. Genes relacionados con la regulación del ciclo celular: CCNB1IP1 y CHC1

Los genes CCNB1IP1, también llamado HEI10, y CHC1 se encuentran reprimidos en nuestros pacientes. Ambos genes están implicados en el control de ciclo celular. Resulta lógico que entre los genes con cambios de expresión más significativos, tras el tratamiento, encontremos algunos implicados en la regulación del ciclo celular, dado que las células resistentes lo sean por tener alteraciones en las rutas de activación de apoptosis y de control del ciclo celular. Se ha descrito que HEI10 regula negativamente la invasión celular por inhibición del complejo ciclina B/Cdk1, que principalmente actúa en el punto de control G2/M. De hecho, células tumorales a las que se ha inactivado la expresión de HEI10 presentan una capacidad de migración y de invasión más efectiva (341). En este sentido, nuestros resultados, concordantes con lo encontrado en líneas celulares, son los primeros que relacionan la modulación de este gen en tejidos humanos de CCR y el contexto de su respuesta al tratamiento. CHC1, también llamado RCC1, es un regulador de la condensación cromosómica durante la fase S del ciclo celular, por tanto su regulación a la baja podría estar interfiriendo el control del ciclo celular. No hay datos en la bibliografía que relacionen a este gen con la respuesta al tratamiento.

3.2.3. Genes relacionados con el control del equilibrio homeostático: MYO5B, FXYD3 y S100A10

Estos tres genes presentan una modulación significativa en los pacientes estudiados. Deben de tener un papel estructural en la célula ya que se encuentran muy representados, especialmente los dos primeros.

MYO5B, que se encuentra reprimido en los tres pacientes, está implicado concretamente en el proceso de reciclamiento de membranas. El proceso de internalización y reciclado de la membrana plasmática es fundamental en la célula ya que por él se regula el tráfico de receptores, canales iónicos o bombas de membrana. Además, la regulación de este proceso permite el mantenimiento de una correcta composición de las membranas (342). Es fácil deducir que una alteración de las membranas pueda influir en procesos como la motilidad celular y, por tanto, estar implicada en procesos como la invasión celular. Sin embargo, no hay datos bibliográficos que relacionen este gen con los mecanismos de resistencia a tratamientos oncológicos.

FXYD3, también llamado MAT8, se encuentra reprimido significativamente en dos de los pacientes y sobre-expresado en el otro. Codifica para una enzima que regula los canales iónicos en las células de la mucosa intestinal. De la misma forma, S100A10,

que se ha encontrado sobre-expresado en un paciente y reprimido en los otros dos, se trasloca a la membrana plasmática desde donde también desarrolla funciones relacionadas con la regulación de canales iónicos. No es de extrañar que si consideramos a las células tumorales como células que han perdido sus uniones intercelulares y con una polaridad alterada, exista un mal funcionamiento de las ATPasas de los canales iónicos de membrana vitales para su supervivencia. Una modificación en la expresión de los reguladores de las mismas, potencia la falta de control en el equilibrio iónico y la pérdida de las uniones intercelulares. En definitiva, permite a la célula tumoral proseguir su camino de proliferación descontrolada. Respecto a las respuestas a los tratamientos, Kaye y cols. han mostrado la falta de relación entre los cambios en la expresión, en su caso sobre-expresión de FXD3 en cáncer de páncreas, y la sensibilidad de las células a 5-FU, Cisplatino o Gemcitabina (343). La posible relación que sugieren nuestros resultados entre estas proteínas reguladoras de canales iónicos y la respuesta a los tratamientos requerirá de estudios posteriores.

3.2.4. Genes relacionados con la defensa del estrés oxidativo: GPX2 y GSTP1

Estos genes se encuentran reprimidos en dos de los casos y sobre-expresados en el otro. Resulta lógico que genes implicados en esta función se encuentren estrechamente regulados ya que la alteración en la producción de ROS, secundaria a cambios en la expresión génica, lleva a modificaciones en el equilibrio químico celular. Esto tiene diversas consecuencias para la célula. La producción aumentada de estas especies se ha implicado en la carcinogénesis colorrectal (344). Probablemente el balance entre activación de carcinógenos y detoxificación sea un árbitro crítico del riesgo de un individuo de desarrollar CCR (345). También, en el contexto de la respuesta al tratamiento, se ha descrito que la mayor parte de los quimioterápicos llevan a cabo su acción a través de la inducción de dichas especies, que en un número limitado inducen muerte celular (283;346).

Así pues, los efectos causados por estas especies químicas pueden ser contrarios dependiendo de la cantidad de ellas que se produzcan. La regulación de este proceso resulta crucial para determinar el grado de respuesta a los tratamientos.

3.2.5. Genes relacionados con angiogénesis: PH4, HIG2, ANGPTL4, COL1A1, MMP-14, ITGB4

La modulación encontrada en los genes de control de angiogénesis revela la importancia de este proceso en la resistencia al tratamiento y en el pronóstico de los pacientes. La angiogénesis es un proceso fundamental para el desarrollo tumoral que consiste en la formación de nuevos capilares para llevar oxígeno a las células tumorales. La hipoxia en el tumor favorece la síntesis de factores angiogénicos que activarán el proceso de formación de neovasos.

Uno de los reguladores de la respuesta celular a la hipoxia es el gen PH4. Éste actúa a modo de “sensor” de oxígeno. Cuando este elemento está presente en cantidad adecuada, se induce expresión de PH-4, que evita la activación de la respuesta angiogénica lanzada por la hipoxia. En los pacientes que hemos estudiado, la expresión del gen PH-4 se encuentra aumentada tras el tratamiento. Esta sobreexpresión de PH-4, en apariencia discordante con la resistencia al tratamiento, podría explicarse dado que la angiogénesis es un proceso muy complejo activado por distintas rutas de señales y no se puede justificar analizando el estado de activación de un único gen implicado en el proceso.

El gen HIG2, originalmente identificado como un gen inducido por hipoxia, se encuentra reprimido en dos de los pacientes y no se modifica en el tercero. El producto de este gen actúa como un factor de crecimiento tumoral. HIG2, en su región promotora, tiene un sitio de unión a β -catenina. Por tanto, la activación de la ruta Wnt/ β -catenina, implicada en la carcinogénesis del CCR, induce la expresión de este gen (347). La disminución de su expresión que hemos encontrado no se puede explicar por los datos encontrados en la bibliografía. Sin embargo, podría ser uno de los mecanismos utilizados por el tratamiento para reducir el número de células tumorales.

Se ha descrito que el gen ANGPTL4, también conocido como HFARP, es un regulador negativo de la angiogénesis. Este gen está reprimido en dos de los pacientes y no parece cambiar en el tercero. ANGPTL4 es capaz de inducir apoptosis de células endoteliales y disminuir la expresión de metaloproteinasas de matriz (348). *In vivo*, algunos autores han encontrado que inhibe la angiogénesis inducida por VEGF en diversos tumores (348). Galaup y cols. han demostrado que ANGPTL4, a través de su acción en las células tumorales y vasculares, es capaz de impedir el proceso metastásico por inhibición de la actividad vascular así como de la motilidad de las células tumorales (349). Por tanto, la disminución de la expresión de este gen confiere al tumor una ventaja para la capacidad de invasión y la angiogénesis.

Los cambios en la regulación de los genes COL1A1 y MMP14 pudieran estar implicados en procesos como la rotura de la membrana basal y la degradación de la matriz extracelular. Ambos genes se encuentran sobreexpresados en los tres pacientes. COL1A1 codifica el componente más importante de la familia del colágeno de tipo I, a su vez principal elemento de la estructura fibrilar del estroma de la mayoría de los tumores sólidos, entre ellos el CCR. Tiene un papel en la diseminación tumoral, dado que induce cambios fenotípicos en las células del epitelio colónico, a través de la ruta de señalización de integrina-Beta1. La represión de la expresión de COL1A1 se ha descrito previamente mediada por la metilación del promotor de dicho gen descrita en algunos tipos de cáncer, lo que conlleva una disminución de la formación de colágeno que facilitaría el proceso de degradación de la matriz extracelular y, por tanto, la invasividad de las células tumorales (350). Sin embargo, la sobre-expresión que se ha encontrado en los pacientes del estudio, podría deberse a la formación de colágeno por la fibrosis reactiva post-tratamiento. MMP14 es una proteasa de la matriz extracelular que se expresa preferentemente en el frente de migración tumoral. Activa el proceso de degradación de la membrana basal (Theret, 1998 427). Recientemente Jiang y cols. han publicado un trabajo en el que no sólo *in vitro* sino en clínica muestran cómo la sobre-expresión de MMP14 se relaciona con tumores de mayor agresividad y, por tanto, de peor pronóstico (351). Existen, también, distintos trabajos que relacionan a esta proteasa con el proceso de progresión tumoral (352;353). En este sentido nuestros resultados son concordantes y relacionarían la resistencia tumoral con el proceso de invasión y de angiogénesis.

Por último, el gen ITGB4 se ha encontrado sobre-expresado en nuestros pacientes, aunque sólo en un caso de manera significativa. Este gen codifica para el principal receptor de la laminina y desempeña un papel estructural crucial en la formación y el mantenimiento de los hemidesmosomas de las células epiteliales. Está, por tanto, implicado en los fenómenos de adhesión dinámica y migración de las células tumorales. Se encarga de mantener la integridad de los epitelios. Se ha descrito que la expresión de esta integrina aumenta en la mayoría de los carcinomas invasivos (354;355). Esto evidencia su implicación en la migración celular en las células epiteliales malignas. La sobre-expresión encontrada en nuestros resultados justificaría un fenotipo muy invasivo y agresivo de las células tumorales resistentes al tratamiento.

3.2.6. Genes relacionados con el control del citoesqueleto: ZYX, K-ALPHA-1

El control de citoesqueleto también es un proceso clave para el correcto equilibrio de la célula. Los genes ZYX y K-ALPHA-1 se han encontrado sobre-expresados después

del tratamiento en los tres pacientes, aunque en algún caso el resultado no es significativo.

ZYX está implicado en el control del ensamblado de actina. El aumento de la expresión de esta proteína se ha relacionado con un fenotipo más agresivo en diferentes tumores (356;357). Se ha descrito que la interferencia de su expresión en células de carcinoma hepatocelular, disminuye la migración celular, implicando a esta proteína en el proceso de motilidad celular (358).

El gen K-ALPHA-1 codifica para alfa tubulina, una de las dos subunidades de la tubulina. El ensamblado y desensamblado de la tubulina es un proceso fundamental para la correcta formación del uso mitótico durante la mitosis. Por tanto, es lógico encontrar alteraciones en los genes implicados en la codificación y ensamblado de las cadenas de tubulina, si bien, se desconoce el efecto que en el contexto del tratamiento tiene un aumento de ambos genes.

3.2.7. Genes relacionados con el proceso de progresión tumoral: SMAD2, TFF3 y SPARC

Los dos primeros genes presentan una represión estadísticamente significativa.

SMAD2 es una proteína que media la señalización de TGF-B. TGF-B es una citoquina que controla el crecimiento, la fibrogénesis y la respuesta inmune celular (Yamagata, 2005 535 /id). La disminución de la expresión de SMAD2 impide la regulación mediada por TGF-B lo que confiere una ventaja proliferativa a las células del tumor. Sin embargo, no hay datos en la literatura que lo relacionen con resistencia terapéutica.

TFF3 es producido específicamente por las células caliciformes del intestino y está involucrado en el mantenimiento de la integridad del epitelio gastrointestinal. TFF3 se ha encontrado sobre-expresado en gran variedad de tumores asociándose a invasión, progresión, angiogénesis y resistencia a apoptosis (359). Analizando mediante la técnica de *arrays* de ADNc se ha encontrado que TFF3 está sobre-expresado en tumores primarios como metastásicos de próstata frente al tejido normal o la hiperplasia benigna (360). La represión de la expresión de TFF3 encontrada, en apariencia discordante, con la inducción en las células de un fenotipo más agresivo, requeriría otros estudios incluyendo un número mayor de muestras. Nuestro grupo de investigación ha optado por estudiar más exhaustivamente este gen, dado las funciones tan importantes que tiene.

SPARC, también conocida como osteonectina, es una proteína de la matriz extracelular. Entre sus funciones conocidas destacan la de reducir la adhesión celular interfiriendo en el proceso de migración celular, modular la proliferación celular inducida por factores de crecimiento y el fenómeno de angiogénesis, de ahí el interés

que empieza a despertar como potencial diana terapéutica en Oncología (361). Recientemente se ha comunicado un peor pronóstico en pacientes con CCR y disminución en la expresión de SPARC por silenciamiento epigenético del gen (hipermetilación del promotor) comparado con pacientes con expresión génica normal (362). Nosotros hemos encontrado una sobre-expresión en los tres pacientes; se necesitan más trabajos que lo relacionen con los mecanismos de resistencias terapéuticas.

3.2.8. Genes relacionados con la síntesis proteica: eEF2 y WARS

Los genes eEF2 y WARS que hemos incluido en la categoría “síntesis proteica” se han encontrado reprimidos en los tres pacientes.

La proteína eEF2 se activa por fosforilación a través de eEF2 quinasa (eEF2K) que se ha encontrado muy aumentada en líneas celulares de cáncer como corresponde a células en proliferación, así como en la fase S del ciclo celular. El por qué exige tanto control radica en que la fase de elongación de la síntesis proteica implica un gran consumo energético que en ocasiones hay que disminuir para derivar la utilización de la energía a otros eventos (363). Existen trabajos que implican al sistema de ubiquitina-proteasoma en la regulación del nivel intracelular de eEF2K. También puede ser activada por la fosforilación mediada por m-TOR y por MAPK en respuesta a estímulos proliferativos (364). Por tanto, en el caso de eEF2 su regulación mediante modificaciones de la expresión del gen, deben ser de menor importancia, dado que está bien establecida su modulación por fosforilación. La represión que encontramos en nuestros resultados puede no estar afectando de forma significativa a su función en la elongación proteica.

WARS es una aminoacil-tARN sintetasa que cataliza la formación de triptófano-tARN. Se ha descrito la posible implicación de esta sintetasa en la síntesis proteica de moléculas relacionadas con las rutas de inhibición de angiogénesis (365). La represión de la expresión de este gen encontrada en nuestro resultado podría estar explicando una ventaja en la activación de las rutas de angiogénesis.

3.2.9. Otros genes: CKB, PCYT2, SELENBP1, XIST

La proteína codificada por CKB está implicada en la regeneración del ATP celular. Es esencial para mantener la energía celular de tejidos y células sometidas a fluctuaciones de energía, como le ocurre a las células tumorales. En dos de los pacientes se ha encontrado una represión de la expresión de este gen. Los datos bibliográficos disponibles han planteado que la sobre-expresión de CKB ofrece

ventajas de supervivencia en situación de privación de oxígeno y glucosa (366). Por tanto, no conocemos el sentido que tiene la represión de este gen encontrada en nuestros resultados.

El gen PCYT2 se ha encontrado sobre-expresado significativamente en dos de los pacientes y reprimido en el otro. PCYT2 participa en la biosíntesis de las membranas celulares. El aumento de la proliferación de las células tumorales requiere de la biosíntesis de membrana. Por tanto, la sobre-expresión de este gen ofrece ventajas proliferativas al tumor.

El gen SELENBP1 codifica para una proteína de unión del selenio. Aunque se desconoce la función exacta de este gen, dada la importancia del selenio como nutriente esencial con propiedades antineoplásicas, se ha encontrado implicado en modulado en tumores. En CCR, Kim y cols. encuentran una disminución de los niveles de la proteína SELENBP1 en el 85% de los CR analizados. Consideran que la disminución de la expresión de esta proteína es un acontecimiento frecuente y tardío dentro de la carcinogénesis colorrectal y se asocia con peor pronóstico (367). Nuestro resultado es congruente dado que se ha encontrado una disminución de la expresión de este gen en los tres pacientes estudiados.

El gen XIST es un gen no codificante, único gen que transcribe el cromosoma X inactivado en la hembra de los mamíferos. En nuestro caso hemos encontrado que este gen está sobre-expresado. En este caso, de forma similar a lo que ocurre con SELENBP1, no se conoce la función de XIST, pero se ha encontrado relación entre sus niveles de expresión y la sensibilidad al tratamiento con Paclitaxel en células de cáncer de ovario (368). No hay datos que relacionen a XIST con el proceso tumoral en CCR ni con la respuesta al tratamiento.

No existen estudios análogos a este. Lo más parecido son los trabajos en líneas celulares, tratados fuera del contexto clínico. En la tabla 24 se muestra la situación, encontrada por nosotros, de algunos de los genes que más se mencionan en los estudios de perfiles génicos en CCR. Como vemos buena proporción de ellos no aparecen expresados, ello puede deberse a una ausencia real de los mismos o a un defecto en su secuenciación considerando que seleccionamos los 10.000 primeros *tag*. Se trata de un hallazgo importante dado que este es el primer estudio que analiza, de forma precisa y extensa, el transcriptoma del CR antes y después del tratamiento preoperatorio. Serán necesarias más investigaciones que corroboren estos hallazgos.

Tabla 24. Situación funcional, en nuestro trabajo, de algunos de los genes más mencionados en la literatura

Secuencia tag	Paciente A antes/después (p)	Paciente B antes/después (p)	Paciente A antes/después (p)	Gen
TGTCCTGGTT	1/1 (0,68027210235595)	3/1 (0,3314)	0/2 (0,28)	P21
AAATCAGCAA	-	-	-	EGFR
ATGTAGAGTG	-	3/2 (0,51216)	0/2 (0,28)	TS
AGGGCCGACT	-	2/0 (0,25688)	1/1 (0,704)	KI-67
TGTGTGGAGA	-	-	-	BCL-2
GGCATTITTC	-	-	-	BAX
GGAACAACA	16/8 (6,024098396E-02)	5/6 (0,46645)	8/4 (0,19)	CD24
TTGATGTTGA	-	-	-	APACD
TCCCCACAGT	-	-	-	IF2
TTTTGTAGAG	-	-	-	P53
TTTCCAATCT	-	-	-	VEGFA

Estudios de perfiles basales en líneas celulares colorrectales encuentran genes sobre-expresados tras la exposición a 5-FU, a través de p53, como timosina β -10 (con función estructural), SSAT (implicado en el metabolismo de las poliaminas espermita y espermidina), MAT8 (también llamado FXD3) y anexina II (expresados en las superficies celulares) o chaperonina 10 (gen mitocondrial) (39). Todos estos genes poseen un sitio de unión para p53, lo que explica que este gen regule su expresión cuando son inducidos por 5-FU. De todos estos genes en nuestro trabajo encontramos que FXD3 se encuentra reprimido significativamente en dos de los pacientes y sobre-expresado en el otro, si bien debido a nuestro diseño no lo podemos relacionar tan claramente con un efecto exclusivo de la QT.

Boyer y cols. realizaron, con *microarrays* de ADN, el primer trabajo de cambios dinámicos en la expresión génica tras la exposición de 5-FU y Oxaliplatino a líneas celulares de CCR. Destaca nuevamente SSAT, que como en el trabajo de Maxwell y cols. antes mencionado, aparece sobre-expresado tras la exposición celular a 5-FU y Oxaliplatino, en células sensibles, y sin cambios en la sobre-expresión basal en células resistentes. Del resto de los genes encontrados, es reseñable BAT1 por coincidir con nuestro trabajo. Boyer y cols. mostraron una sobre-expresión del mismo en respuesta a los tratamientos. En nuestros tres pacientes se observa un descenso de su expresión (369).

Mariadason y cols. emplearon un panel de 30 líneas celulares específicas de CCR para identificar genes que, al igual que los trabajos anteriores, se relacionaran con la respuesta a 5-FU. Inicialmente con una estrategia de validación interna o cruzada ("*leave one out*"), identificaron 50 genes que predecían esta respuesta. Entre ellos: genes implicados en la replicación y reparación de ADN, en el procesamiento y tráfico de proteínas, y en apoptosis. Es destacable el gen Bak, pro-apoptótico, y cuya sobre-expresión guardaba una correlación positiva con la respuesta a 5-FU. Este hallazgo

fue validado demostrando que Bak, tras el tratamiento, pasaba a localizarse en el interior de la mitocondria, lo que lo relacionaba con la liberación del citocromo C y el fenómeno de apoptosis. Guardaron una correlación negativa con la respuesta a 5-FU genes implicados en el metabolismo de los folatos. En este trabajo no se establecieron relaciones entre el estado de p53 o de MMR y la respuesta a 5-FU. Un reanálisis posterior identificó, con la información generada por el propio *array* de ADN, otra firma génica de 149 genes capaces de predecir respuesta a CPT-11 (37). Dos son los genes comunes para nuestro trabajo y el de Mariadason y cols.: RPL28 y RPL27A. En definitiva, genes ribosomales que traducen el intenso metabolismo de la célula tumoral. No hay datos disponibles de la implicación de los genes ribosomales en los procesos de RTs, dada la gran representación que tienen en nuestro trabajo pudieran ser una línea de futura investigación.

La proteína SPARC desempeña diversas funciones en células normales muchas de las cuales se relacionan con el desarrollo tumoral. Tai y cols. demostraron que una modificación en la expresión de SPARC, ya sea *in vitro* o *in vivo*, modificaba la sensibilidad de una línea celular de colon a la QT, ya sea con 5-FU o Irinotecán, y a la RT lo que permitía un incremento de la apoptosis a nivel tumoral (21). Otros autores la relacionan con el desarrollo de metástasis pulmonares en líneas celulares de cáncer de mama. En este sentido destacar que dos de los tres pacientes de nuestro trabajo desarrollaron metástasis pulmonares. En concreto, en uno de ellos (paciente A) la sobre-expresión de SPARC tras la neoadyuvancia es muy significativa. Se necesitan más trabajos que corroboren la relación de SPARC en la progresión pulmonar de otros tumores, como el CR (370).

Watanabe y cols. publicaron el primer trabajo con *microarrays* de ADN con el que intentan predecir respuesta a la RT en CR. La pieza era válida para la extracción de ARN si el contenido en células tumorales era del 70%. 52 pacientes recibieron RT preoperatoria (50.4Gy) y se consideraron respondedores si se objetivaba un GRT 2 ó 3 y no respondedores si el GRT era de 0 ó 1. Se pudo definir un perfil de 33 genes relacionados con factores de crecimiento, transducción de señales, apoptosis o proliferación celular. Los relacionados con apoptosis, como lumican, trombospondina 2 o galectina-I, predominaban en pacientes respondedores y otros inhibidores de apoptosis, como ciclofilina 40 o glutation peroxidasa, en no respondedores. En concreto la sobre-expresión de GPX2, en no respondedores, era un factor predictivo de resistencia a la RT con un poder de discriminación del 82.4%. La inducción de rutas de apoptosis, por el contrario, se consideraba un factor determinante de respuesta a la RT (44). Con respecto a GPX2 nosotros lo encontramos reprimido en dos de los casos y sobre-expresado en el otro. Es un dato concordante con el trabajo de Watanabe y

cols., si bien no podemos establecer que sea un factor predictivo de resistencia a la RT. Otro trabajo representativo es el de Ghadimi y cols. Reunía 30 pacientes del estudio alemán CAO/ARO/AIO 94 que recibían tratamiento QRT pre-quirúrgico con 5-FU y RT. El esquema de tratamiento era 50.4Gy de RT junto con 5-FU 1000mg/m² los días 1 a 5 y 28 a 33. Se consideró respuesta si el GRT era de 3 ó 4, y no respondedores el resto de los grados. En 23 pacientes se pudo definir un perfil de 53 genes por *microarrays*. Con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 86%, se podía definir la probabilidad de respuesta o no respuesta, respectivamente. Los genes que constituían dicho perfil se podían agrupar bajo las siguientes funciones: relacionados con el transporte de membrana, con la señalización celular, con rutas de reparación frente al daño al DNA y con la organización del citoesqueleto (43). Ninguno de estos genes coinciden con los presentados en este trabajo. En cualquier caso, ninguno de estos trabajos, realizó análisis de expresión antes y después del tratamiento.

Con respecto a otros trabajos que intenten definir un perfil dinámico en líneas celulares, destaca el de Samimi y cols. En él se identifican diferentes perfiles de expresión génica entre células sensibles y resistentes a Oxaliplatino y definen los mecanismos de resistencia de éste. La ruta mitocondrial es la que parece utilizar predominantemente Oxaliplatino para inducir apoptosis. Una ausencia en la expresión de genes implicados en la ruta de síntesis de ATP, en la cadena de transporte de los electrones, se relacionó con resistencia celular a Oxaliplatino. Otra ruta importante fue la implicada en el desarrollo de la enfermedad de *Huntington*, destacando la implicación de caspasa 8 y calmodulina, ésta última con un papel en el control y crecimiento celular. La última ruta a destacar fue la ribosomal. La expresión de genes que regulan esta ruta, como RPLP1, RPLP2 o RPS6, contribuye en el control del crecimiento y la proliferación celular por lo que la sobre-expresión de los mismos permitiría poder escapar de la muerte celular tras la exposición a Oxaliplatino (317). Hemos mencionado la enorme expresión encontrada en nuestro trabajo de genes ribosomales y su relación con la gran actividad metabólica de las células tumorales, pues bien, de estos tres genes ribosomales del trabajo de Samimi y cols. nosotros coincidimos con la sobre-expresión de RPS6 en un paciente (paciente B), en cambio en el paciente C, la expresión de RPLP2 aparece reprimida tras el tratamiento neoadyuvante. Pese a que el estudio de Samimi y cols. es un estudio dinámico, los resultados encontrados en estos genes ribosomales no son del todo comparables al tratarse de un trabajo en líneas celulares. El hallazgo de que en el cromosoma 2 se encuentran tres genes (APACD, IF2 y REV1L) que resultan sobre-expresados en las

células resistentes a Oxaliplatino otorga un sentido funcional a la hora de explicar las RTs (317).

Por otra parte, existen unos pocos estudios sobre muestras clínicas que han evaluado cambios dinámicos en pequeñas colecciones de genes, sobre todo a través de IHQ. Son reseñables tres trabajos que comentaremos a continuación. Rau y cols. reflejaron un mejor pronóstico en los pacientes en los que la expresión de Ki-67 aumenta de forma dinámica tras el tratamiento de inducción. De la misma manera, la disminución en la expresión de p21, tras el tratamiento QRT, se ha asociado a una mayor SLE. El desequilibrio en los heterodímeros Bcl-2/Bax (antiapoptótico/apoptótico), por aumento del primero o disminución del segundo también se ha asociado a un pronóstico adverso, pero existe escasa información al respecto (151). Liersch y cols. fueron pioneros al publicar por vez primera el impacto pronóstico de los niveles intratumorales de TS, TP y DPS, en pacientes con CRLA que reciben QRT neoadyuvante con esquema basado en 5-FU. Del análisis multivariante las dos variables que finalmente tuvieron valor pronóstico negativo fueron la afectación ganglionar y niveles elevados de TS tras el tratamiento (371).

Recientemente Bertolini y cols. han publicado un interesante trabajo en el que por IHQ y antes y después de la administración de un tratamiento QRT en pacientes con CRLA, se evalúa la expresión de p53, p21, MLH1, MSH2, MIB-1, TS, EGFR y VEGF. El análisis multivariante, realizado en 91 pacientes, muestra el valor pronóstico de la expresión constitutiva de p21 y la de EGFR y MIB-1 tras el tratamiento neoadyuvante entre los pacientes que no alcanzaron un GRT de 3-4 (372).

Como vemos, la mayoría de la información que tenemos hoy en día de los mecanismos de resistencia a la QT o a la RT en CR proviene de trabajos en líneas celulares. En nuestro trabajo los pacientes reciben tratamiento en primera línea, lo que resulta comparable a los estudios de resistencia que se publican de líneas celulares tratadas *de novo* con un determinado agente. Empleamos, además, una pauta terapéutica real, lo que hace de éste el primer trabajo que evalúa así un perfil de resistencia.

La complejidad de las alteraciones genéticas que caracteriza al CCR sirve de argumento para la puesta en marcha de proyectos dirigidos al estudio de los perfiles de expresión génica, en los que se combinan las tecnologías de alto rendimiento con los datos disponibles de la secuenciación del genoma humano. Estos estudios precisan de un diseño muy riguroso y un análisis detallado de la gran cantidad de datos que generan estas técnicas. Es fundamental descubrir nuevos factores pronósticos y predictivos de respuesta que ayuden a individualizar el tratamiento de cada enfermo. La selección de la población a estudiar, el procesamiento de las

muestras tumorales o los métodos estadísticos empleados pueden influir en la información obtenida y en la validez del resultado. Actualmente los análisis de múltiples genes tienen limitaciones importantes que, de momento, no hacen posible su incorporación a la práctica clínica. Los expertos consideran que los resultados de este tipo de estudios deben ser validados por grupos de investigación diferentes, con tecnologías alternativas y con un amplio tamaño muestral.

4. EL FUTURO DE LA PREDICCIÓN DEL PRONÓSTICO Y LA RESPUESTA A FÁRMACOS EN CCR

Cualquier estudio que establezca una serie de genes asociado a pronóstico o a respuesta a los tratamientos requiere una validación. Actualmente se considera que antes de que una serie de genes puedan incorporarse a la clínica es necesario que sea validado en diferentes estudios realizados por investigadores independientes, para evitar sesgos de selección, y, a ser posible, con la inclusión de cientos de enfermos. Idealmente, para que un predictor molecular alcance su mayor aplicabilidad clínica parece conveniente que incorpore el menor número de marcadores posibles, que pueda ser estudiado a partir de muestras recogidas según los protocolos clínicos habituales (muestras parafinadas, biopsias endoscópicas, aspirados con aguja fina, etc.), y que su lectura sea lo más sencilla y reproducible. Por todo ello, es muy importante que el desarrollo clínico de fases posteriores en las que se validen los marcadores, contemplen siempre que sea posible esta serie de factores. El desarrollo de este tipo de marcadores puede resultar en una mejora de índices terapéuticos y estrategias más costo-efectivas.

El contexto clínico del CR neoadyuvante ofrece un excelente marco para el estudio evolutivo de los perfiles de expresión génica, pues el análisis mediante SAGE puede realizarse a partir de especímenes tumorales obtenidos antes y después del tratamiento, es decir, de la biopsia del diagnóstico inicial y de la pieza de resección.

A la luz de nuestros resultados cabe pensar que la resistencia al tratamiento QRT del CR se debe a una multitud de mecanismos moleculares que conocemos sólo de forma parcial. Dado que el estudio dirigido e individual de los posibles factores moleculares involucrados en las resistencias es sesgado, es de suponer que sólo el análisis sistemático de todas las rutas moleculares del tumor es lo que pueda realmente identificar los factores celulares relevantes de las resistencias. El conocimiento de las principales rutas o sistemas implicados en las resistencias ha permitido ahondar en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas dirigidas precisamente a la reversión de las mismas. La incorporación de nuevos fármacos dirigidos frente a dianas moleculares específicas en el tratamiento del cáncer está suponiendo un gran avance clínico. No

obstante, estos mejores resultados se traducen en un enorme esfuerzo económico para los sistemas sanitarios. Se hace necesario, por tanto, profundizar en el conocimiento de los factores clínicos y biológicos que nos puedan ayudar en la selección de aquellos pacientes con mayor probabilidad de respuesta de cara a racionalizar y optimizar el empleo de estos agentes. La presencia en un tumor de mutaciones de k-ras ó b-raf resulta en una activación constitutiva de la señalización a través de la vía Ras / Raf / Mek / Erk (Ras / Raf / MAPKK / MAP kinasa) y de manera subsiguiente, un incremento de la expresión de VEGF y una represión de inhibidores de la angiogénesis. La disfunción de p53 conlleva a una expresión incrementada de VEGF y a un descenso en la expresión de reguladores negativos de angiogénesis. En modelos preclínicos, la ausencia de mutaciones en p53 disminuye la sensibilidad a la terapia antiangiogénica. La importancia de estos datos es que en nuestro trabajo encontramos una serie de genes como CCNBP1IP1, PH4, ANGPTL4, COL1A1, TFF3 y eEF2 que están implicados en vías de señalización comunes con las de Bevacizumab. De la misma manera la vía de señalización de STAT3, con la que se relaciona también TFF3, guarda relación con la acción de Cetuximab. Ello confirma la importancia que la adición de las nuevas dianas terapéuticas en el CCR aportan en la mejoría de la tasa de respuestas y de supervivencia.

A parte, de los 26 genes sobre los que se centra nuestro estudio, en la literatura existe apoyo bibliográfico de su modulación como mecanismo para regular la progresión tumoral de seis de ellos: S100A10, ZYX, TFF3, eEF2, WARS y XIST.

Así, trabajos en líneas celulares de CCR (CCL-222) empleando ARN interferente frente a la proteína S100A10 consiguen disminuir su expresión extracelular. Estudios *in vitro* encuentran que esta proteína actúa como receptor del plasminógeno al permitir la unión de éste y de tPA al último y penúltimo residuo de lisina de su extremo carboxi-terminal, respectivamente. Ello justifica que en los trabajos con ARN interferente frente a S100A10 llegue a disminuir, también, hasta en un 45% la unión del plasminógeno, hasta un 65% la generación intracelular del plasminógeno y la pérdida completa de la invasión celular dependiente del plasminógeno. Todo traduce la posible implicación de la sobreexpresión de S100A10 en el proceso de diseminación tumoral, habida cuenta de la implicación del sistema de proteasas del sistema activador del plasminógeno en la angiogénesis (373).

Trabajos con líneas celulares de melanoma y con melanocitos muestran, por *Western Blot* o citometría de flujo, una diferente expresión de zixina. Ésta se encuentra sobreexpresada en melanoma frente a células normales. El tratamiento *in vitro*, sobre células de melanoma, con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato disminuye la expresión de zixina y con ello sus acciones, por lo que la proliferación celular disminuye y, por el

contrario, la diferenciación celular se ve potenciada. Sobre los melanocitos este fármaco actuaría como un mitógeno, con el consecuente aumento en la expresión de zixina. Van der Gaag y cols. muestran cómo la disminución en la expresión de esta proteína logra controlar el crecimiento y la diseminación de células de melanoma y se plantea como potencial diana terapéutica (356). No existen trabajos en líneas celulares de CCR.

El uso terapéutico de TFF3 recombinante ha sido sugerido para el manejo de pacientes con patologías inflamatorias crónicas del intestino, úlcera péptica, enterocolitis necrotizante o cirugía gastrointestinal; sin embargo, uno de los factores que probablemente limite su utilización a gran escala es el alto costo asociado con su producción y purificación (374). Por el momento no existen trabajos sobre su aplicación en CCR.

La enzima farnesil-transferasa es responsable de la prenilación, o adquisición de un grupo isoprenoide, de la proteína Ras para poder ser reclutada al interior de la célula donde ejerce su función (375). La inhibición de este enzima responsable evitaría el anclado de Ras a la membrana citoplasmática y, por tanto, el inicio de la señalización posterior en tumores donde Ras está constitutivamente activo (376). En general, los resultados obtenidos en fase III en pacientes con carcinoma de páncreas (el tumor que presenta la mayor frecuencia de mutaciones en K-ras) ha aportado la mayor evidencia clínica hasta la actualidad de la falta de eficacia de los inhibidores de la farnesil-transferasa (377). Recientemente se ha publicado un trabajo con uno de estos inhibidores denominado SCH-66336 (Sarasar®) en el que se plantea un mecanismo de acción de este inhibidor independiente del estado mutacional de Ras. Los autores muestran, en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello, cómo el efecto del fármaco es a través de la fosforilación, y por tanto inactivación, de eEF2. La síntesis proteica se ve disminuida en estas células. Paradójicamente se observa una activación de eEF2K y, por tanto, se observa una inhibición de MEK y p70S6K, en sus formas fosforiladas, principales moléculas de señalización de la activación de eEF2K (378).

La identificación de la diana celular de triptófano-tARN sintetasa implicada en la síntesis proteica de moléculas relacionadas con las rutas de inhibición de angiogénesis, lo que le convierte en una potencial diana terapéutica. De momento los trabajos son aún muy preliminares (365).

Por último, trabajos en líneas celulares de cáncer de ovario muestran una relación entre los niveles de expresión de XIST y la sensibilidad al tratamiento con Paclitaxel. Estudios *in vitro* muestran que la pérdida de la inactivación del cromosoma X es uno de los mecanismos de pérdida en la expresión de XIST en estas líneas celulares. En este sentido el nivel de expresión de XIST podría actuar como marcador de respuesta

a la QT en cáncer de ovario (368). Se desconoce si XIST contribuye a la generación de RTs por otra vía que no afecte a la silenciamiento del cromosoma X.

No hay que olvidar que aunque nuestros resultados suponen un paso adelante en la investigación de los fenómenos de RTs en CR, todavía estamos lejos de poder aplicar estos análisis en nuestros enfermos de una forma rutinaria.

En base a todo ello, el tratamiento médico del cáncer en el futuro debe asentarse sobre unas bases racionales del conocimiento de la proliferación, diferenciación y apoptosis, y los fármacos diseñados de acuerdo a su mecanismo de acción y conociendo al detalle las funciones que pueden llegar a controlar. Serán, por tanto, inhibidores de señales, ya que el diseño de fármacos activadores es mucho más complicado. Pero, además, el tratamiento deberá ser ajustado a cada paciente, ya que en el momento actual el beneficio se produce en un grupo reducido de ellos. El tratamiento deberá ser dirigido y guiado gracias a un diagnóstico más preciso de los factores biológicos y moleculares. Al respecto existe una gran heterogeneidad en lo que concierne a la respuesta individual, no sólo en términos de eficacia terapéutica sino en la toxicidad de los esquemas terapéuticos. Además de los factores clínicos (tipo de enfermedad, interacción farmacológica y los factores individuales) hay diferencias en el metabolismo y en la distribución de los fármacos entre los individuos y existen factores genéticos (como los polimorfismos) que influyen en la toxicidad y eficacia de los fármacos.

No podemos olvidar que desde el estroma que rodea al tumor se generan numerosas señales que interaccionan con éste y en el que pudiéramos encontrar más información a cerca de las RTs, por lo que es un campo novedoso en el que se tendrán que centrar futuras investigaciones.

Por último, es preciso señalar que los recientes avances que se están produciendo en el campo de la proteómica probablemente jugarán un papel importante en la investigación molecular del CCR en los próximos años. La proteómica ofrece la posibilidad de analizar de una forma exhaustiva y simultánea cambios en un gran número de proteínas en el contexto de una enfermedad o de distintas condiciones fisiológicas. La expresión, aumentada o reprimida, de un determinado transcrito no tiene por qué tener una correlación a nivel proteico, ya que los transcritos están sometidos a un proceso de regulación post-transcripcional que determinará las proteínas que serán traducidas. Por tanto, la información que pueden transmitir los estudios de expresión de múltiples proteínas podría ser más relevante que la que ofrece SAGE para conocer con mayor precisión las moléculas implicadas en la progresión del cáncer y en la respuesta a los tratamientos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las células de CR resistentes al tratamiento tienen un perfil de expresión de genes que le confieren un fenotipo más agresivo, aumento de la proliferación, de la invasividad, la angiogénesis, etc. Por tanto, la respuesta al tratamiento en el CCR es un escenario complejo donde, además, el ambiente químico es clave y la regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno también parece ayudar a definir la respuesta. Todos estos datos abundan en el hecho de que las estrategias terapéuticas destinadas a atacar una sola diana, parecen, a la vista de los resultados, insuficientes. Tratamientos combinatorios dirigidos contra distintas rutas de señalización podrían ofrecer mejores respuestas y es el camino hacia el que se dirige el tratamiento oncológico de los próximos años.

Conclusiones

1. El transcriptoma tumoral del cáncer de recto puede ser analizado con éxito mediante la técnica SAGE a partir de pequeñas muestras endoscópicas y de piezas quirúrgicas recogidas en fresco
2. Se ha analizado, por primera vez, el transcriptoma del cáncer de recto de forma dinámica, antes y después del tratamiento preoperatorio, siendo además la caracterización más precisa y extensa del mismo realizada hasta la fecha. Se ha contribuido así a la caracterización molecular del cáncer de recto
3. Se han caracterizado un total de seis genotecas de muestras tumorales de adenocarcinoma de recto, con un enriquecimiento del 90% de células tumorales y un 10% de estroma, previas y posteriores al tratamiento quimiorradioterápico, en tres pacientes con adenocarcinomas de recto con pobre respuesta a dicho tratamiento
4. Los genes que regulan significativamente su expresión tras el tratamiento, dado que se han identificado de forma ciega, son magníficos candidatos para ser evaluados funcionalmente como potenciales dianas terapéuticas, factores pronóstico y predictivos de respuesta
5. A pesar de la posible variabilidad en la expresión génica asociada a aspectos como el procedimiento de recogida y preparación de las muestras clínicas o la heterogeneidad entre pacientes, se ha encontrado un número recortado de genes – entre 50 y 70- que cambian su expresión significativamente tras el tratamiento preoperatorio en cada paciente, y un grupo reducido de ellos, 26, que cambiaron significativamente de forma análoga en los tres casos
6. Se han identificado grupos de genes, más numerosos, que cambian su expresión tras el tratamiento con menor peso estadístico, que pueden ser igualmente importantes a la hora de señalar candidatos potencialmente involucrados en las resistencias terapéuticas
7. La generación de las genotecas a través de la técnica SAGE ha requerido de un gran esfuerzo técnico y de recursos, pero ha cuantificado de forma altamente precisa los transcriptomas y los resultado parecen sólidos, pues los genes cribados de forma ciega parecen ser relevantes para la cuestión de las RTs, siendo concordantes en algunos casos con la literatura y en otros realizando funciones asociadas a dichas RTs
8. Los genes finalmente cribados, que regulan su expresión tras el tratamiento quimiorradioterápico están implicados principalmente en mecanismos de inmunidad

celular, en el ciclo celular, en el equilibrio homeostático, en el estrés oxidativo, en la angiogénesis, en el mantenimiento del citoesqueleto, en la progresión tumoral y en la síntesis proteica

9. Se han identificado algunas secuencias, cuyo producto de expresión es desconocido (ESTs), y otros genes, como SPARC, con incipiente soporte racional en la literatura, que resultan de enorme interés para ser exploradas como potenciales nuevas dianas terapéuticas

10. Se ha encontrado una extensa regulación de proteínas ribosomales tras el tratamiento quimiorradioterápico, que encuentran también otros autores en estudios *in vitro*, y que quizá esté relacionada con el desarrollo de la amplia síntesis proteica que requieren las células tumorales, sin otras implicaciones, pero merecería también mayores estudios para descartar posibles implicaciones en RTs

Bibliografía

- (1) Ozols RF, Herbst RS, Colson YL, Gralow J, Bonner J, Curran WJ, Jr. et al. Clinical cancer advances 2006: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2007; 25(1):146-162.
- (2) Perez-Gomez B, Aragonés N, Pollán M, Suárez B, Lope V, Llacer A et al. Accuracy of cancer death certificates in Spain: a summary of available information. *Gac Sanit* 2006; 20 Suppl 3:42-51.:42-51.
- (3) Tveit KM, Guldvog I, Hagen S, Trondsen E, Harbitz T, Nygaard K et al. Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group. *Br J Surg* 1997; 84(8):1130-1135.
- (4) Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355(11):1114-1123.
- (5) Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(17):1731-1740.
- (6) Mariadason JM, Arango D, Augenlicht LH. Customizing chemotherapy for colon cancer: the potential of gene expression profiling. *Drug Resist Updat* 2004; 7(3):209-218.
- (7) Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ. Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32(1):55-64.
- (8) Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347(20):1593-1603.
- (9) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-767.
- (10) Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329(27):1977-1981.
- (11) Siu IM, Robinson DR, Schwartz S, Kung HJ, Pretlow TG, Petersen RB et al. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res* 1999; 59(1):63-66.
- (12) Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, Groden J, Alabaster O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1996; 56(23):5339-5341.
- (13) Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121(3):599-611.
- (14) Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16(4):775-810.
- (15) Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4):433-438.

- (16) Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4):429-432.
- (17) Calvert P FH. Molecular genetics of colorectal cancer. In: Rose B, editor. *UptoDate*. Wellesley MA: UptoDate, 2005.
- (18) Duursma AM, Agami R. Ras interference as cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(4):267-273.
- (19) Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 1994; 69(2):367-371.
- (20) Ramirez dM, Rodriguez-Gonzalez A, Lacal JC. From Ras signalling to ChoK inhibitors: a further advance in anticancer drug design. *Cancer Lett* 2004; 206(2):137-148.
- (21) Tai IT, Dai M, Owen DA, Chen LB. Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1492-1502.
- (22) Sturtevant J. Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(3):408-427.
- (23) Wang X, Feuerstein GZ. The use of mRNA differential display for discovery of novel therapeutic targets in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1997; 35(3):414-421.
- (24) Maughan NJ, Lewis FA, Smith V. An introduction to arrays. *J Pathol* 2001; 195(1):3-6.
- (25) Gautheret D, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie JM. Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering. *Genome Res* 1998; 8(5):524-530.
- (26) Wang Y, Jatko T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(9):1564-1571.
- (27) Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270(5235):484-487.
- (28) Victor E.Velculescu LZea. Serial Analysis of gene expression. Detailed protocol. Version 1.0e. <http://www.sagenet.org/protocol/MANUAL1e.pdf> . 1998.
- (29) Madden SL, Wang CJ, Landes G. Serial analysis of gene expression: from gene discovery to target identification. *Drug Discov Today* 2000; 5(9):415-425.
- (30) Datson NA, van der Perk-de Jong, van den Berg MP, de Kloet ER, Vreugdenhil E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(5):1300-1307.
- (31) Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, ORntoft TF. Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129(5):263-271.
- (32) Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004;23(7):1377-1391.

- (33) Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y et al. The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res* 2003; 63(15):4577-4582.
- (34) Mori Y, Yin J, Sato F, Sterian A, Simms LA, Selaru FM et al. Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res* 2004; 64(7):2434-2438.
- (35) Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000; 24(3):236-244.
- (36) Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagiri T, Ueyama Y et al. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res* 2002; 62(2):518-527.
- (37) Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C et al. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res* 2003; 63(24):8791-8812.
- (38) Dan S, Tsunoda T, Kitahara O, Yanagawa R, Zembutsu H, Katagiri T et al. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res* 2002; 62(4):1139-1147.
- (39) Maxwell PJ, Longley DB, Latif T, Boyer J, Allen W, Lynch M et al. Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling. *Cancer Res* 2003; 63(15):4602-4606.
- (40) Clarke PA, George ML, Easdale S, Cunningham D, Swift RI, Hill ME et al. Molecular pharmacology of cancer therapy in human colorectal cancer by gene expression profiling. *Cancer Res* 2003; 63(20):6855-6863.
- (41) Arango D, Corner GA, Wadler S, Catalano PJ, Augenlicht LH. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001; 61(12):4910-4915.
- (42) Hwang PM, Bunz F, Yu J, Rago C, Chan TA, Murphy MP et al. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med* 2001; 7(10):1111-1117.
- (43) Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23(9):1826-1838.
- (44) Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006; 66(7):3370-3374.
- (45) Worldwide cancer mortality statistics. International Agency for Research on Cancer . (<http://www-depdb.iarc.fr/who>) . 2002.
- (46) Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361(9368):1496-1501.
- (47) Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57(1):1-17.

- (48) Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(12):906-916.
- (49) Kwak EL, Chung DC. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer* 2007; 6(5):340-344.
- (50) Sobin LH WC. *TNM Classification of Malignant Tumours* (ed 6). New York, NY, John Wiley . 2002.
- (51) Greene FL BCFlea. *AJCC Manual for staging of cancer*. 6 ed. N. York: Springer Verlag, 2002.
- (52) Balch GC, De Meo A, Guillem JG. Modern management of rectal cancer: a 2006 update. *World J Gastroenterol* 2006; 12(20):3186-3195.
- (53) Harewood GC. Assessment of publication bias in the reporting of EUS performance in staging rectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(4):808-816.
- (54) Solomon MJ, McLeod RS. Endoluminal transrectal ultrasonography: accuracy, reliability, and validity. *Dis Colon Rectum* 1993; 36(2):200-205.
- (55) Bipat S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Stoker J. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging--a meta-analysis. *Radiology* 2004; 232(3):773-783.
- (56) Beets-Tan RG, Lettinga T, Beets GL. Pre-operative imaging of rectal cancer and its impact on surgical performance and treatment outcome. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31(6):681-688.
- (57) Strassburg J. Magnetic resonance imaging in rectal cancer: the MERCURY experience. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 1:s16-8.
- (58) Schaffzin DM, Wong WD. Endorectal ultrasound in the preoperative evaluation of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4(2):124-132.
- (59) Wolberink SV, Beets-Tan RG, Nagtegaal ID, Wiggers T. Preoperative assessment of the circumferential margin in rectal cancer is more informative in treatment planning than the T stage. *Tech Coloproctol* 2006; 10(3):171-176.
- (60) Aitken RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83(2):214-216.
- (61) Heald RJ. A new approach to rectal cancer. *Br J Hosp Med* 1979; 22(3):277-281.
- (62) MacFarlane JK, Ryall RD, Heald RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1993;341(8843):457-460.
- (63) Martling A, Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, Holm T. The surgeon as a prognostic factor after the introduction of total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89(8):1008-1013.
- (64) Martling AL, Holm T, Rutqvist LE, Moran BJ, Heald RJ, Cedemark B. Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the County of Stockholm. *Stockholm Colorectal Cancer Study Group, Basingstoke Bowel Cancer Research Project. Lancet* 2000; 356(9224):93-96.
- (65) Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, Wolmark N, O'Connell MJ, Begovic M et al. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(10):1785-1796.

- (66) Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(11):709-715.
- (67) Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 2001;358(9290):1291-1304.
- (68) Azinovic I. Preoperative radiochemotherapy in the management of locally advanced rectal carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996; 15(225):542.
- (69) Ono M, Sakamoto M, Ino Y, Moriya Y, Sugihara K, Muto T et al. Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer* 1996; 78(6):1179-1186.
- (70) Bosset JF, Pelissier EP, Maniion G, Pavy JJ, Horiot JC, Hamers HP et al. Plea for a preoperative adjuvant approach in the management of rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29(1):205-208.
- (71) M.S.Roh. Response to preoperative multimodality therapy predicts survival in patients with carcinoma of the rectum. *Journal of Clinical Oncology, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 3505 abst.*
- (72) Hyams DM, Mamounas EP, Petrelli N, Rockette H, Jones J, Wieand HS et al. A clinical trial to evaluate the worth of preoperative multimodality therapy in patients with operable carcinoma of the rectum: a progress report of National Surgical Breast and Bowel Project Protocol R-03. *Dis Colon Rectum* 1997; 40(2):131-139.
- (73) E.Casado. Phase II study of neoadjuvant treatment of rectal cancer with oxaliplatin. *Proc Am Soc Clin Oncol* . 2004.
- (74) Feliu J. Neoadjuvant therapy of rectal cancer with UFT-Leucovorin plus radiotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18(239).
- (75) J.Gerard. Preoperative (preop) radiotherapy (RT) + 5 FU/folinic acid (FA) in T3-4 rectal cancers : results of the FFCD 9203 randomized trial. *Journal of Clinical Oncology, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings.Vol 23, No.16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 3504 Abst .*
- (76) N.Wolmark. A phase III trial comparing FULV to FULV + oxaliplatin in stage II or III carcinoma of the colon: Results of NSABP Protocol C-07. *Journal of Clinical Oncology, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings.Vol 23, No.16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 3500 Abst*
- (77) Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23):2343-2351.
- (78) R.Glynn-Jones. Socrates phase II study results: capecitabine (CAP) combined with oxaliplatin (OX) and preoperative radiation (RT) in patients (pts) with locally advanced rectal cancer (LARC). *Journal of Clinical Oncology, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings.Vol 23, No.16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 3527 Abst.*
- (79) Catalano V. Raltitrexed may replace the De Gramont regimen in combination with oxaliplatin for the treatment of advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20(576).
- (80) Pinto C. Oxaliplatin and raltitrexed in advanced colorectal cancer patients: a phase II study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20(2204).

- (81) Valentini V. Chemoradiation with Raltitrexed (Tomudex) and Oxaliplatin in pre-operative treatment of stage II/III resectable rectal cancer: a dose-finding study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20(131):520.
- (82) O'Neil BH, Goldberg RM. Chemotherapy for advanced colorectal cancer: let's not forget how we got here (until we really can). *Semin Oncol* 2005; 32(1):35-42.
- (83) Jordan K. Randomized phase II trial of capecitabine plus irinotecan vs. capecitabine plus oxaliplatin as first-line therapy in advanced colorectal cancer (ACRC): results of an interim analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21:2225.
- (84) Douillard JY, Hoff PM, Skillings JR, Eisenberg P, Davidson N, Harper P et al. Multicenter phase III study of uracil/tegafur and oral leucovorin versus fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17):3605-3616.
- (85) Carmichael J, Popiela T, Radstone D, Falk S, Borner M, Oza A et al. Randomized comparative study of tegafur/uracil and oral leucovorin versus parenteral fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17):3617-3627.
- (86) Nogue M, Salud A, Batiste-Alentorn E, Saigi E, Losa F, Cirera L et al. Randomised study of tegafur and oral leucovorin versus intravenous 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(15):2241-2249.
- (87) Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343(13):905-914.
- (88) Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22(2):229-237.
- (89) de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(16):2938-2947.
- (90) Grothey A. Phase III study of bolus 5-fluorouracil (5-FU)/ folinic acid (FA) (Mayo) vs weekly high-dose 24h 5-FU infusion/ FA + oxaliplatin (OXA) (FUFOX) in advanced colorectal cancer (ACRC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;18-21.
- (91) Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK et al. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2003; 21(11):2059-2069.
- (92) Grothey A. Randomized phase II trial of capecitabine plus irinotecan (CapIri) vs capecitabine plus oxaliplatin (CapOx) as first-line therapy of advanced colorectal cancer (ACRC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22(255).
- (93) Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5(7):1621-1633.
- (94) Leonard Saltz. Cetuximab (IMC-C225) Plus Irinotecan (CPT-11) is Active in CPT-11-Refractory Colorectal Cancer (CRC) that Expresses Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Proc Am Soc Clin Oncol* 20: 2001 (abstr 7).

- (95) Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22(7):1201-1208.
- (96) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(4):337-345.
- (97) H.J.Lenz. Consistent Response to Treatment with Cetuximab Monotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No.16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 3536 Abst.
- (98) Chung KY, Saltz LB. Antibody-based therapies for colorectal cancer. *Oncologist* 2005; 10(9):701-709.
- (99) Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P et al. Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2006; 17(3):450-456.
- (100) M.Borner. The impact of cetuximab on the capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) combination in first-line treatment of metastatic colorectal cancer (MCC): A randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No.18S (June 20 Supplement), 2006: 3551 Abst.
- (101) V.Heinemann. XELIRI plus cetuximab versus XELOX plus cetuximab for first-line therapy of metastatic colorectal cancer (CRC): A randomized trial of the AIO CRC Study Group. *Gastrointestinal Cancers Symposium*, Abstr 278. 2007.
- (102) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23):2335-2342.
- (103) Reddy GK. The addition of bevacizumab to FOLFOX4 prolongs survival in relapsed colorectal cancer: interim data from the ECOG 3200 trial. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 4(5):300-301.
- (104) Giantonio BJ. High-dose bevacizumab in combination with FOLFOX4 improves survival with previously treated advanced colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Group (ECOG) study E2300. *Proceedings of the 2005 Gastrointestinal Cancers Symposium* 2005; 168.
- (105) Tyagi P, Grothey A. Commentary on a phase III trial of bevacizumab plus XELOX or FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NO16966 trial. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6(4):261-264.
- (106) H.S.Hochster. Safety and efficacy of oxaliplatin/fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): Final analysis of the TREE-Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No.18S (June 20 Supplement), 2006: 3510 Abst
- (107) Foon KA, Yang XD, Weiner LM, Belldgrun AS, Figlin RA, Crawford J et al. Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58(3):984-990.
- (108) Amgen Inc.Press Release. FDA approves Vectibix™ to treat patients with metastatic colorectal cancer. Available

at:http://www.ext.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?releaseID=909842 (fecha de acceso 09/10/2006).

- (109) Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13(12):2936-2943.
- (110) Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88(7):1739-1757.
- (111) Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol* 1981; 34(5):509-513.
- (112) Wong JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(9):2896-2900.
- (113) Radiation therapy and fluorouracil with or without semustine for the treatment of patients with surgical adjuvant adenocarcinoma of the rectum. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10(4):549-557.
- (114) Radiation therapy and fluorouracil with or without semustine for the treatment of patients with surgical adjuvant adenocarcinoma of the rectum. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10(4):549-557.
- (115) O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, Macdonald JS, Haller DG et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994; 331(8):502-507.
- (116) Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. Gastrointestinal Tumor Study Group. *N Engl J Med* 1985; 312(23):1465-1472.
- (117) Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355(9209):1041-1047.
- (118) Cross SS, Bull AD, Smith JH. Is there any justification for the routine examination of bowel resection margins in colorectal adenocarcinoma? *J Clin Pathol* 1989; 42(10):1040-1042.
- (119) Arbman G, Nilsson E, Hallbook O, Sjobahl R. Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83(3):375-379.
- (120) Nagtegaal ID, van de Velde CJ, Marijnen CA, van Krieken JH, Quirke P. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. *J Clin Oncol* 2005; 23(36):9257-9264.
- (121) Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, van de Velde CJ, van Krieken JH. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3):350-357.
- (122) Pescatori M, Maria G, Beltrani B, Mattana C. Site, emergency, and duration of symptoms in the prognosis of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1982; 25(1):33-40.
- (123) Steinberg J, Erlichman C, Gadalla T, Fine S, Wong A. Prognostic factors in patients with metastatic colorectal cancer receiving 5-fluorouracil and folinic acid. *Eur J Cancer* 1992; 28A(11):1817-1820.

- (124) Gorlick R, Metzger R, Danenberg KD, Salonga D, Miles JS, Longo GS et al. Higher levels of thymidylate synthase gene expression are observed in pulmonary as compared with hepatic metastases of colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16(4):1465-1469.
- (125) O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Ko CY. Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2004; 47(12):2064-2069.
- (126) Coburn MC, Pricolo VE, Soderberg CH. Factors affecting prognosis and management of carcinoma of the colon and rectum in patients more than eighty years of age. *J Am Coll Surg* 1994; 179(1):65-69.
- (127) Macdonald JS. Vive la difference: sex and fluorouracil toxicity. *J Clin Oncol* 2002; 20(6):1439-1441.
- (128) Sloan JA, Loprinzi CL, Laurine JA, Novotny PJ, Vargas-Chanes D, Krook JE et al. A simple stratification factor prognostic for survival in advanced cancer: the good/bad/uncertain index. *J Clin Oncol* 2001; 19(15):3539-3546.
- (129) Mulcahy HE, O'Donoghue DP. Duration of colorectal cancer symptoms and survival: the effect of confounding clinical and pathological variables. *Eur J Cancer* 1997; 33(9):1461-1467.
- (130) Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery* 2000; 127(4):370-376.
- (131) Kooby DA, Stockman J, Ben Porat L, Gonen M, Jarnagin WR, Dematteo RP et al. Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2003; 237(6):860-869.
- (132) Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. The association between preoperative concentration of soluble vascular endothelial growth factor, perioperative blood transfusion, and survival in patients with primary colorectal cancer. *Eur J Surg* 2001; 167(4):287-292.
- (133) Shwaiki A SA. The impact of platelet count (Plt#) on outcome in curable colon cancer. 2004 ASCO Annual Meeting 2004; 9735a.
- (134) Steinberg SM, Barwick KW, Stablein DM. Importance of tumor pathology and morphology in patients with surgically resected colon cancer. Findings from the Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 1986; 58(6):1340-1345.
- (135) Hermanek P, Wittekind C. Residual tumor (R) classification and prognosis. *Semin Surg Oncol* 1994; 10(1):12-20.
- (136) Meterissian S, Skibber J, Rich T, Rouben L, Ajani J, Cleary K et al. Patterns of residual disease after preoperative chemoradiation in ultrasound T3 rectal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 1994; 1(2):111-116.
- (137) Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, Kerner BA, Taylor CW, Aguilar PS et al. T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. *Dis Colon Rectum* 2002; 45(7):895-903.
- (138) Berger C, de Muret A, Garaud P, Chapet S, Bourlier P, Reynaud-Bougnoux A et al. Preoperative radiotherapy (RT) for rectal cancer: predictive factors of tumor downstaging and residual tumor cell density (RTCD): prognostic implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37(3):619-627.

- (139) Lerner HJ. Colorectal cancer--prognostic signs in "local disease". *J Surg Oncol* 1975; 7(5):395-402.
- (140) Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; 1(8545):1303-1306.
- (141) Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, Jacobson A, Spencer M, Rothenberger DA et al. Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 2004; 10(17):5777-5784.
- (142) Bertagnolli M, Miedema B, Redston M, Dowell J, Niedzwiecki D, Fleshman J et al. Sentinel node staging of resectable colon cancer: results of a multicenter study. *Ann Surg* 2004; 240(4):624-628.
- (143) Cserni G. The influence of nodal size on the staging of colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 2002; 55(5):386-390.
- (144) Koh DM, Brown G, Temple L, Raja A, Toomey P, Bett N et al. Rectal cancer: mesorectal lymph nodes at MR imaging with USPIO versus histopathologic findings--initial observations. *Radiology* 2004; 231(1):91-99.
- (145) Okuno M, Ikehara T, Nagayama M, Kato Y, Yui S, Umeyama K. Mucinous colorectal carcinoma: clinical pathology and prognosis. *Am Surg* 1988; 54(11):681-685.
- (146) Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg* 1996; 83(1):46-50.
- (147) Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000; 36(2):121-126.
- (148) Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; 42(5):673-679.
- (149) Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P et al. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1735-1743.
- (150) Sun XF, Carstensen JM, Stal O, Zhang H, Nordenskjold B. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in relation to ras, c-erbB-2, p53, clinico-pathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69(1):5-8.
- (151) Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S et al. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3391-3401.
- (152) Klump B, Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS et al. Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? Original data and review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19(1):23-42.
- (153) Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(20):1442-1455.
- (154) Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen C, Baumann M. The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(3):322-333.
- (155) Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Goh HS et al. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma.

- Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer* 2000; 36(16):2053-2060.
- (156) Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, Skovlund E, Rognum TO, Lothe RA. Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2003; 21(5):820-829.
- (157) Ito T, Kaneko K, Makino R, Konishi K, Kurahashi T, Ito H et al. Clinical significance in molecular detection of p53 mutation in serum of patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10(6):1937-1942.
- (158) Kastrinakis WV, Ramchurren N, Rieger KM, Hess DT, Loda M, Steele G et al. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 1995; 11(4):647-652.
- (159) McKay JA, Lloret C, Murray GI, Johnston PG, Bicknell R, Ahmed FY et al. Application of the enrichment approach to identify putative markers of response to 5-fluorouracil therapy in advanced colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 2000; 17(1):153-158.
- (160) Paradiso A, Simone G, Lena MD, Leone B, Vallejo C, Lacava J et al. Expression of apoptosis-related markers and clinical outcome in patients with advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2001; 84(5):651-658.
- (161) Aschele C. Lack of correlation between p53 overexpression and response to Fura-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997; 16(258a).
- (162) Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R et al. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 1998; 4(5):1243-1250.
- (163) Schneider HJ, Sampson SA, Cunningham D, Norman AR, Andreyev HJ, Tilsed JV et al. Bcl-2 expression and response to chemotherapy in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75(3):427-431.
- (164) Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(3):529-536.
- (165) Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12):4797-4802.
- (166) Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999; 5(4):883-889.
- (167) Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I et al. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1721-1728.
- (168) Aschele C. Schedule-dependent correlation between the level of thymidylate synthase (TS) protein expression and clinical response to different 5-fluorouracil (5-FU) regimens in advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19:251a.

- (169) Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E. Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 1995; 49(10):1419-1426.
- (170) Leichman L, Lenz HJ, Leichman CG, Groshen S, Danenberg K, Baranda J et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin in disseminated colorectal cancers: preliminary report from an ongoing trial. *Eur J Cancer* 1995; 31A(7-8):1306-1310.
- (171) Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997; 15(10):3223-3229.
- (172) Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita ME, Hatano K et al. Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(3):193-198.
- (173) Allegra C. Thymidylate synthase levels: prognostic, predictive, or both? *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1711-1713.
- (174) Elsaleh H. Thymidilate Synthase genotype and survival benefit from chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 493.
- (175) Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(6):1779-1786.
- (176) Stoehmacher J. Human Thymidylate Synthase gene polymorphism determines response to Capecitabine chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 514.
- (177) Barozzi C, Ravaioli M, D'Errico A, Grazi GL, Poggioli G, Cavrini G et al. Relevance of biologic markers in colorectal carcinoma: a comparative study of a broad panel. *Cancer* 2002; 94(3):647-657.
- (178) Younes M, Fernandez L, Lechago J. Transforming growth factor alpha (TGF-alpha) expression in biopsies of colorectal carcinoma is a significant prognostic indicator. *Anticancer Res* 1996; 16(4A):1999-2003.
- (179) Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hedvat CV, Leung DH et al. Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res* 2002; 8(12):3841-3849.
- (180) Noguchi T, Kikuchi R, Ono K, Takeno S, Moriyama H, Uchida Y. Prognostic significance of p27/kip1 and apoptosis in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10(4):827-831.
- (181) Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85(5):692-696.
- (182) Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(5):1375-1381.

- (183) Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut* 2003; 52(1):101-108.
- (184) Belly RT, Rosenblatt JD, Steinmann M, Toner J, Sun J, Shehadi J et al. Detection of mutated K12-ras in histologically negative lymph nodes as an indicator of poor prognosis in stage II colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1(2):110-116.
- (185) Vizoso F, Villar C, Rodriguez JC, Raigoso P, Garcia-Muniz JL, Allende MT et al. C-erbB-2 oncoprotein content in colorectal cancer and in surrounding mucosa: relationship with clinicopathologic parameters and prognostic significance. *Int J Surg Investig* 2000; 1(6):483-493.
- (186) Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4:S9-15.:S9-15.
- (187) Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2004; 22(23):4772-4778.
- (188) Giralt J, Eraso A, Armengol M, Rossello J, Majo J, Ares C et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54(5):1460-1465.
- (189) McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002; 38(17):2258-2264.
- (190) Mawdsley S. The role of EGFR in predicting clinical outcome in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiation. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 22(14S (9592a)).
- (191) Zhang W. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 189a.
- (192) Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7):2803-2807.
- (193) Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergstrom R, Glimelius B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14(2):461-466.
- (194) McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(2):191-203.
- (195) Carriquiry LA, Pineyro A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1999; 42(7):921-929.
- (196) Scott NA, Wieand HS, Moertel CG, Cha SS, Beart RW, Lieber MM. Colorectal cancer. Dukes' stage, tumor site, preoperative plasma CEA level, and patient prognosis related to tumor DNA ploidy pattern. *Arch Surg* 1987; 122(12):1375-1379.
- (197) Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003; 39(6):718-727.

- (198) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1996; 14(10):2843-2877.
- (199) Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997; 386(6627):796-804.
- (200) Font A, Abad A, Monzo M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL et al. Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(4):549-557.
- (201) Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Iacopetta BJ. The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994; 59(6):747-751.
- (202) Graziano F, Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann Oncol* 2003; 14(7):1026-1038.
- (203) Ganesh S, Sier CF, Heerding MM, van Krieken JH, Griffioen G, Welvaart K et al. Contribution of plasminogen activators and their inhibitors to the survival prognosis of patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 75(12):1793-1801.
- (204) Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP et al. Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer. *Lancet* 1994; 344(8922):583-584.
- (205) Stephens RW, Nielsen HJ, Christensen IJ, Thorlacius-Ussing O, Sorensen S, Dano K et al. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(10):869-874.
- (206) Leeman MF, McKay JA, Murray GI. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(10):758-762.
- (207) Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Arimura Y, Nishi M, Endo T et al. Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 2001; 95(5):290-294.
- (208) Mysliwiec AG, Ornstein DL. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 1(4):208-219.
- (209) Yukawa N. Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 259a.
- (210) Armitage NC, Ballantyne KC, Evans DF, Clarke P, Sheffield J, Hardcastle JD. The influence of tumour cell DNA content on survival in colorectal cancer: a detailed analysis. *Br J Cancer* 1990; 62(5):852-856.
- (211) Kokal WA, Gardine RL, Sheibani K, Morris PL, Prager E, Zak IW et al. Tumor DNA content in resectable, primary colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1989; 209(2):188-193.
- (212) Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S, Shashidharan M et al. Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer* 1998; 83(2):259-266.
- (213) Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(2):69-77.

- (214) Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003; 21(20):3729-3736.
- (215) DNA methylation in stage III colorectal cancer is a novel independent predictor of survival benefit from adjuvant 5-fluorouracil treatment. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22(256).
- (216) Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(3):247-257.
- (217) Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23(3):609-618.
- (218) Carpelan-Holmstrom M, Haglund C, Lundin J, Alfthan H, Stenman UH, Roberts PJ. Independent prognostic value of preoperative serum markers CA 242, specific tissue polypeptide antigen and human chorionic gonadotrophin beta, but not of carcinoembryonic antigen or tissue polypeptide antigen in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1996; 74(6):925-929.
- (219) Abad A. Tratamiento individualizado del paciente con cáncer colorrectal. In: Diaz Rubio E, editor. *Nuevos paradigmas en cáncer colorrectal*. Madrid: 2002.
- (220) Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikkila R et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998; 352(9138):1413-1418.
- (221) Vincenzi B, Cesa AL, Santini D, Schiavon G, Grilli C, Graziano F et al. Predictive factors for response to chemotherapy in colorectal cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 52(1):45-60.
- (222) van Halteren HK, Peters HM, van Krieken JH, Coebergh JW, Roumen RM, van der WE et al. Tumor growth pattern and thymidine phosphorylase expression are related with the risk of hematogenous metastasis in patients with Astler Collier B1/B2 colorectal carcinoma. *Cancer* 2001; 91(9):1752-1757.
- (223) Ichikawa W, Uetake H, Shiota Y, Yamada H, Takahashi T, Nihei Z et al. Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(8):1486-1492.
- (224) van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA et al. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):1063-1072.
- (225) Fujii R, Seshimo A, Kameoka S. Relationships between the expression of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase and cell proliferative activity and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2003; 8(2):72-78.
- (226) Ichikawa W, YH UHea. Difference of Thymidylate Synthase gene expression in primary colorectal cancer and various metastatic sites. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 601.
- (227) Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry* 1992; 31(48):12141-12146.

- (228) Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 1994; 30A(10):1517-1522.
- (229) Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Strater J, Polat S et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2003; 9(11):4116-4124.
- (230) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6(4):1322-1327.
- (231) Ishibiki Y, Kitajima M, Sakamoto K, Tomiki Y, Sakamoto S, Kamano T. Intratumoural thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase activities are good predictors of 5-fluorouracil sensitivity in colorectal cancer. *J Int Med Res* 2003; 31(3):181-187.
- (232) Johnson MR, Yan J, Shao L, Albin N, Diasio RB. Semi-automated radioassay for determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity. Screening cancer patients for DPD deficiency, a condition associated with 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 696(2):183-191.
- (233) Maring JG, van Kuilenburg AB, Haasjes J, Piersma H, Groen HJ, Uges DR et al. Reduced 5-FU clearance in a patient with low DPD activity due to heterozygosity for a mutant allele of the DPYD gene. *Br J Cancer* 2002; 86(7):1028-1033.
- (234) Raida M, Schwabe W, Hausler P, van Kuilenburg AB, van Gennip AH, Behnke D et al. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001; 7(9):2832-2839.
- (235) Di Paolo A, Ibrahim T, Danesi R, Maltoni M, Vannozzi F, Flamini E et al. Relationship between plasma concentrations of 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil and toxicity of 5-fluorouracil infusions in cancer patients. *Ther Drug Monit* 2002; 24(5):588-593.
- (236) Findlay MP, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 75(6):903-909.
- (237) Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL et al. LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes. *Cancer Res* 1997; 57(6):1116-1123.
- (238) Farrugia DC, Ford HE, Cunningham D, Danenberg KD, Danenberg PV, Brabender J et al. Thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to raltitrexed. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2):792-801.
- (239) Salt L. High TS expression does not preclude activity of CPT-11 in colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 1080a.
- (240) Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000; 60(24):6921-6926.
- (241) Innocenti F, Ratain MJ. Irinotecan treatment in cancer patients with UGT1A1 polymorphisms. *Oncology (Williston Park)* 2003; 17(5 Suppl 5):52-55.

- (242) Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P et al. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3):1226-1236.
- (243) Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2003; 39(1):112-119.
- (244) Shirota Y, Stoehmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19(23):4298-4304.
- (245) Stoehmacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(2):344-354.
- (246) Stoehmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4B):3075-3079.
- (247) Park DJ, Stoehmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(24):8654-8658.
- (248) Glasgow SC, Yu J, Carvalho LP, Shannon WD, Fleshman JW, McLeod HL. Unfavourable expression of pharmacologic markers in mucinous colorectal cancer. *Br J Cancer* 2005; 92(2):259-264.
- (249) Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest* 1999; 104(12):1645-1653.
- (250) Perona R, Sanchez-Perez I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Br J Cancer* 2004; 90(3):573-577.
- (251) Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 2002; 62(15):4307-4315.
- (252) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381):1305-1308.
- (253) Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 1998; 17(25):3207-3213.
- (254) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391(6662):43-50.
- (255) Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; 94(6):695-698.
- (256) Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(15):1899-1911.
- (257) Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999; 401(6749):168-173.

- (258) Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001; 15(5):931-56, ix.
- (259) Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 1998; 24(5):331-344.
- (260) Klungland A, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 1997; 16(11):3341-3348.
- (261) Lee KB, Parker RJ, Bohr V, Cornelison T, Reed E. Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis* 1993; 14(10):2177-2180.
- (262) Perez RP, Hamilton TC, Ozols RF, Young RC. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* 1993; 71(4 Suppl):1571-1580.
- (263) Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(1):11-22.
- (264) Goubin F, Ducommun B. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 1995; 10(12):2281-2287.
- (265) Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(2):162-168.
- (266) Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410(6824):37-40.
- (267) Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103(2):211-225.
- (268) Roussel MF. Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv Cancer Res* 1998; 74:1-24.:1-24.
- (269) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274(5293):1672-1677.
- (270) Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103(2):239-252.
- (271) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270(5240):1326-1331.
- (272) Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Ikegami H, Kimura A, Matsuoka T et al. Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J Biol Chem* 1999; 274(44):31648-31654.
- (273) Mandic A, Viktorsson K, Heiden T, Hansson J, Shoshan MC. The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Melanoma Res* 2001; 11(1):11-19.
- (274) Sanchez-Perez I, Benitah SA, Martinez-Gomariz M, Lacal JC, Perona R. Cell stress and MEK1-mediated c-Jun activation modulate NFkappaB activity and cell viability. *Mol Biol Cell* 2002; 13(8):2933-2945.
- (275) Sanchez-Perez I, Perona R. Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin. *FEBS Lett* 1999; 453(1-2):151-158.

- (276) Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996; 87(3):565-576.
- (277) Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B et al. Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* 2002; 35(4):697-709.
- (278) Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2):180-186.
- (279) Neshat MS, Mellinshoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(18):10314-10319.
- (280) Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7):489-501.
- (281) Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB, Jaffe RB. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res* 2002; 62(4):1087-1092.
- (282) Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4):301-310.
- (283) Orlowski RZ, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8(8):385-389.
- (284) Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 2002; 8(8):808-815.
- (285) Woo RA, Jack MT, Xu Y, Burma S, Chen DJ, Lee PW. DNA damage-induced apoptosis requires the DNA-dependent protein kinase, and is mediated by the latent population of p53. *EMBO J* 2002; 21(12):3000-3008.
- (286) Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 2003; 33(2):162-167.
- (287) Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(2):169-178.
- (288) Luu Y, Bush J, Cheung KJ, Jr., Li G. The p53 stabilizing compound CP-31398 induces apoptosis by activating the intrinsic Bax/mitochondrial/caspase-9 pathway. *Exp Cell Res* 2002; 276(2):214-222.
- (289) Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H et al. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol* 1996; 14(1):176-182.
- (290) Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C et al. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17(6):1760-1770.
- (291) Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg K, Danenberg PC, Danenberg PV et al. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer Res* 2000; 60(9):2365-2367.

- (292) Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G et al. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8):1996-1999.
- (293) Pullarkat ST, Stoehmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1(1):65-70.
- (294) Tong Y, Liu-Chen X, Ercikan-Abali EA, Capioux GM, Zhao SC, Banerjee D et al. Isolation and characterization of thymitaq (AG337) and 5-fluoro-2-deoxyuridylate-resistant mutants of human thymidylate synthase from ethyl methanesulfonate-exposed human sarcoma HT1080 cells. *J Biol Chem* 1998; 273(19):11611-11618.
- (295) Landis DM, Loeb LA. Random sequence mutagenesis and resistance to 5-fluorouridine in human thymidylate synthases. *J Biol Chem* 1998; 273(40):25809-25817.
- (296) Muller H, Helin K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470(1):M1-12.
- (297) Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; 12(15):2245-2262.
- (298) Banerjee D, Schnieders B, Fu JZ, Adhikari D, Zhao SC, Bertino JR. Role of E2F-1 in chemosensitivity. *Cancer Res* 1998; 58(19):4292-4296.
- (299) Kasahara M, Takahashi Y, Nagata T, Asai S, Eguchi T, Ishii Y et al. Thymidylate synthase expression correlates closely with E2F1 expression in colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7):2707-2711.
- (300) Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H. A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene* 2005; 24(8):1403-1411.
- (301) Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 2003; 3(3):247-258.
- (302) Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S et al. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2003; 278(24):21767-21773.
- (303) Zhou BB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(3):216-225.
- (304) Eastman A, Kohn EA, Brown MK, Rathman J, Livingstone M, Blank DH et al. A novel indolocarbazole, ICP-1, abrogates DNA damage-induced cell cycle arrest and enhances cytotoxicity: similarities and differences to the cell cycle checkpoint abrogator UCN-01. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(12):1067-1078.
- (305) Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(23):14795-14800.
- (306) Aschele C, Sobrero A, Faderan MA, Bertino JR. Novel mechanism(s) of resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules. *Cancer Res* 1992; 52(7):1855-1864.
- (307) Mulkins MA, Heidelberger C. Biochemical characterization of fluoropyrimidine-resistant murine leukemic cell lines. *Cancer Res* 1982; 42(3):965-973.

- (308) Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S et al. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1998; 4(10):2371-2376.
- (309) Diasio RB, Lu Z. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1994; 12(11):2239-2242.
- (310) Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB et al. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(12):966-973.
- (311) Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J et al. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* 2002; 98(4):498-504.
- (312) Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(1):56-67.
- (313) Candeil L, Gourdier I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F et al. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer* 2004; 109(6):848-854.
- (314) Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol* 2004; 66(1):25-32.
- (315) Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14):4661-4669.
- (316) Gourdier I, Crabbe L, Andreau K, Pau B, Kroemer G. Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene* 2004; 23(45):7449-7457.
- (317) Samimi G, Manorek G, Castel R, Breaux JK, Cheng TC, Berry CC et al. cDNA microarray-based identification of genes and pathways associated with oxaliplatin resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55(1):1-11.
- (318) Miyata Y, Yahara I. p53-independent association between SV40 large T antigen and the major cytosolic heat shock protein, HSP90. *Oncogene* 2000; 19(11):1477-1484.
- (319) Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(20):10832-10837.
- (320) Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L et al. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 2000; 275(14):10519-10526.
- (321) Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Effects of geldanamycin on signaling through activator-protein 1 in hypoxic HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1999; 59(16):3935-3940.

- (322) Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res* 2003; 63(24):8600-8605.
- (323) Mayer R, Lindle DW, Southworth SH, Cowan PL. Direct determination of molecular orbital symmetry of H₂S using polarized x-ray emission. *PHYSICAL REVIEW A* 1991; 43(1):235-241.
- (324) Griffiths GJ, Koh MY, Brunton VG, Cawthorne C, Reeves NA, Greaves M et al. Expression of kinase-defective mutants of c-Src in human metastatic colon cancer cells decreases Bcl-xL and increases oxaliplatin- and Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(44):46113-46121.
- (325) Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(34):8688-8696.
- (326) Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12(1):19-23.
- (327) von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1):258-261.
- (328) Crane CH, Thames HD, Hamilton SR. Will identifying or targeting altered marker expression in response to cytotoxic therapy be of prognostic or therapeutic value? *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3381-3382.
- (329) Chen CC, Lee RC, Lin JK, Wang LW, Yang SH. How accurate is magnetic resonance imaging in restaging rectal cancer in patients receiving preoperative combined chemoradiotherapy? *Dis Colon Rectum* 2005; 48(4):722-728.
- (330) Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. *N Engl J Med* 1997; 336(14):980-987.
- (331) De Paoli A, Innocente R, Buonadonna A, Boz G, Sigon R, Canzonieri V et al. Neoadjuvant therapy of rectal cancer new treatment perspectives. *Tumori* 2004; 90(4):373-378.
- (332) Gillespie JW, Ahram M, Best CJ, Swalwell JI, Krizman DB, Petricoin EF et al. The role of tissue microdissection in cancer research. *Cancer J* 2001; 7(1):32-39.
- (333) Crnogorac-Jurcevic T, Nielsen TO, Lemoine NR. RT-PCR from laser-capture microdissected samples. *Methods Mol Biol* 2002; 193:197-204.:197-204.
- (334) Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):5974-5979.
- (335) Perou CM, Jeffrey SS, van de RM, Rees CA, Eisen MB, Ross DT et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16):9212-9217.
- (336) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270(5235):467-470.
- (337) Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J et al. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2001; 22(10):1615-1623.

- (338) Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH et al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 2006; 118(1):6-10.
- (339) Allcock RJ, Williams JH, Price P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. *Genes Cells* 2001; 6(5):487-494.
- (340) Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y et al. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 2006; 66(24):11565-11570.
- (341) Singh MK, Nicolas E, Gherraby W, Dadke D, Lessin S, Golemis EA. HEI10 negatively regulates cell invasion by inhibiting cyclin B/Cdk1 and other promotility proteins. *Oncogene* 2007; 26(33):4825-4832.
- (342) Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO et al. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell* 2001; 12(6):1843-1857.
- (343) Kayed H, Kleeff J, Kolb A, Ketterer K, Keleg S, Felix K et al. FXYD3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth. *Int J Cancer* 2006; 118(1):43-54.
- (344) Kensler TW, Groopman JD, Eaton DL, Curphey TJ, Roebuck BD. Potent inhibition of aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis by the monofunctional enzyme inducer 1,2-dithiole-3-thione. *Carcinogenesis* 1992; 13(1):95-100.
- (345) Clapper ML, Szarka CE. Glutathione S-transferases--biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112:377-88.:377-388.
- (346) Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 2006; 25(51):6731-6748.
- (347) Togashi A, Katagiri T, Ashida S, Fujioka T, Maruyama O, Wakumoto Y et al. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res* 2005; 65(11):4817-4826.
- (348) Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, Hamada K, Miyata K, Matsumoto S et al. Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Res* 2003; 63(20):6651-6657.
- (349) Galaup A, Cazes A, Le Jan S, Philippe J, Connault E, Le Coz E et al. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(49):18721-18726.
- (350) Sengupta P, Xu Y, Wang L, Widom R, Smith BD. Collagen alpha1(I) gene (COL1A1) is repressed by RFX family. *J Biol Chem* 2005; 280(22):21004-21014.
- (351) Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD et al. Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. *Int J Mol Med* 2006; 17(4):583-590.
- (352) Bendardaf R, Lamlum H, Vihinen P, Ristamaki R, Laine J, Pyrhonen S. Low collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2003; 65(4):337-346.
- (353) Malhotra S, Newman E, Eisenberg D, Scholes J, Wieczorek R, Mignatti P et al. Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase expression from adenoma to

- colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. *Dis Colon Rectum* 2002; 45(4):537-543.
- (354) Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM. The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(5):541-545.
- (355) Nguyen BP, Gil SG, Carter WG. Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000; 275(41):31896-31907.
- (356) van der Gaag EJ, Leccia MT, Dekker SK, Jalbert NL, Amodeo DM, Byers HR. Role of zyxin in differential cell spreading and proliferation of melanoma cells and melanocytes. *J Invest Dermatol* 2002; 118(2):246-254.
- (357) Amsellem V, Kryszke MH, Hervy M, Subra F, Athman R, Leh H et al. The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing tumor cells. *Exp Cell Res* 2005; 304(2):443-456.
- (358) Sy SM, Lai PB, Pang E, Wong NL, To KF, Johnson PJ et al. Novel identification of zyxin upregulations in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19(8):1108-1116.
- (359) Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Pietu G, Robert A, Redeuilh G et al. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) -- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65(1):195-202.
- (360) Garraway IP, Seligson D, Said J, Horvath S, Reiter RE. Trefoil factor 3 is overexpressed in human prostate cancer. *Prostate* 2004; 61(3):209-214.
- (361) Phan E, Ahluwalia A, Tarnawski AS. Role of SPARC--matricellular protein in pathophysiology and tissue injury healing. Implications for gastritis and gastric ulcers. *Med Sci Monit* 2007; 13(2):RA25-RA30.
- (362) Yang E, Kang HJ, Koh KH, Rhee H, Kim NK, Kim H. Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer* 2007; 121(3):567-575.
- (363) Proud CG. Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 279:215-44.:215-244.
- (364) Arora S, Yang JM, Hait WN. Identification of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of the stability of eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Cancer Res* 2005; 65(9):3806-3810.
- (365) Tzima E, Schimmel P. Inhibition of tumor angiogenesis by a natural fragment of a tRNA synthetase. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(1):7-10.
- (366) Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci* 2004; 20(1):144-160.
- (367) Kim H, Kang HJ, You KT, Kim SH, Lee KY, Kim TI et al. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* 2006; 6(11):3466-3476.
- (368) Huang KC, Rao PH, Lau CC, Heard E, Ng SK, Brown C et al. Relationship of XIST expression and responses of ovarian cancer to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(10):769-776.

- (369) Boyer J, Allen WL, McLean EG, Wilson PM, McCulla A, Moore S et al. Pharmacogenomic identification of novel determinants of response to chemotherapy in colon cancer. *Cancer Res* 2006; 66(5):2765-2777.
- (370) Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005; 436(7050):518-524.
- (371) Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Kulle B, Aust DE, Baretton GB et al. Lymph node status and TS gene expression are prognostic markers in stage II/III rectal cancer after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2006; 24(25):4062-4068.
- (372) Bertolini F, Bengala C, Losi L, Pagano M, Iachetta F, Dealis C et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68(5):1455-1461.
- (373) El Rifai W, Moskaluk CA, Abdrabbo MK, Harper J, Yoshida C, Riggins GJ et al. Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. *Cancer Res* 2002; 62(23):6823-6826.
- (374) Mahmood A, Melley L, Fitzgerald AJ, Ghosh S, Playford RJ. Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21(11):1357-1364.
- (375) Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64(19):7099-7109.
- (376) End DW, Smets G, Todd AV, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P et al. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res* 2001; 61(1):131-137.
- (377) Van Cutsem E, van d, V, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(8):1430-1438.
- (378) Ren H, Tai SK, Khuri F, Chu Z, Mao L. Farnesyltransferase inhibitor SCH66336 induces rapid phosphorylation of eukaryotic translation elongation factor 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65(13):5841-5847.

Anexo

Anexo 1. Genoteca correspondiente al paciente A

Secuencia Tag	Antes	Después	P	Nº Identificación Unigene	Gen
TCCCCGTACA	48	4	0	No existe	EST
GGTGGTGTCT	71	23	0	Hs.2704	GPX2
GTTGTGGTTA	34	80	0	Hs.534255	B2M
TGGAATGAC	5	37	0	Hs.172928	COL1A1
GCAGGGCCTC	86	36	0	Hs.301350	FYXD3
ATGTGAAGAG	2	26	1,00136E-05	Hs.111779	SPARC
GGGCTGGGGT	171	104	0,00002	Hs.425125	RPL29
ACTTTTTCAA	57	23	5,99623E-05	Hs.550481	MYO5B
CCCATCGTCC	258	185	0,00013	Hs.465061	SMAD2
CACCCCTGAT	40	14	0,000249982	Hs.173724	CKB
GCAGCCATCC	104	63	0,00058	Hs.356371	RPL28
TGCCCTCAGG	10	0	0,000949979	Hs.204238	LCN2
GCCTGTATGA	22	6	0,001434922	Hs.356794	RPS24
GCGCTGGAGT	25	8	0,001930475	Hs.110695	SF3B5
GGTTTGGCTT	11	1	0,003008604	Hs.481571	UQCRH
AGCAGATCAG	21	44	0,003500462	Hs.143873	S100A10
GCCCTGCTG	0	8	0,003730655	Hs.433845	KRT5
TACCATCAAT	15	35	0,003859043	Hs.544577	GAPD
CTCCCCAAG	41	20	0,00387013	Hs.514635	PCYT2
CTCCACCCGA	26	10	0,004563093	Hs.82961	TFF3
TAGTTGTCT	28	53	0,004584789	Hs.374596	TPT1
CTGCCAAGTT	8	23	0,005667925	Hs.490415	ZYX
TTGGGGTTTC	12	29	0,007028937	Hs.448738	FTH1
TTGGTCTCT	42	70	0,007185936	Hs.517472	RPL41
ACATTGGGTG	19	6	0,007210851	Hs.380135	FABP1
GAAAAATGGT	15	4	0,007609248	Hs.496451	LAMR1P15
GGGTTGGCTT	41	22	0,008192062	Hs.481571	UQCRH
GAGGGAGTTT	72	47	0,009899974	Hs.523463	RPL27A
TTCATACACC	13	29	0,011152029	Hs.458959	FBXO22
TCCCTATTAA	28	13	0,013469815	No existe	EST
GGATTTGGCC	79	54	0,013745666	Hs.437594	RPLP2
AAGGGGCAA	0	6	0,017318964	Hs.370255	ITGB4
TTGCTGACTT	0	6	0,017318964	Hs.474053	COL6A1
CAATAAATGT	0	6	0,017318964	Hs.524971	RPL37
AGCTCTTGGA	15	5	0,018875003	Hs.334841	SELENBP1
GTGCTGGACC	10	2	0,019219637	Hs.512410	PSME2
GGCAAGAAGA	8	1	0,019455194	Hs.514196	RPL27
AACCCGGGAG	29	15	0,019996047	Hs.522928	C10orf72
GTGAAGGCAG	47	29	0,020358324	Hs.356572	RPS3A
CTTCCTTGCC	2	10	0,023419261	Hs.2785	KRT17
TGCAGTCACT	2	10	0,023419261	Hs.83169	MMP1
AGCACCTCCA	52	34	0,025733352	Hs.515070	eEF2

GCATAATAGG	68	47	0,02575326	Hs.381123	RPL21
GGGCATCTCT	14	5	0,028645039	Hs.520048	HLA-DRA
TTACCATATC	2	9	0,030057073	Hs.546284	RPL29
GTGGTGTGCA	7	1	0,032456994	Hs.469723	CHC1
GAGTGGGGGC	7	1	0,032456994	Hs.37916	DPP7
TGTCTGTGGT	7	1	0,032456994	Hs.254042	BAT1
GCGGCAGCGG	0	5	0,032765388	Hs.271224	PH-4
TAACCAATCA	0	5	0,032765388	Hs.514182	RAB5C
CAGTTCTCTG	0	5	0,032765388	Hs.521487	EST
TGCAGGCCTG	9	2	0,035423279	Hs.497599	WARS
GTGGCCACGG	1	7	0,0380373	Hs.122405	S100A9
ATCAGTGGCT	1	7	0,0380373	Hs.89545	PSMB4
GACGACACGA	32	19	0,03859508	Hs.546293	RPS28
TCGCCGCGAC	4	12	0,043233871	Hs.433701	RPL37A
AGGTCAGGAG	19	9	0,046253443	Hs.529420	UBE2G2
GAACACATCC	13	5	0,047258973	Hs.381061	RPL19
TGCTGCCTGT	13	5	0,047258973	Hs.118110	BST2
CCACTGCACT	123	99	0,047370914	Hs.107003	CCNB1IP1
CAAGCATCCC	8	2	0,047528505	No existe	EST
GCCCCAATA	6	15	0,047915697	Hs.445351	LGALS1
CAGCGCGCCC	14	6	0,048520088	Hs.446474	EST
CCTCCAGCAG	0	4	0,049652457	Hs.17466	RARRES3
TGAGCCCGGC	0	4	0,049652457	Hs.238839	SCYL1
GGAGGGATCA	0	4	0,049652457	Hs.5158	ILK
CTCATCTGCT	0	4	0,049652457	Hs.224607	SDC1
AGCCACCGCA	0	4	0,049652457	Hs.129959	IL17RC
CCTCAGGATA	0	4	0,049652457	Hs.513797	SLC7A5
GTTAACGTCC	0	4	0,049652457		
GGCTCGGGAT	0	4	0,049652457		
GATTAAGTGA	0	4	0,049652457		
GTAGCAGGGC	0	4	0,049652457		
TGAAGGAGCC	0	4	0,049652457		
GCTGTTGCGC	0	4	0,049652457		
CTAGCCTCAC	2	8	0,053504586		
GGGACGAGTG	2	8	0,053504586		
CACTTGCCCT	2	8	0,053504586		
ACCAAAAACC	2	8	0,053504586		
TTCGGTTGGT	2	8	0,053504586		
GCCGAGGAAG	17	8	0,056274652		
GAAATAAAGC	17	8	0,056274652		
GCCCAGGTCA	8	17	0,058823586		
GCCAAGGGCC	4	0	0,059066772		
ATCCTGAGTT	4	0	0,059066772		
TACCTCTGAT	4	0	0,059066772		
CCACACACCG	4	0	0,059066772		
GGAGAAACAG	4	0	0,059066772		

CCGAGGCTTG	4	0	0,059066772		
CCACTGCAGT	4	0	0,059066772		
GGGGTGCTGT	4	0	0,059066772		
ACTCCAAAA	4	0	0,059066772		
GCCTGGGCTG	11	4	0,059101701		
GGAACAAACA	16	8	0,060240984		
CCCGTCCGGA	56	41	0,063532352		
ATGTGTAACG	1	6	0,064432979		
GTTACATTA	4	11	0,066533566		
CGCCTGTAGT	6	1	0,067613244		
TGTCGCTGGG	6	1	0,067613244		
CGCCGCCGGC	63	47	0,070028067		
CGCTGGTTCC	14	24	0,072568893		
GTGAAACCCT	37	25	0,072886348		
CTGACCTGTG	9	17	0,076045632		
AGCCCTACAA	10	19	0,076511145		
TGGGCAAAGC	26	16	0,077279806137085		
GTGCACTGAG	35	50	0,07911396		
ACCCTTGGCC	2	7	0,080840707		
AGGTCTGCCA	2	7	0,080840707		
TAATAAAGGT	3	9	0,081234813		
CTCATAGCAG	3	9	0,081234813		
GATCTCTTGG	3	9	0,081234813		
GGGAGGGGTG	4	10	0,081499577		
ATCACGCCCT	4	10	0,081499577		
CCTGGGAAGT	7	2	0,082034469		
CAAGCAGGAC	7	2	0,082034469		
GTGAGACCCC	7	2	0,082034469		
CCAGGCACGC	7	2	0,082034469		
TAAGGAGCTG	44	31	0,082781434		
CAATGCTGCC	10	4	0,089285731		
TCCACGCACC	5	1	0,091996312		
ATCGCACACC	5	1	0,091996312		
ACCTCCCACC	5	1	0,091996312		
AGCCTGGACT	5	1	0,091996312		
ATTGCACCAC	5	1	0,091996312		
CTGGAGGCTG	5	1	0,091996312		
GAGAACCGTA	5	1	0,091996312		
AAGACAGTGG	42	31	0,10152280330658		
CAAACCATCC	11	5	0,103305816650391		
GCGGAGAGAG	1	5	0,104712009429932		
GGGGTCAGGG	1	5	0,104712009429932		
GGTTGGCAGG	1	5	0,104712009429932		
TGGTTTTGGC	1	5	0,104712009429932		
GTGGCATCAC	1	5	0,104712009429932		
CCTGGTCCCA	1	5	0,104712009429932		

CCACGGGATT	1	5	0,104712009429932		
CTGGGAGAGG	1	5	0,104712009429932		
AGCTGTCCCC	1	5	0,104712009429932		
TGTTCTGGAG	1	5	0,104712009429932		
TTTCCTCTCA	1	5	0,104712009429932		
TGGTTTGCGT	1	5	0,104712009429932		
GGAAGGCAC	1	5	0,104712009429932		
TGTGCTAAAT	17	10	0,108108162879944		
AGGTGGCAAG	9	4	0,111111164093018		
GGCGACAGAG	8	3	0,113636374473572		
AACCCAGGAG	15	8	0,116144061088562		
AACCTGGGAG	15	8	0,116144061088562		
TGAGGGAATA	5	11	0,117096066474915		
GTGGGGCTAG	3	0	0,11904764175415		
CTCGAGGAGG	3	0	0,11904764175415		
CTGGGCAAAC	3	0	0,11904764175415		
TACCAAGCCA	3	0	0,11904764175415		
TGCTGCCCTG	3	0	0,11904764175415		
TAGACTAGCA	3	0	0,11904764175415		
GTGAAAGCCC	3	0	0,11904764175415		
GTGAACCCCC	3	0	0,11904764175415		
AGACTGATCC	3	0	0,11904764175415		
CGCGCCCGGC	3	0	0,11904764175415		
GGTGGAGTGT	3	0	0,11904764175415		
CTACTGCACT	3	0	0,11904764175415		
ATTATTTTTTC	3	0	0,11904764175415		
CCTCGGAAAA	3	0	0,11904764175415		
AGGCGGAGGT	3	0	0,11904764175415		
CTGGGCGGCA	3	0	0,11904764175415		
CCAAAGCCAG	3	0	0,11904764175415		
CCCATCCCCC	3	0	0,11904764175415		
GCTGGATGCG	3	0	0,11904764175415		
ACAGCCTGCA	3	0	0,11904764175415		
GCTCACTGCA	3	0	0,11904764175415		
GCACTGCACT	3	0	0,11904764175415		
GCTAAGGAGA	3	0	0,11904764175415		
GGCTGGGTTT	3	0	0,11904764175415		
GGCCGAGGGC	3	0	0,11904764175415		
TGGTGGGGTG	3	0	0,11904764175415		
TTTTCTGCTG	3	0	0,11904764175415		
GCACAAGAAG	3	0	0,11904764175415		
AAAAAAAAAA	6	2	0,122249364852905		
CCCTGGGTTT	6	2	0,122249364852905		
GTGACCACGG	6	2	0,122249364852905		
GTGTTGCACA	6	2	0,122249364852905		
GCAAGACCTT	6	2	0,122249364852905		

CCACTGCCCT	6	2	0,122249364852905		
GAGACTCCTG	6	12	0,12453305721283		
CTGTTGATTG	14	8	0,126262664794922		
TGGAATGCTG	14	8	0,126262664794922		
AACGCGGCCA	20	13	0,127713918685913		
TGTACCTGTA	4	9	0,132275104522705		
ATGGCTGGTA	18	11	0,132625937461853		
GGAGGCTGAG	10	5	0,135501384735107		
TTGGTCAGGC	7	13	0,137551546096802		
CCCCAGTTGC	12	19	0,139082074165344		
GGGGAAATCG	16	10	0,139082074165344		
ACACAGCAAG	23	16	0,142247557640076		
GGACCACTGA	38	29	0,14641284942627		
GTGGCAGCGC	0	3	0,14814817905426		
ACACTTGGAG	0	3	0,14814817905426		
AGAGGTGGTG	0	3	0,14814817905426		
GCAACAGCAA	0	3	0,14814817905426		
TTGAATTCCC	0	3	0,14814817905426		
TGCTGTGTGC	0	3	0,14814817905426		
CCTCCCCCGT	0	3	0,14814817905426		
TTCCGCGTGC	0	3	0,14814817905426		
GTGCTAAGCG	0	3	0,14814817905426		
GAGGTTTGAA	0	3	0,14814817905426		
AGGAGGGAGG	0	3	0,14814817905426		
GTCTGACCCC	0	3	0,14814817905426		
TAAACCGGAA	0	3	0,14814817905426		
TTTTGGGGGC	0	3	0,14814817905426		
TTTGTGACTG	0	3	0,14814817905426		
CACTACTCAC	0	3	0,14814817905426		
TTTCTGCTCC	0	3	0,14814817905426		
CAGAAGAGGC	0	3	0,14814817905426		
GCTAGGTTTA	0	3	0,14814817905426		
TTGTCCAGAG	0	3	0,14814817905426		
CAGGGAGCGC	0	3	0,14814817905426		
GCACCTCAGC	0	3	0,14814817905426		
ATGGCAGGAG	0	3	0,14814817905426		
AGTTTCCCAA	0	3	0,14814817905426		
GCAGGGTGGG	0	3	0,14814817905426		
CCACCACACT	0	3	0,14814817905426		
TCTTGTGCAT	0	3	0,14814817905426		
CCACTGCACA	0	3	0,14814817905426		
AAGCTGAGTG	0	3	0,14814817905426		
CCAGGAGGAA	0	3	0,14814817905426		
ATCAGTGTGC	0	3	0,14814817905426		
GTGGGGCCAA	0	3	0,14814817905426		
TGATGTCTGG	0	3	0,14814817905426		

ATGGCGGGCA	0	3	0,14814817905426		
AGAGGTGTAG	0	3	0,14814817905426		
CTTTGATCAG	0	3	0,14814817905426		
CTGTCCGCTG	0	3	0,14814817905426		
GAAGTGTCTAG	0	3	0,14814817905426		
TGTGGAACC	0	3	0,14814817905426		
GGGGATGGGG	0	3	0,14814817905426		
AGAACCTTCA	0	3	0,14814817905426		
AGATGAGATG	0	3	0,14814817905426		
CTGGCCAGGC	0	3	0,14814817905426		
TCACTGAGTT	0	3	0,14814817905426		
GGCCGGGGGC	0	3	0,14814817905426		
CTTCTACTAA	0	3	0,14814817905426		
TGGAAGGGCT	0	3	0,14814817905426		
CTGAGTAGTG	0	3	0,14814817905426		
GCAGCTCAGG	2	6	0,148588418960571		
CCCCCTGCAG	2	6	0,148588418960571		
CCCAAGCTAG	2	6	0,148588418960571		
GGGCCTGTGC	2	6	0,148588418960571		
AGCTGGTTTC	2	6	0,148588418960571		
TGCCTCTGCG	7	3	0,14970064163208		
GCTCAGCTGG	7	3	0,14970064163208		
GGGATGGCAG	7	3	0,14970064163208		
CTGGGTCTCC	7	3	0,14970064163208		
CTCGCGCTGG	17	11	0,154798746109009		
GAAGCAGGAC	55	44	0,160513639450073		
CCCCAGCCAG	17	24	0,161812305450439		
CACAAACGGT	28	21	0,163132190704346		
GTGGCAGGCG	9	5	0,171526551246643		
AATAGGTCCA	13	8	0,17241382598877		
TTGGCCAGGC	22	30	0,173010349273682		
ACTTACCTGC	3	7	0,177304983139038		
GCTGCTCCCT	3	7	0,177304983139038		
AAGGAGATGG	11	6	0,177619934082031		
GGCACCGTGC	8	4	0,179211497306824		
CGCAAGCTGG	8	4	0,179211497306824		
CTGGCGAGCG	4	1	0,179533243179321		
GCAGGAGAAG	4	1	0,179533243179321		
GTGGTACAGG	4	1	0,179533243179321		
ATCGTGCCAC	4	1	0,179533243179321		
CTGTGTGACT	4	1	0,179533243179321		
GCAGAAAATT	4	1	0,179533243179321		
GTGGTGGGCG	4	1	0,179533243179321		
GCCAACTTG	4	1	0,179533243179321		
ACGCAGGGAG	4	1	0,179533243179321		
CCCATCGTCT	4	1	0,179533243179321		

AAGCCAGCCC	4	1	0,179533243179321		
TGTGCTCGGG	4	1	0,179533243179321		
TAGGCCCAAG	4	1	0,179533243179321		
CGCACCATTG	4	1	0,179533243179321		
GACCCAAGAT	4	1	0,179533243179321		
GCCTTGATGA	4	1	0,179533243179321		
CTGGGTGCCT	4	1	0,179533243179321		
GCCCCTGCGC	4	1	0,179533243179321		
GGAATGTACG	15	10	0,183823585510254		
ACATCATCGA	33	26	0,186567187309265		
AGAACCTTCC	4	8	0,202020168304443		
ATTCTCCAGT	4	8	0,202020168304443		
CAGGAGACCC	4	8	0,202020168304443		
TCACCACACC	2	0	0,21321964263916		
GCCGCCCTCG	2	0	0,21321964263916		
CCAAAGCTAT	2	0	0,21321964263916		
GCAGTGCCAC	2	0	0,21321964263916		
GCCTGAGGGG	2	0	0,21321964263916		
CTGTTGTTGG	2	0	0,21321964263916		
GTTGCTCTAT	2	0	0,21321964263916		
CACCATTCAG	2	0	0,21321964263916		
GGGTTGGCCT	2	0	0,21321964263916		
CAATGGCTTG	2	0	0,21321964263916		
GCCGGCTCTT	2	0	0,21321964263916		
CACCCCATCC	2	0	0,21321964263916		
CTGCCCCGGA	2	0	0,21321964263916		
CTGATTTTTG	2	0	0,21321964263916		
TAAAGTGCT	2	0	0,21321964263916		
GGGCCTTGGA	2	0	0,21321964263916		
CACCACCACA	2	0	0,21321964263916		
GTTCTCAGC	2	0	0,21321964263916		
GCCCAGGCC	2	0	0,21321964263916		
GGGGGAGTTT	2	0	0,21321964263916		
CTGGCTAACA	2	0	0,21321964263916		
GCTAACACGG	2	0	0,21321964263916		
CAGCTGTAGT	2	0	0,21321964263916		
CAGGGCTCGC	2	0	0,21321964263916		
TAGCAGCAAC	2	0	0,21321964263916		
GCGGCGCCCT	2	0	0,21321964263916		
GCCACCACCA	2	0	0,21321964263916		
CAGTCCCAGC	2	0	0,21321964263916		
CATCTAGAGG	2	0	0,21321964263916		
GCGGCCTCAG	2	0	0,21321964263916		
GGGTATGCAA	2	0	0,21321964263916		
GGGGCAACAG	2	0	0,21321964263916		
GCGATGCAGG	2	0	0,21321964263916		

GCCAAAAAAA	2	0	0,21321964263916		
GCAGTGTGCG	2	0	0,21321964263916		
CACGCGGGGG	2	0	0,21321964263916		
CACGCACACA	2	0	0,21321964263916		
CAGGATGACG	2	0	0,21321964263916		
GGGGTGCCCT	2	0	0,21321964263916		
TATGCTTAGT	2	0	0,21321964263916		
CAGTGATTCC	2	0	0,21321964263916		
CCGGGCGTGG	2	0	0,21321964263916		
CCGCCTTCTC	2	0	0,21321964263916		
GTACCGAGGG	2	0	0,21321964263916		
CCTCCCACAG	2	0	0,21321964263916		
GGAGTGACACA	2	0	0,21321964263916		
GTAACGCAGA	2	0	0,21321964263916		
CCGTTGCACT	2	0	0,21321964263916		
GTGACACTCG	2	0	0,21321964263916		
GTGAGACCTG	2	0	0,21321964263916		
CGCTGTTTTT	2	0	0,21321964263916		
GAGTGAGACC	2	0	0,21321964263916		
CCGCTTCACT	2	0	0,21321964263916		
GTGCCC GCCG	2	0	0,21321964263916		
GGAGCACTGT	2	0	0,21321964263916		
GGCTGCACGG	2	0	0,21321964263916		
GTGGTGCGTG	2	0	0,21321964263916		
GAGTATAAAT	2	0	0,21321964263916		
GTGAAACCTT	2	0	0,21321964263916		
GA CTGTGCCA	2	0	0,21321964263916		
GTCTCTTTCT	2	0	0,21321964263916		
GAGAAAACCT	2	0	0,21321964263916		
GGCTACAGAG	2	0	0,21321964263916		
CCTGGAATCC	2	0	0,21321964263916		
GACACTGAAA	2	0	0,21321964263916		
GAGGGCCGTG	2	0	0,21321964263916		
GAGACTTCTG	2	0	0,21321964263916		
GTGGAACCTT	2	0	0,21321964263916		
GGCAGGCTGT	2	0	0,21321964263916		
GAGCCGCCAA	2	0	0,21321964263916		
GGCACCGTGG	2	0	0,21321964263916		
GAATTGGAGT	2	0	0,21321964263916		
GTGAAATCCT	2	0	0,21321964263916		
GAGGCCGGCC	2	0	0,21321964263916		
GTGAAACCGT	2	0	0,21321964263916		
CTCTGCCCTC	2	0	0,21321964263916		
GTGCTGGCTC	2	0	0,21321964263916		
GGGAGGGAAG	2	0	0,21321964263916		
GCTGGTGCCT	2	0	0,21321964263916		

CCACTGTGCT	2	0	0,21321964263916		
CCAGGACACC	2	0	0,21321964263916		
GTATAATTTG	2	0	0,21321964263916		
GCTGTTCAAT	2	0	0,21321964263916		
GGAACAGGGG	2	0	0,21321964263916		
GCACCATCAG	2	0	0,21321964263916		
CCACTGGACT	2	0	0,21321964263916		
GCAGCCTGGG	2	0	0,21321964263916		
GTGGTGTGCG	2	0	0,21321964263916		
GTGGTGTGTA	2	0	0,21321964263916		
GTGGTGTGTG	2	0	0,21321964263916		
CCACTGCGCT	2	0	0,21321964263916		
GCCTGAGCCT	2	0	0,21321964263916		
GTGGCCTGCA	2	0	0,21321964263916		
GGGAAACAGG	2	0	0,21321964263916		
GGAACGGATG	2	0	0,21321964263916		
CCCTGGTGGG	2	0	0,21321964263916		
CTCCACAAAT	2	0	0,21321964263916		
GGGAAGTCAC	2	0	0,21321964263916		
GGGACGAGAA	2	0	0,21321964263916		
GTGGGTGTCC	2	0	0,21321964263916		
CTTGGCCCAA	2	0	0,21321964263916		
GTGTATGTGG	2	0	0,21321964263916		
GCAAGGAACA	2	0	0,21321964263916		
GGGAGCCCGG	2	0	0,21321964263916		
CCCACCCTTG	2	0	0,21321964263916		
CCCACACTAC	2	0	0,21321964263916		
GTGGCTCAGG	2	0	0,21321964263916		
GCACCACTGC	2	0	0,21321964263916		
GGAAACGTGG	2	0	0,21321964263916		
ACAGCCAAGA	2	0	0,21321964263916		
AAATACAGCA	2	0	0,21321964263916		
AGGGAAAGAG	2	0	0,21321964263916		
AGCCGAGATT	2	0	0,21321964263916		
AGCCGAGATG	2	0	0,21321964263916		
TCTCCAGGAA	2	0	0,21321964263916		
TTGGACTGAG	2	0	0,21321964263916		
ACCCCAACCT	2	0	0,21321964263916		
AACCCTCCCT	2	0	0,21321964263916		
AACCCGGAAG	2	0	0,21321964263916		
ATCCAGGATG	2	0	0,21321964263916		
TGGATGCTGT	2	0	0,21321964263916		
TCTGCCTCGT	2	0	0,21321964263916		
AACACAGCCT	2	0	0,21321964263916		
ACCTCCACAC	2	0	0,21321964263916		
ATGTGACACT	2	0	0,21321964263916		

ACCTGGGTGC	2	0	0,21321964263916		
AGCAGATACA	2	0	0,21321964263916		
ATAGACGCAA	2	0	0,21321964263916		
TTGCCCAGTC	2	0	0,21321964263916		
TCCTCAAGAT	2	0	0,21321964263916		
TTGCCAACAC	2	0	0,21321964263916		
ATGGTGGGTG	2	0	0,21321964263916		
TGACGTCAGC	2	0	0,21321964263916		
AGCTGCCTAC	2	0	0,21321964263916		
TGAAACTCAT	2	0	0,21321964263916		
AAGACAGAGG	2	0	0,21321964263916		
ACAATGGAGG	2	0	0,21321964263916		
AGGACTTCTG	2	0	0,21321964263916		
TGCTGAGGAA	2	0	0,21321964263916		
TGGAAAGTGA	2	0	0,21321964263916		
TTCCCTCGTG	2	0	0,21321964263916		
TTGTCTGCCT	2	0	0,21321964263916		
AGCGCTGATG	2	0	0,21321964263916		
TTGTGGGATC	2	0	0,21321964263916		
TGGCAAAAAA	2	0	0,21321964263916		
TTATCAAATC	2	0	0,21321964263916		
ATCCTGGCAG	2	0	0,21321964263916		
ATCCGCCTGC	2	0	0,21321964263916		
AGTGAACTCC	2	0	0,21321964263916		
ACAGCTTTGT	2	0	0,21321964263916		
TCTGGGGACG	2	0	0,21321964263916		
ATGCCAGCTG	2	0	0,21321964263916		
ATCCCTCATC	2	0	0,21321964263916		
TGCCTCCCAT	2	0	0,21321964263916		
TGCCTGTGGT	2	0	0,21321964263916		
TGGTGACATT	2	0	0,21321964263916		
ATTTTTTCAG	2	0	0,21321964263916		
TTGATGCCCG	2	0	0,21321964263916		
CAAAAAAAA	2	0	0,21321964263916		
TCCAGGCAGT	2	0	0,21321964263916		
AAAGCCAAGA	2	0	0,21321964263916		
CAAGCCTGGG	2	0	0,21321964263916		
TGCAGATTGC	2	0	0,21321964263916		
TGGGCCCTT	2	0	0,21321964263916		
CAACGTCCTG	2	0	0,21321964263916		
AAGGCACAGA	2	0	0,21321964263916		
AGGTGCCTCG	2	0	0,21321964263916		
AGTTTGTTAG	2	0	0,21321964263916		
TCCAGTCCGG	2	0	0,21321964263916		
ACTTTTTAAA	2	0	0,21321964263916		
TTTTGAAGCA	2	0	0,21321964263916		

AGAAAAAAAA	2	0	0,21321964263916		
AGTAACTGAG	2	0	0,21321964263916		
AGCAAAGTGA	2	0	0,21321964263916		
TGGGTGAAAA	2	0	0,21321964263916		
AAACAGTAGT	2	0	0,21321964263916		
AGAGCCAAGT	2	0	0,21321964263916		
TGGTAGTTAC	2	0	0,21321964263916		
TTTTGAGGCT	2	0	0,21321964263916		
GGCTGGGGGC	37	31	0,214132785797119		
CCCCCTGGAT	8	13	0,2173912525177		
GGCAAGCCCC	38	31	0,218340635299683		
GTGGCGGGCG	10	6	0,223214268684387		
GCCCAGCGGC	10	6	0,223214268684387		
GCTGCCCTTG	10	6	0,223214268684387		
TATTGACAAC	1	4	0,228832960128784		
GAATCCAAC	1	4	0,228832960128784		
GTGCTTGAC	1	4	0,228832960128784		
GCCACTACCC	1	4	0,228832960128784		
ATGGCGATCT	1	4	0,228832960128784		
GGAATAAATT	1	4	0,228832960128784		
TAACCCAGCA	1	4	0,228832960128784		
GGCAGAGGAC	1	4	0,228832960128784		
CCTGGAAGAG	1	4	0,228832960128784		
GTGGTGCACG	1	4	0,228832960128784		
CAGTGTGGG	1	4	0,228832960128784		
AGCCACCGCG	1	4	0,228832960128784		
GTGGGCCGCT	1	4	0,228832960128784		
ATGGGGGTGA	1	4	0,228832960128784		
TTGCCGGTTA	1	4	0,228832960128784		
CGGCTGGTGA	1	4	0,228832960128784		
TTTGCACCTT	1	4	0,228832960128784		
GCGACCGTCA	1	4	0,228832960128784		
ATGAGCTGAC	1	4	0,228832960128784		
TGTGGGTGCT	1	4	0,228832960128784		
GAGGGCAGC	0	2	0,244498729705811		
CCCTCGCATT	0	2	0,244498729705811		
GTGATTCCGC	0	2	0,244498729705811		
TTCCAGACCT	0	2	0,244498729705811		
AGGAGCGGGG	0	2	0,244498729705811		
AGGTTTTGTT	0	2	0,244498729705811		
CCGCTGTGCT	0	2	0,244498729705811		
GAGCCAACAA	0	2	0,244498729705811		
AGCTGTTCTG	0	2	0,244498729705811		
AATGATGGGG	0	2	0,244498729705811		
CCTCTCCTCC	0	2	0,244498729705811		
TGCTGGTGTG	0	2	0,244498729705811		

GGATCCTCGG	0	2	0,244498729705811		
GTGCCACAG	0	2	0,244498729705811		
GTGCTAGGG	0	2	0,244498729705811		
TGCAGTCCCT	0	2	0,244498729705811		
GTGCTGCGTG	0	2	0,244498729705811		
CCGTGGTCAC	0	2	0,244498729705811		
AGGGCTTCCT	0	2	0,244498729705811		
GAGGCCAGTG	0	2	0,244498729705811		
AATGACTGAA	0	2	0,244498729705811		
TGCATCTGGT	12	17	0,244498729705811		
TTCCTGGTAG	0	2	0,244498729705811		
GAGGCTGAGG	0	2	0,244498729705811		
ACAAACTTAG	0	2	0,244498729705811		
GTGAGTGCCC	0	2	0,244498729705811		
AAGTTGGGCT	0	2	0,244498729705811		
GGATTCCAGT	0	2	0,244498729705811		
TTCTGCACGT	0	2	0,244498729705811		
AGGCTGTTGG	0	2	0,244498729705811		
GAGGAAGAAG	0	2	0,244498729705811		
GGAGCGCCAG	0	2	0,244498729705811		
AATGAACTAA	0	2	0,244498729705811		
GTGACATCAC	0	2	0,244498729705811		
GAGTGAGGG	0	2	0,244498729705811		
CCGTGACTCT	0	2	0,244498729705811		
CTCCTGAAGG	0	2	0,244498729705811		
GGGCACCTGG	0	2	0,244498729705811		
ACGCAACAGG	0	2	0,244498729705811		
GGTGACCGTC	0	2	0,244498729705811		
TGTGAGGGAA	0	2	0,244498729705811		
CTCTACAGTG	0	2	0,244498729705811		
CTCGTTAAGA	0	2	0,244498729705811		
GGTTAACGTG	0	2	0,244498729705811		
GGTGCAGAGC	0	2	0,244498729705811		
CTGAGACACC	0	2	0,244498729705811		
TGTGCCCTGA	0	2	0,244498729705811		
CTTTCAGATG	0	2	0,244498729705811		
AGCACATTTG	0	2	0,244498729705811		
AGCAGCCCCT	0	2	0,244498729705811		
AGCCACCACG	0	2	0,244498729705811		
GACCACCTTT	0	2	0,244498729705811		
GGGAGCCTCA	0	2	0,244498729705811		
TGGTTCTATA	0	2	0,244498729705811		
GGGGATTTGG	0	2	0,244498729705811		
CTGGCCGTGG	0	2	0,244498729705811		
AGAACCTTAA	0	2	0,244498729705811		
CTGCTTTAGG	0	2	0,244498729705811		

GGGGAAATGA	0	2	0,244498729705811		
ACTGGTGGTC	0	2	0,244498729705811		
GGTATGGACA	0	2	0,244498729705811		
CTGTACCTGG	0	2	0,244498729705811		
CTGAGACAAA	0	2	0,244498729705811		
CTGCGGTGGC	0	2	0,244498729705811		
ACGGAACAGG	0	2	0,244498729705811		
TGGGAGGGAG	0	2	0,244498729705811		
AGAATTGCTT	0	2	0,244498729705811		
TGTAGGTCAT	0	2	0,244498729705811		
CTGTTGCTGG	0	2	0,244498729705811		
GGGAACTCC	0	2	0,244498729705811		
GGGCCTGGGG	0	2	0,244498729705811		
GAGACAGCAC	0	2	0,244498729705811		
ACAGACAGCA	0	2	0,244498729705811		
CCTGTCCAGC	0	2	0,244498729705811		
CCTGTAATCT	0	2	0,244498729705811		
GACTCTGGGA	0	2	0,244498729705811		
TGGAACAGGA	0	2	0,244498729705811		
CCTGGCTAAT	0	2	0,244498729705811		
GGGAAGTGTG	0	2	0,244498729705811		
GAGAAATGGG	0	2	0,244498729705811		
CGAATAAAAT	0	2	0,244498729705811		
GAGACCTTCT	0	2	0,244498729705811		
TGCTGTTGGA	0	2	0,244498729705811		
CCTGAGCCCG	0	2	0,244498729705811		
TTCAGTGCCT	0	2	0,244498729705811		
GTGAAACCAT	0	2	0,244498729705811		
TTCATTATAG	0	2	0,244498729705811		
ACACTACGGG	0	2	0,244498729705811		
ACCCACAGTT	0	2	0,244498729705811		
TGTGTTGGGA	0	2	0,244498729705811		
GTAAGATTTG	0	2	0,244498729705811		
GAAATGACCT	0	2	0,244498729705811		
TTAAAGGCCG	0	2	0,244498729705811		
CGGGGGTAAG	0	2	0,244498729705811		
CGGCCAGCC	0	2	0,244498729705811		
TTAGATCGTT	0	2	0,244498729705811		
GAAGCACAAAG	0	2	0,244498729705811		
GTCATAAGAG	0	2	0,244498729705811		
ACCAGCTCCC	0	2	0,244498729705811		
TGGAAGAATG	0	2	0,244498729705811		
TGGAACTGTG	0	2	0,244498729705811		
AGCGTCCGGT	0	2	0,244498729705811		
GATGAGGAGA	0	2	0,244498729705811		
TTACTTATAC	0	2	0,244498729705811		

GAGAGCCCCT	0	2	0,244498729705811		
AGCCATTGTG	0	2	0,244498729705811		
TACAATAAAC	0	2	0,244498729705811		
TACGTTGCAG	0	2	0,244498729705811		
CAGTTACAAA	0	2	0,244498729705811		
ATGGGGAGAG	0	2	0,244498729705811		
TAATAAATGT	0	2	0,244498729705811		
TTTAACTGAC	0	2	0,244498729705811		
TAATGGGAGT	0	2	0,244498729705811		
TCTCTGATGC	0	2	0,244498729705811		
GCCCAGCTGG	0	2	0,244498729705811		
CATCCTGCTG	0	2	0,244498729705811		
ATGGTCAGTA	0	2	0,244498729705811		
AACAGTCAAA	0	2	0,244498729705811		
CAGGCAGGAG	0	2	0,244498729705811		
CAGGAGGCAA	0	2	0,244498729705811		
CAGGAGGAGT	0	2	0,244498729705811		
CAGGACAGTT	0	2	0,244498729705811		
TCTGTGCTCA	0	2	0,244498729705811		
CAGGTTTCAT	0	2	0,244498729705811		
GTTTCTTCCC	0	2	0,244498729705811		
GTTCTGGTTT	0	2	0,244498729705811		
GCTATGCTCC	0	2	0,244498729705811		
GTTGGCCTGG	0	2	0,244498729705811		
AACTGCGGCA	0	2	0,244498729705811		
ATGATGGCAC	0	2	0,244498729705811		
GTTGTGGTTG	0	2	0,244498729705811		
TCTCTAGAAT	0	2	0,244498729705811		
GCCAGGCTGG	0	2	0,244498729705811		
TACTAGTCCT	0	2	0,244498729705811		
CCAATGCACG	0	2	0,244498729705811		
GCGGGTGTGG	0	2	0,244498729705811		
GATGGTGGTT	0	2	0,244498729705811		
CCAAATGATG	0	2	0,244498729705811		
GCAAAACCCT	0	2	0,244498729705811		
GCCCAGCCCT	0	2	0,244498729705811		
CATCTTCACC	0	2	0,244498729705811		
ATGCACGGCG	0	2	0,244498729705811		
TCAGTGTGTG	0	2	0,244498729705811		
GCGCGTGCTG	0	2	0,244498729705811		
TCCAGAATAA	0	2	0,244498729705811		
CACATCGACG	0	2	0,244498729705811		
TCCAAATCGA	0	2	0,244498729705811		
TCATCTACAA	0	2	0,244498729705811		
GCCTCCCAGG	0	2	0,244498729705811		
TATGGCTAGT	0	2	0,244498729705811		

TCACAGTGCC	0	2	0,244498729705811		
TCCATCGTCC	0	2	0,244498729705811		
GCCTCCCGCC	0	2	0,244498729705811		
TCAGGGAGAT	0	2	0,244498729705811		
TCAGATGGCG	0	2	0,244498729705811		
GCCTCCTCTT	0	2	0,244498729705811		
CAAGGATCTA	0	2	0,244498729705811		
CAAGGAGTCG	0	2	0,244498729705811		
TCAGAGATGA	0	2	0,244498729705811		
CAACTTAGTT	0	2	0,244498729705811		
CAGAGACGTG	0	2	0,244498729705811		
ATGTGCGTGG	0	2	0,244498729705811		
ATTAGCAGAG	0	2	0,244498729705811		
AACACACAGA	0	2	0,244498729705811		
GCCCGTCATT	0	2	0,244498729705811		
CAGCCTGGGG	0	2	0,244498729705811		
GCGACGCGGG	0	2	0,244498729705811		
TATGTTTCAG	0	2	0,244498729705811		
TCCCTGGGCA	0	2	0,244498729705811		
GCGGGGCGAG	0	2	0,244498729705811		
TCCCTGGCAT	0	2	0,244498729705811		
TTTGGGGCTG	0	2	0,244498729705811		
GCCTTGATCT	0	2	0,244498729705811		
GCCTGTGCCT	0	2	0,244498729705811		
CACGCAGCCA	0	2	0,244498729705811		
TAGTTTGTGG	0	2	0,244498729705811		
TATCACTCTG	0	2	0,244498729705811		
CAGAGGAACG	0	2	0,244498729705811		
GCTTGTTCTC	0	2	0,244498729705811		
GCTGAGGGCT	0	2	0,244498729705811		
AAGATCCCCG	0	2	0,244498729705811		
GCTGCAGCAC	0	2	0,244498729705811		
ATCCGGCGCC	0	2	0,244498729705811		
AAGATGCACA	0	2	0,244498729705811		
AAGCCAGGC	0	2	0,244498729705811		
GTGGTGAATG	0	2	0,244498729705811		
GCAGCTGACG	0	2	0,244498729705811		
AAGAAGATAG	0	2	0,244498729705811		
AAGGAACCTG	0	2	0,244498729705811		
TTGCTAGAGG	0	2	0,244498729705811		
TGAGGTTCCC	0	2	0,244498729705811		
TTGGGCGAAT	0	2	0,244498729705811		
GCTTAATGTG	0	2	0,244498729705811		
GCAGAAAGTT	0	2	0,244498729705811		
GCTTTATTTG	0	2	0,244498729705811		
GTGGCGGTTG	0	2	0,244498729705811		

TTGCACGAGG	0	2	0,244498729705811		
TGCAATAGGT	0	2	0,244498729705811		
TTGAGAACTG	0	2	0,244498729705811		
CTGAAAGGCT	0	2	0,244498729705811		
GGAAGAGAAG	0	2	0,244498729705811		
TGCACCTTGG	0	2	0,244498729705811		
GATTTTGTAG	0	2	0,244498729705811		
GATTGGGGAT	0	2	0,244498729705811		
TGCACTACCC	0	2	0,244498729705811		
TTGAACTGGC	0	2	0,244498729705811		
CCCAATAAAC	0	2	0,244498729705811		
ATGATGAGGC	0	2	0,244498729705811		
GCTGAAGGCA	0	2	0,244498729705811		
TGAAATCTTC	0	2	0,244498729705811		
ATCGTGCGCT	0	2	0,244498729705811		
ATGAACCGCA	0	2	0,244498729705811		
ATGAGGCAGC	0	2	0,244498729705811		
TTGGTGAGGG	0	2	0,244498729705811		
TTGTAAAAGG	0	2	0,244498729705811		
AAGATAATGC	0	2	0,244498729705811		
TGAAGGCAGT	0	2	0,244498729705811		
TGAAGTAACA	0	2	0,244498729705811		
CCACGTTCCA	0	2	0,244498729705811		
TCTGTTACAC	0	2	0,244498729705811		
GCTCCCAGAC	11	7	0,246305465698242		
TGGCTGTGTG	2	5	0,255754470825195		
AGTGCAAGAC	2	5	0,255754470825195		
CTGCACTTAC	2	5	0,255754470825195		
ACTGCTTGCC	2	5	0,255754470825195		
GTGTTAACCA	2	5	0,255754470825195		
GTGTGGTGGT	2	5	0,255754470825195		
CCACTACACT	2	5	0,255754470825195		
ATCAAGGGTG	2	5	0,255754470825195		
TTACCTCCTT	2	5	0,255754470825195		
CCCATCCGAA	2	5	0,255754470825195		
TGAACCCAGG	2	5	0,255754470825195		
TACCCTAAAA	2	5	0,255754470825195		
ATCGTGGCGG	2	5	0,255754470825195		
TAACTTGTGA	2	5	0,255754470825195		
AGCCACTGTG	2	5	0,255754470825195		
GGTGACAGAG	6	3	0,258397936820984		
AATATGTGGG	7	4	0,263157844543457		
CAGGAACGGG	7	4	0,263157844543457		
TCCTGCTGCC	7	4	0,263157844543457		
TTGGCCAGGA	7	4	0,263157844543457		
GGGCGCTGTG	7	4	0,263157844543457		

GAGGGCCGGT	6	9	0,265251994132996		
CTCAACATCT	3	6	0,265957474708557		
GCTCCGAGCG	3	6	0,265957474708557		
GGGGGACGGC	3	6	0,265957474708557		
TAGGACAAC	3	6	0,265957474708557		
CACCTAATTG	15	19	0,270270228385925		
CTCCCCAAA	8	5	0,277777791023254		
CCTGTAGTCC	8	5	0,277777791023254		
ATTTGAGAAG	5	8	0,280112028121948		
CTGTTGGTGA	5	8	0,280112028121948		
GTTCGTGCCA	10	7	0,287356376647949		
GCAAAAAAA	5	2	0,289855122566223		
TGCCTGTAGT	5	2	0,289855122566223		
GGAGGGGGCT	5	2	0,289855122566223		
GGAAAACAGA	5	2	0,289855122566223		
GTGGACCCTG	5	2	0,289855122566223		
AGCCACTGCA	5	2	0,289855122566223		
CCACAGGAGA	5	2	0,289855122566223		
ACCCGCCGGG	5	2	0,289855122566223		
GCGGCCAGTA	5	2	0,289855122566223		
TTTAACGGCC	10	14	0,289855122566223		
CGGCCCAACG	5	2	0,289855122566223		
CAGCTTGACG	5	2	0,289855122566223		
CTGGCGCCGA	1	3	0,298507452011108		
TTCTGTGCTG	1	3	0,298507452011108		
GGAGCCAGCT	1	3	0,298507452011108		
GACGTGTGGG	1	3	0,298507452011108		
AATCTGCGCC	1	3	0,298507452011108		
GCAAAGATTG	1	3	0,298507452011108		
GCCTGTACAA	1	3	0,298507452011108		
GGATATGTGG	1	3	0,298507452011108		
CTGTTGGCAT	1	3	0,298507452011108		
GCCCACATCC	1	3	0,298507452011108		
GGCTTTACCC	1	3	0,298507452011108		
TTTCAGGGGA	1	3	0,298507452011108		
GAGGACCCAA	1	3	0,298507452011108		
GCTGTGCCTG	1	3	0,298507452011108		
GCACCTAGTG	1	3	0,298507452011108		
TTGCGGAGCC	1	3	0,298507452011108		
TTTGCCTCAG	1	3	0,298507452011108		
GAGATCCGCA	1	3	0,298507452011108		
GAAATACAGT	1	3	0,298507452011108		
CGCCACCACG	1	3	0,298507452011108		
GTGAAACCCG	1	3	0,298507452011108		
CCTTCTGGTG	1	3	0,298507452011108		
TGCTTCATCT	1	3	0,298507452011108		

TCCTGCCCCA	1	3	0,298507452011108		
GGGTCTGCGG	1	3	0,298507452011108		
TCTGTACACC	1	3	0,298507452011108		
CCACACCGGT	1	3	0,298507452011108		
TAGCCGCTGA	1	3	0,298507452011108		
CGACCCACG	1	3	0,298507452011108		
AGAATCACTT	1	3	0,298507452011108		
TGGAActGTA	1	3	0,298507452011108		
GTCTGAGCTC	1	3	0,298507452011108		
CTCTGTAAGT	1	3	0,298507452011108		
GTAGGGGTAA	1	3	0,298507452011108		
CATATCATT	1	3	0,298507452011108		
CAGGGGAGTG	1	3	0,298507452011108		
CTAGCAGAGC	1	3	0,298507452011108		
GTAACCC	1	3	0,298507452011108		
AGACCCACAA	1	3	0,298507452011108		
AGCCACCGTG	1	3	0,298507452011108		
ATGTGATTGT	1	3	0,298507452011108		
TCCGTGGTTG	1	3	0,298507452011108		
GGGGCGGGGT	1	3	0,298507452011108		
AGTTTCTTGT	1	3	0,298507452011108		
CCCATCGCCC	1	3	0,298507452011108		
GTGGCGCACA	1	3	0,298507452011108		
GTGGCCAGAG	1	3	0,298507452011108		
TGATGTTCCA	1	3	0,298507452011108		
CCCTGGCAAT	1	3	0,298507452011108		
TGGGGATTAC	1	3	0,298507452011108		
ATGATGCGGT	1	3	0,298507452011108		
GTGGTGGCGG	1	3	0,298507452011108		
AGGCCAAGGG	1	3	0,298507452011108		
CCTCCCTGAT	1	3	0,298507452011108		
GTGGGTTGGC	1	3	0,298507452011108		
ATTGTTTATG	1	3	0,298507452011108		
GTGAGACCTC	1	3	0,298507452011108		
GCAAAACCC	11	8	0,305810451507568		
GTGGCGGGCA	9	13	0,313479661941528		
CGTGGGGTGG	9	13	0,313479661941528		
GCCAGGGCGG	4	7	0,318471312522888		
CCGTCCAAGG	4	7	0,318471312522888		
CAGGCCCCAC	4	7	0,318471312522888		
CGGTTACTGT	4	7	0,318471312522888		
TGGTGTGAG	13	10	0,323624610900879		
AGGTCCTAGC	13	10	0,323624610900879		
GAAACCGAGG	7	5	0,33003294467926		
GCGGAGGTGG	7	5	0,33003294467926		
CTCCTCACCT	19	16	0,33003294467926		

AGGAAAGCTG	45	41	0,332225918769836		
GTGAAACCCC	68	76	0,333333373069763		
AGGCTACGGA	73	68	0,341296911239624		
GCCAGCCAGT	6	4	0,353356838226318		
CCACCGCACT	6	4	0,353356838226318		
CCACTGTACT	6	4	0,353356838226318		
ACCTGTATCC	6	4	0,353356838226318		
GGCCACGTAG	3	1	0,355871915817261		
CGCCGACGAT	3	1	0,355871915817261		
GCCAGACCCC	3	1	0,355871915817261		
GCCATCCCCT	3	1	0,355871915817261		
GGCAGGCGGG	3	1	0,355871915817261		
CCACTCCTCA	3	1	0,355871915817261		
GGGCCTAAAC	3	1	0,355871915817261		
GAGTTGGCAG	3	1	0,355871915817261		
GGGCAGGGCA	3	1	0,355871915817261		
TGGCTTGCTC	3	1	0,355871915817261		
CTGCTGCACT	3	1	0,355871915817261		
TTGTGGTTAA	3	1	0,355871915817261		
GCGATGGCCG	3	1	0,355871915817261		
CCTGAATCTG	3	1	0,355871915817261		
GCGAGCAGCG	3	1	0,355871915817261		
CCCCACCTA	3	1	0,355871915817261		
GTGTTGGGGG	3	1	0,355871915817261		
TCTGTCAAGA	3	1	0,355871915817261		
TGGGCTGGGG	3	1	0,355871915817261		
GGGGACAGAG	3	1	0,355871915817261		
TGCAGATATT	3	1	0,355871915817261		
GCGGTGGGTT	3	1	0,355871915817261		
CTACCAGGCC	3	1	0,355871915817261		
GCTGCCTGCC	3	1	0,355871915817261		
TACCAGCACA	3	1	0,355871915817261		
AAGGGCAGTG	3	1	0,355871915817261		
TGGATCCTCG	3	1	0,355871915817261		
AGGGGGGAGG	3	1	0,355871915817261		
TCCCGTACAT	3	1	0,355871915817261		
GAGGATGGTG	3	1	0,355871915817261		
ACAACCTCAAT	3	1	0,355871915817261		
AGTCTGATGT	3	1	0,355871915817261		
ACATTTGCCA	3	1	0,355871915817261		
TGAGCAAGCC	3	1	0,355871915817261		
CTGGGATGTC	3	1	0,355871915817261		
GGCTGGTCTC	3	1	0,355871915817261		
GGGATCGCCC	3	1	0,355871915817261		
ACCTTGTGCC	3	1	0,355871915817261		
GGCTGCCTGC	3	1	0,355871915817261		

ACTGGGGAAT	3	1	0,355871915817261		
ATCGCTTTCT	3	1	0,355871915817261		
GGGGTGGGGC	3	1	0,355871915817261		
GCCCCCCGT	3	1	0,355871915817261		
CTGGGTAAAT	31	36	0,364963531494141		
GTGGTGGGTG	5	3	0,364963531494141		
GAGAAACCCC	5	3	0,364963531494141		
GTGCTGGAGA	5	3	0,364963531494141		
GCGGGGTACC	5	3	0,364963531494141		
GGTTCAAGGC	5	3	0,364963531494141		
GACGCGGCGC	5	3	0,364963531494141		
GCCTGCAGTC	5	3	0,364963531494141		
ATAATTCTTT	5	3	0,364963531494141		
GACATCAAGT	5	3	0,364963531494141		
GTGCTGAATG	20	23	0,367647051811218		
GCGCAGAGGT	16	20	0,369003653526306		
TCACCCACAC	4	6	0,377358436584473		
TAGTTGAAGT	4	6	0,377358436584473		
GGCTCCCACT	4	6	0,377358436584473		
TGTCATCACA	4	6	0,377358436584473		
TAGGGCAATC	4	6	0,377358436584473		
CCGCTGCACT	14	18	0,38167941570282		
GGCCCTGAGC	9	7	0,3861004114151		
CCAGAACAGA	28	25	0,3861004114151		
TTCACTGTGA	12	16	0,395256876945496		
TGTGATCAGA	6	8	0,396825432777405		
GTGGCAGGCA	6	8	0,396825432777405		
TTGCCAGGC	6	8	0,396825432777405		
GTCTGGGGCT	7	9	0,398406386375427		
GTGGCACGTG	7	9	0,398406386375427		
GCCAGCCCAG	7	9	0,398406386375427		
GCTTAACCTG	3	5	0,403225779533386		
GTGCCCTGTT	2	4	0,403225779533386		
AGGGGATTCC	2	4	0,403225779533386		
AAGGTGGAGG	18	21	0,403225779533386		
GTGGCACGCA	2	4	0,403225779533386		
GCAAGCCAAC	3	5	0,403225779533386		
CCGGAATGTG	2	4	0,403225779533386		
TGCAGCACGA	2	4	0,403225779533386		
ACTTGGAGCC	2	4	0,403225779533386		
GAGTCTGAGG	2	4	0,403225779533386		
CCCCTCCCTC	2	4	0,403225779533386		
GGAGGTGGGG	3	5	0,403225779533386		
GGAGCTCTGT	2	4	0,403225779533386		
GTGGCTCACA	2	4	0,403225779533386		
GCCGTGTCCG	17	20	0,403225779533386		

CTGTTAGTGT	2	4	0,403225779533386		
CCAAACGTGT	3	5	0,403225779533386		
TTAACCCCTC	2	4	0,403225779533386		
CCAACCGTGC	2	4	0,403225779533386		
GACATATGTA	2	4	0,403225779533386		
GACCGCAGGA	2	4	0,403225779533386		
CCACTGCACC	2	4	0,403225779533386		
TGCTTTGGGA	3	5	0,403225779533386		
GGGCTGGGCC	2	4	0,403225779533386		
CTGTGCCCAG	2	4	0,403225779533386		
GCCCTCGGCC	3	5	0,403225779533386		
TTTGGGCCTA	2	4	0,403225779533386		
ATCGGGCCCG	2	4	0,403225779533386		
TTGGTGAAGG	17	20	0,403225779533386		
GGCAACAGAG	4	2	0,409836053848267		
GCCCCACAGC	4	2	0,409836053848267		
TGTGGCCTCC	4	2	0,409836053848267		
CAATAAACTG	4	2	0,409836053848267		
GGAAGGGGGA	4	2	0,409836053848267		
CCGTGCTCAT	4	2	0,409836053848267		
AATGCAGGCA	4	2	0,409836053848267		
GTTTGGCAGT	4	2	0,409836053848267		
CCTGTACCCC	4	2	0,409836053848267		
GCAGTGC ACT	4	2	0,409836053848267		
CCACTGCATT	4	2	0,409836053848267		
GACAGCTGAG	4	2	0,409836053848267		
TGTGTGCCAC	4	2	0,409836053848267		
GCGACGAGGC	24	22	0,413223147392273		
CCATTGCACT	26	25	0,414937734603882		
GCCTGCTGGG	18	16	0,421940922737122		
CCTAGCTGGA	37	38	0,423728823661804		
CCTGTAATCC	29	27	0,427350401878357		
GCCCCCACT	3	2	0,429184556007385		
TCAGACGCAG	5	7	0,429184556007385		
GCGGACACTC	3	2	0,429184556007385		
TTGGCAGCCC	5	7	0,429184556007385		
TCACAAGCAA	3	2	0,429184556007385		
TTGGAGATCT	5	7	0,429184556007385		
GCGGCGGCTC	3	2	0,429184556007385		
TGATGGGCAT	3	2	0,429184556007385		
GCCTTCCAAT	5	7	0,429184556007385		
GCTTTCTCAC	3	2	0,429184556007385		
AAGGATGCGG	3	2	0,429184556007385		
GTTCCCTGGC	5	7	0,429184556007385		
TGAGGCCTCT	3	2	0,429184556007385		
TCTGGCAGTA	3	2	0,429184556007385		

CCATTGCATT	3	2	0,429184556007385		
CAGCTTGCAA	3	2	0,429184556007385		
CCTGTCCTGC	3	2	0,429184556007385		
GAGCCTTGGT	3	2	0,429184556007385		
CTCAACAGCA	3	2	0,429184556007385		
GGGCAAGCCA	3	2	0,429184556007385		
TGCCTGCACC	3	2	0,429184556007385		
GGTAGCCTGG	3	2	0,429184556007385		
ACCGCCGTGG	3	2	0,429184556007385		
GTGAAACCTC	3	2	0,429184556007385		
GGCCCACTAG	3	2	0,429184556007385		
GGTGTGGAAG	3	2	0,429184556007385		
GGAGGGCTGG	3	2	0,429184556007385		
TGTAGTTTGA	3	2	0,429184556007385		
CTGGGCGTGT	3	2	0,429184556007385		
TGGCTAGTGT	3	2	0,429184556007385		
GGAAATGTCA	3	2	0,429184556007385		
CCCGGGGCCT	3	2	0,429184556007385		
GAATGAGGAC	3	2	0,429184556007385		
GGCTGTACCC	3	2	0,429184556007385		
GGGGAAGGGC	3	2	0,429184556007385		
TGGGGGCCGA	3	2	0,429184556007385		
GGCTGAGAAT	3	2	0,429184556007385		
GATGACCCCC	5	7	0,429184556007385		
TGGTGCAGCA	3	2	0,429184556007385		
GGCCTGCTGC	3	2	0,429184556007385		
TGGGTGAGCC	5	7	0,429184556007385		
GGGGGAGAAG	3	2	0,429184556007385		
GTGCGCTGAG	12	15	0,431034445762634		
TGTGTTGAGA	16	19	0,438596487045288		
GCCCGCCTTG	6	5	0,446428537368774		
GGGGGTCACC	6	5	0,446428537368774		
TCGAAGCCCC	6	5	0,446428537368774		
GGTGGCACTC	9	8	0,456621050834656		
CCAGGGGAGA	9	8	0,456621050834656		
GCGACAGCTC	9	8	0,456621050834656		
TGGGGAGAGG	9	8	0,456621050834656		
CGCCGCGGTG	13	12	0,462962985038757		
GCGAAACCTT	12	13	0,467289686203003		
AGCCACTGCG	2	1	0,47169816493988		
CAGGCTGCTG	2	1	0,47169816493988		
AGCCCTCCCT	2	1	0,47169816493988		
GAAAAGCCTT	2	1	0,47169816493988		
CGCTTTTGTA	2	1	0,47169816493988		
CAGTCAGGCT	2	1	0,47169816493988		
ATGGGCTTGA	2	1	0,47169816493988		

GCCCAGTGGC	2	1	0,47169816493988		
CAGGCCTGGC	2	1	0,47169816493988		
CTGCTAAGGT	2	1	0,47169816493988		
CTGGGACTGA	2	1	0,47169816493988		
CACACACACA	2	1	0,47169816493988		
CACCGGACAC	2	1	0,47169816493988		
CACCTGTGGT	2	1	0,47169816493988		
AAAGCAAACC	2	1	0,47169816493988		
CTGGGCCAGC	2	1	0,47169816493988		
CACTCCCCAC	2	1	0,47169816493988		
ACTGGGTCTA	2	1	0,47169816493988		
GCCGCCGCCG	2	1	0,47169816493988		
CTGAGGGTGG	2	1	0,47169816493988		
ACTGAGGTGC	2	1	0,47169816493988		
CTCAGCAGAT	2	1	0,47169816493988		
CTGTGAGACC	2	1	0,47169816493988		
CAGCCCAACC	2	1	0,47169816493988		
CAGCGCCACC	2	1	0,47169816493988		
GACCAGGGGC	2	1	0,47169816493988		
AGACAATGTG	2	1	0,47169816493988		
CAGCTTCACC	2	1	0,47169816493988		
CTTCTGGGGA	2	1	0,47169816493988		
AGACCAAAGT	2	1	0,47169816493988		
CTTTCCCCTT	2	1	0,47169816493988		
CTGCTGCTGG	2	1	0,47169816493988		
AATACCTCGT	2	1	0,47169816493988		
CCACAACCTG	2	1	0,47169816493988		
AAGCTACGGA	2	1	0,47169816493988		
CCGCTGTACT	2	1	0,47169816493988		
GCAGCCTGGA	2	1	0,47169816493988		
GAGTCAGGAG	2	1	0,47169816493988		
CCAGTGCACT	2	1	0,47169816493988		
ATCCACATCG	2	1	0,47169816493988		
CCAGTGCGCT	2	1	0,47169816493988		
GCACCTCCTA	2	1	0,47169816493988		
AGGTGGAGGT	2	1	0,47169816493988		
ATCAAGAATC	2	1	0,47169816493988		
CCAGCCTGGG	2	1	0,47169816493988		
AAGGAGTTTG	2	1	0,47169816493988		
GAGGGGATGT	2	1	0,47169816493988		
AAGTTTCAA	2	1	0,47169816493988		
AAGTTGAGAC	2	1	0,47169816493988		
GCAAGGTTGC	2	1	0,47169816493988		
GCAAGGTCAG	2	1	0,47169816493988		
CCCCTGCCC	2	1	0,47169816493988		
CCCAGCCACA	2	1	0,47169816493988		

AAGTTCTGCG	2	1	0,47169816493988		
AGTAGCCGTG	2	1	0,47169816493988		
CCCCCTCCGG	2	1	0,47169816493988		
GCAAAATCCC	2	1	0,47169816493988		
CCCCCGAAGC	2	1	0,47169816493988		
CCGCCTCCGG	2	1	0,47169816493988		
CCACTGAACT	2	1	0,47169816493988		
CGACCGCCGG	2	1	0,47169816493988		
ACAGCAGTCA	2	1	0,47169816493988		
AGGTGGACAG	2	1	0,47169816493988		
CGACCCTCTC	2	1	0,47169816493988		
CCTTGACCAA	2	1	0,47169816493988		
GACTTGGCCC	2	1	0,47169816493988		
ACACACAGCA	2	1	0,47169816493988		
CCACCACGCC	2	1	0,47169816493988		
GAGAAGGCTG	2	1	0,47169816493988		
AAGAATCTGA	2	1	0,47169816493988		
CCTCGCTCAG	2	1	0,47169816493988		
AAGCGCTCTC	2	1	0,47169816493988		
GCCAAGTGAA	2	1	0,47169816493988		
GAAGGCATCC	2	1	0,47169816493988		
AGGAGCTGCT	2	1	0,47169816493988		
GAGCCGCCTC	2	1	0,47169816493988		
GCATCCGGGG	2	1	0,47169816493988		
CCACTGCCAC	2	1	0,47169816493988		
ACAAGGTGCG	2	1	0,47169816493988		
GAGCGGCCTC	2	1	0,47169816493988		
GAGCTGCATC	2	1	0,47169816493988		
GAGCTGTTGG	2	1	0,47169816493988		
AGGGCCCTCA	2	1	0,47169816493988		
ACAAAGCCCC	2	1	0,47169816493988		
CCGGCGCGTG	2	1	0,47169816493988		
GAGCCAACCC	2	1	0,47169816493988		
TTGGCTAGGC	2	1	0,47169816493988		
GGCAAAGAGG	2	1	0,47169816493988		
GCTGGCAGGC	2	1	0,47169816493988		
GCTGCTGGTG	2	1	0,47169816493988		
TGGACACAAG	2	1	0,47169816493988		
TGTTCCACTC	2	1	0,47169816493988		
TGCCCTCAAA	2	1	0,47169816493988		
TGTGGTGGTG	2	1	0,47169816493988		
GGGGCCCCCT	2	1	0,47169816493988		
GCGCTGTCAG	2	1	0,47169816493988		
TTGGCAGGCC	2	1	0,47169816493988		
TTAAGAGGGA	2	1	0,47169816493988		
GGGGCAGCCG	2	1	0,47169816493988		

GTACTCCAGC	2	1	0,47169816493988		
GCTATCACAT	2	1	0,47169816493988		
TAATCCCAGC	2	1	0,47169816493988		
GTGAAACCTG	2	1	0,47169816493988		
GCGGTGAGGT	2	1	0,47169816493988		
TGCACATTGT	2	1	0,47169816493988		
TTGTGGGTGC	2	1	0,47169816493988		
GCTCTGTAAG	2	1	0,47169816493988		
GGAAAAAAAA	2	1	0,47169816493988		
GTGGCGTGCG	2	1	0,47169816493988		
GGTGATGAGG	2	1	0,47169816493988		
TGCCTGTAAT	2	1	0,47169816493988		
TCACCGGTCA	2	1	0,47169816493988		
GTGATGGGGC	2	1	0,47169816493988		
GTTGTGATGT	2	1	0,47169816493988		
GTTTAAATCG	2	1	0,47169816493988		
GGAGACAGAG	2	1	0,47169816493988		
TTAAACCTCA	2	1	0,47169816493988		
GGTGGCCCGG	2	1	0,47169816493988		
GTGGTGTACG	2	1	0,47169816493988		
TTCTGGCTGC	2	1	0,47169816493988		
GCTTGGTACT	2	1	0,47169816493988		
GCTTGGATCT	2	1	0,47169816493988		
TGCTGTGCAT	2	1	0,47169816493988		
GCTGTCATCA	2	1	0,47169816493988		
GGAGGTGGGA	2	1	0,47169816493988		
GTGACGTGCA	2	1	0,47169816493988		
GGAGTCATTG	2	1	0,47169816493988		
GCTCTGAGCA	2	1	0,47169816493988		
TCTGACCACC	2	1	0,47169816493988		
TACGGGGATC	2	1	0,47169816493988		
GTCACTGCCT	2	1	0,47169816493988		
TGACCTCCAG	2	1	0,47169816493988		
GCCTTAACAA	2	1	0,47169816493988		
GTGGCGCGCC	2	1	0,47169816493988		
GTGGCGCACG	2	1	0,47169816493988		
TGGCCAGCTC	2	1	0,47169816493988		
TGGCACTTCA	2	1	0,47169816493988		
TACTGCTCGG	2	1	0,47169816493988		
GTGGCGCGTG	2	1	0,47169816493988		
GCGATTCCGG	2	1	0,47169816493988		
TAGTCATCAA	2	1	0,47169816493988		
TGAGGACACA	2	1	0,47169816493988		
GGCTGCCCTG	2	1	0,47169816493988		
TGGCCCCCGC	2	1	0,47169816493988		
TAGGATGGGG	2	1	0,47169816493988		

GGCTGGTCTG	2	1	0,47169816493988		
GGGAAACCTT	2	1	0,47169816493988		
TGGCCTCACC	2	1	0,47169816493988		
GTCTCCGGGA	2	1	0,47169816493988		
GTGGCGGGTA	2	1	0,47169816493988		
GTGGCGGACA	2	1	0,47169816493988		
GGCCGCGTTC	2	1	0,47169816493988		
AAGGGAGCAC	16	17	0,476190447807312		
GGGCCAATAA	1	2	0,478468894958496		
AGCTGAGCTA	1	2	0,478468894958496		
ACAGTCTTGC	1	2	0,478468894958496		
ACCACAGGGG	1	2	0,478468894958496		
GGAGGGGAGG	1	2	0,478468894958496		
CTGCTAGGAA	1	2	0,478468894958496		
CTGCTGAGCC	1	2	0,478468894958496		
GGCTGGGCCT	1	2	0,478468894958496		
ACCATTGGAT	1	2	0,478468894958496		
GGATGTGAAA	1	2	0,478468894958496		
AGAACAAAAC	1	2	0,478468894958496		
TGGCAGTCTG	1	2	0,478468894958496		
TCAGCTGGCC	1	2	0,478468894958496		
GATGGGGCTG	1	2	0,478468894958496		
TGGCCCTCCA	1	2	0,478468894958496		
GATGCGCTTG	1	2	0,478468894958496		
GTGCCATATT	1	2	0,478468894958496		
GTGCCTAGGA	1	2	0,478468894958496		
AGAGCATATC	1	2	0,478468894958496		
CTTCCAGCTA	1	2	0,478468894958496		
GGGCCAACCC	1	2	0,478468894958496		
TCTGCAATGA	1	2	0,478468894958496		
GTGTGTCTCG	1	2	0,478468894958496		
AGGACACCGC	1	2	0,478468894958496		
TGCTGCCTCA	1	2	0,478468894958496		
TAGCTCCCTT	1	2	0,478468894958496		
CTGATGGCAG	1	2	0,478468894958496		
GTGCTGGTCA	1	2	0,478468894958496		
GGGTGGGTAG	1	2	0,478468894958496		
GATAGTTGTG	1	2	0,478468894958496		
CTTAATCCTG	1	2	0,478468894958496		
CTGGTCTCTC	1	2	0,478468894958496		
GAGAGCTCCC	1	2	0,478468894958496		
GGGGAGGGGG	1	2	0,478468894958496		
GGCCAGGAAG	1	2	0,478468894958496		
TCCTCCAAGG	1	2	0,478468894958496		
GTGGGCACAG	1	2	0,478468894958496		
TGGATCCTAG	1	2	0,478468894958496		

GGCCAGGTGG	1	2	0,478468894958496		
GTGGCACACA	1	2	0,478468894958496		
GTGGCGGGAG	1	2	0,478468894958496		
GTGGATGGAC	1	2	0,478468894958496		
CCCTCCTGGG	1	2	0,478468894958496		
CCGGACCTGT	1	2	0,478468894958496		
GTGGCGGGGT	1	2	0,478468894958496		
AGCAGTCCAA	1	2	0,478468894958496		
GGCCCCATTG	1	2	0,478468894958496		
ACTGATCTGC	1	2	0,478468894958496		
GACTGAGCTT	1	2	0,478468894958496		
CTGTCAGCGG	1	2	0,478468894958496		
ACTGCTCATT	1	2	0,478468894958496		
TCCTATTAAG	1	2	0,478468894958496		
GACTCACTTT	1	2	0,478468894958496		
GGCCCACACC	1	2	0,478468894958496		
GGCACAGTAA	1	2	0,478468894958496		
TCCCCGTAAT	1	2	0,478468894958496		
ACGACAAAGC	1	2	0,478468894958496		
CCCCCAGATG	1	2	0,478468894958496		
ACTGGCTGCT	1	2	0,478468894958496		
GGCTCCTGGC	1	2	0,478468894958496		
GGGGGTGGGT	1	2	0,478468894958496		
GGCAAGGGGG	1	2	0,478468894958496		
ACTTTTTCAC	1	2	0,478468894958496		
ATTGTGCCAC	1	2	0,478468894958496		
ACTTTGAATG	1	2	0,478468894958496		
GACACCTCCT	1	2	0,478468894958496		
ATGGCACCCAC	1	2	0,478468894958496		
GTGGTATGGC	1	2	0,478468894958496		
GTGGCAGGAG	1	2	0,478468894958496		
GGCAGACAAT	1	2	0,478468894958496		
GGCAGCACAA	1	2	0,478468894958496		
GCCCAGGGCC	1	2	0,478468894958496		
TCCCTGGCTG	1	2	0,478468894958496		
GTGGCGGACG	1	2	0,478468894958496		
CCAGTGGCCC	1	2	0,478468894958496		
AGCCCCGGAG	1	2	0,478468894958496		
GGCAACATAG	1	2	0,478468894958496		
GTGGTGCACA	1	2	0,478468894958496		
ATGGCAAGGG	1	2	0,478468894958496		
GTCTTAACTC	1	2	0,478468894958496		
AACTCTCAAT	1	2	0,478468894958496		
GCCATCGTCC	1	2	0,478468894958496		
AAGAAAGTTC	1	2	0,478468894958496		
GCCAGGAGCT	1	2	0,478468894958496		

ATCTCAGCTC	1	2	0,478468894958496		
CGGAGCCGGC	1	2	0,478468894958496		
AAGAGCCAAG	1	2	0,478468894958496		
AGTAGGTGGC	1	2	0,478468894958496		
TATAGCTGAG	1	2	0,478468894958496		
GTACACACAC	1	2	0,478468894958496		
GCCACACCCC	1	2	0,478468894958496		
GTAGTCCAAA	1	2	0,478468894958496		
AAGCACTGTT	1	2	0,478468894958496		
GTGAAACTGT	1	2	0,478468894958496		
GTGAAGCCCC	1	2	0,478468894958496		
TGCAGATCAG	1	2	0,478468894958496		
CCTCCCCCAA	1	2	0,478468894958496		
TAACCTGCTA	1	2	0,478468894958496		
GCTGAACGCG	1	2	0,478468894958496		
GCAGTTGGAT	1	2	0,478468894958496		
GCTGACAACT	1	2	0,478468894958496		
GCTGATTGGC	1	2	0,478468894958496		
CCTCCACCTA	1	2	0,478468894958496		
TTCACAGTGG	1	2	0,478468894958496		
TGATGTGATC	1	2	0,478468894958496		
AAAAAACCCA	1	2	0,478468894958496		
CAGCCTTGGA	1	2	0,478468894958496		
GTCCAACAAC	1	2	0,478468894958496		
GCCTCCAGCT	1	2	0,478468894958496		
CCTTCGAGAT	1	2	0,478468894958496		
AAACCCAAGC	1	2	0,478468894958496		
GTCTACTCCT	1	2	0,478468894958496		
TGATGCCTCC	1	2	0,478468894958496		
CCTTTGCCCT	1	2	0,478468894958496		
TGATGCGCGC	1	2	0,478468894958496		
GTCACTCTCC	1	2	0,478468894958496		
AGTGACAGAG	1	2	0,478468894958496		
CAGCACAGAC	1	2	0,478468894958496		
CAGGGGTGAC	1	2	0,478468894958496		
GCGACGGCCG	1	2	0,478468894958496		
CGATGGTCCC	1	2	0,478468894958496		
CAGGCGTGCA	1	2	0,478468894958496		
TGACACAGCC	1	2	0,478468894958496		
CACTGCATAT	1	2	0,478468894958496		
AGTGCGTGGC	1	2	0,478468894958496		
TGAAGTTATA	1	2	0,478468894958496		
AGTGAGGGGA	1	2	0,478468894958496		
TTGTTCTGCT	1	2	0,478468894958496		
TACAAGAGGA	1	2	0,478468894958496		
TTGGCTCCGC	1	2	0,478468894958496		

TGATGTCCAC	1	2	0,478468894958496		
TTGAGGGGGT	1	2	0,478468894958496		
CCAATGCACT	1	2	0,478468894958496		
TAAATTGCAA	1	2	0,478468894958496		
GCAACGGGCC	1	2	0,478468894958496		
GTTTGCCTGA	1	2	0,478468894958496		
ATGATGATGA	1	2	0,478468894958496		
CCAAGGAATG	1	2	0,478468894958496		
GCTGGGTCCA	1	2	0,478468894958496		
GCTGGGAGGG	1	2	0,478468894958496		
GGTTGAGTGT	1	2	0,478468894958496		
GCAGACCCAC	1	2	0,478468894958496		
GTGAGACTCC	1	2	0,478468894958496		
TTGACTTTT	1	2	0,478468894958496		
GCACAGAGCT	1	2	0,478468894958496		
TTGAGCCAGC	1	2	0,478468894958496		
TCTGCCTGGG	1	2	0,478468894958496		
CACACCAGTT	1	2	0,478468894958496		
GGAAGGGGAG	1	2	0,478468894958496		
GCAAAACCAG	1	2	0,478468894958496		
GTAAGTGTAC	1	2	0,478468894958496		
GCTGGCCTTG	1	2	0,478468894958496		
CGTGGGTGGG	1	2	0,478468894958496		
ACAAACTGTG	1	2	0,478468894958496		
GGAAACTGAT	1	2	0,478468894958496		
TCTTAATGAA	1	2	0,478468894958496		
AAGGTAACAG	1	2	0,478468894958496		
CCACCACACC	1	2	0,478468894958496		
GCTGTTGCAT	1	2	0,478468894958496		
GGTGGTACAC	1	2	0,478468894958496		
TTTACAGCTG	4	3	0,487804889678955		
CCACTGCTCT	4	3	0,487804889678955		
GCGAGACCCC	4	3	0,487804889678955		
CTGTACAGAC	10	12	0,487804889678955		
GCACTCCAGC	4	3	0,487804889678955		
GGGAGCCCCT	4	3	0,487804889678955		
ACCTCAGGAA	4	3	0,487804889678955		
CTGGGCCTGG	4	3	0,487804889678955		
ACAGTGCTTG	4	3	0,487804889678955		
TGGAGGCCAG	4	3	0,487804889678955		
GGCCAGCCCT	4	3	0,487804889678955		
TGGGGCCGCA	4	3	0,487804889678955		
GGTGGATGTG	4	3	0,487804889678955		
GTGGTGGGCA	7	6	0,492610812187195		
GGTCCAGTGT	7	6	0,492610812187195		
GGGCCAGGA	9	10	0,492610812187195		

GACTCTGGTG	12	11	0,5		
CTGCTATACG	8	7	0,502512574195862		
ACTGGTACGT	8	7	0,502512574195862		
TGCACGTTTT	33	33	0,507614254951477		
TGGCCCCAGG	8	9	0,507614254951477		
CTCCCCTGCC	4	5	0,510204076766968		
GGAAGCAGA	4	5	0,510204076766968		
TACTCTTGGC	4	5	0,510204076766968		
GAGCGGGATG	4	5	0,510204076766968		
AGCAGGGCTC	4	5	0,510204076766968		
GCTGCGGCCG	4	5	0,510204076766968		
GCATAGGCTG	4	5	0,510204076766968		
CGCTGTGGGG	4	5	0,510204076766968		
TCAGATCTTT	15	16	0,512820482254028		
GAGGCCATCC	7	8	0,515463948249817		
GGTGAGACAC	7	8	0,515463948249817		
GTGAGACCCT	5	6	0,518134713172913		
TGGCCCCACC	5	6	0,518134713172913		
GAGAAACCCT	5	6	0,518134713172913		
GTGGCACACG	6	7	0,518134713172913		
GTGACCTCCT	6	7	0,518134713172913		
CTAAGACTTC	5	6	0,518134713172913		
GTGTGGGGGG	5	6	0,518134713172913		
GGGCCAGGGG	9	9	0,520833373069763		
AGGGCTTCCA	32	33	0,520833373069763		
AGCTCTCCCT	16	16	0,523560166358948		
GCCTCCTCCC	5	4	0,526315808296204		
GGGATCAAGG	5	4	0,526315808296204		
GACAGTGACG	5	4	0,526315808296204		
TCCGCGAGAA	5	4	0,526315808296204		
GTGGCGGGTG	5	4	0,526315808296204		
GCGAAACCCC	13	14	0,534759402275085		
CCTCCAGCTA	30	31	0,537634372711182		
CTGGCCTGTG	2	3	0,54347825050354		
CCCACGTGC	2	3	0,54347825050354		
TGGAAGGGCA	2	3	0,54347825050354		
TGAGCCTCGT	2	3	0,54347825050354		
AGCCCGGGAG	2	3	0,54347825050354		
TCTCCATACC	2	3	0,54347825050354		
GGGTCAAAAG	2	3	0,54347825050354		
GGGCCCAA	2	3	0,54347825050354		
CCCGGCTAAT	2	3	0,54347825050354		
CRACTGCACT	2	3	0,54347825050354		
GGGCCGTGGG	2	3	0,54347825050354		
TGATTTCACT	2	3	0,54347825050354		
CTCAGGAAAT	2	3	0,54347825050354		

CTCATAAGGA	2	3	0,54347825050354		
GTCACACCAC	2	3	0,54347825050354		
AGCTGATCAG	2	3	0,54347825050354		
GTGCTGGTGC	2	3	0,54347825050354		
TGGCAACCTT	2	3	0,54347825050354		
GCTGCACCGG	2	3	0,54347825050354		
GATCAGGCCA	2	3	0,54347825050354		
TTACGAGGAA	2	3	0,54347825050354		
ACACTGCACT	2	3	0,54347825050354		
CCACCCCGAA	2	3	0,54347825050354		
CAAGGGCTTG	2	3	0,54347825050354		
GCAAGACCCC	2	3	0,54347825050354		
GTGGTGCGCA	2	3	0,54347825050354		
GGCCAAAGGC	2	3	0,54347825050354		
CAGTTTGTAC	2	3	0,54347825050354		
TTGGACCTGG	2	3	0,54347825050354		
GCTCTGGCCG	2	3	0,54347825050354		
TGGTTTGAGC	2	3	0,54347825050354		
GACTTGGAGG	2	3	0,54347825050354		
CCCATCGCTC	2	3	0,54347825050354		
CAGCAGAAGC	2	3	0,54347825050354		
ATGGTGCCAC	2	3	0,54347825050354		
GGGAAACCCC	2	3	0,54347825050354		
GCCGTGAGCA	2	3	0,54347825050354		
TACCCACCCC	2	3	0,54347825050354		
TGGCGTGGCC	2	3	0,54347825050354		
GCCGGGTGGG	3	4	0,546448111534119		
GCTGGCTGGC	3	4	0,546448111534119		
CCTATTTACT	3	4	0,546448111534119		
GGGACTGAA	3	4	0,546448111534119		
GCTGGGACAG	3	4	0,546448111534119		
GTGTCCCTGT	3	4	0,546448111534119		
TTTGGTTTTC	3	4	0,546448111534119		
CTTGTGAACT	3	4	0,546448111534119		
ACAGCGGCAA	3	4	0,546448111534119		
CTGCCAACTT	3	4	0,546448111534119		
AATCCTGTGG	13	13	0,546448111534119		
TGGTGACAGT	3	4	0,546448111534119		
AGGCGAGATC	3	4	0,546448111534119		
GTGGCGTGTG	3	4	0,546448111534119		
GTATTGGCCT	3	4	0,546448111534119		
TGAGGCCAGG	3	4	0,546448111534119		
GAAGATGTGT	3	4	0,546448111534119		
AACTCTTGAA	3	4	0,546448111534119		
CCGTGGTCGT	5	5	0,571428537368774		
GTGGCAGGTG	8	8	0,591715931892395		

GTGGCGTGCA	3	3	0,595238089561462		
GCGGCTTTCC	3	3	0,595238089561462		
CGATTCTGGA	3	3	0,595238089561462		
CCTGTGATCC	3	3	0,595238089561462		
AACTAACAAA	3	3	0,595238089561462		
GCGGGAGGGC	3	3	0,595238089561462		
TCACTGCACT	3	3	0,595238089561462		
TGCTCCTACC	3	3	0,595238089561462		
GGAAGGGAGG	3	3	0,595238089561462		
AGGGCTGCAG	3	3	0,595238089561462		
AGGCTCCTGG	3	3	0,595238089561462		
GCCGCCCTGC	3	3	0,595238089561462		
CAATGTGTTA	3	3	0,595238089561462		
GTGACTGCCA	3	3	0,595238089561462		
TAAACTGTTT	3	3	0,595238089561462		
TGAAATAAAA	3	3	0,595238089561462		
ATGAAACCCT	3	3	0,595238089561462		
GCGCCAGTGC	3	3	0,595238089561462		
CGAGGGGCCA	3	3	0,595238089561462		
CCTATAATCC	3	3	0,595238089561462		
TCACAGCTGT	3	3	0,595238089561462		
GGGCAGCTGG	3	3	0,595238089561462		
GGGGGTGGAT	3	3	0,595238089561462		
GAGGAGGGTG	3	3	0,595238089561462		
GTGGTGGACA	3	3	0,595238089561462		
GGGGCAGGGC	3	3	0,595238089561462		
GGCTGATGTG	3	3	0,595238089561462		
GTGGCTCACG	3	3	0,595238089561462		
CCAGGGCAAC	3	3	0,595238089561462		
TTGTAATCGT	7	7	0,609756112098694		
GTGATGGTGT	7	7	0,609756112098694		
CCGGGTGATG	7	7	0,609756112098694		
GAGGTCCCTG	7	7	0,609756112098694		
TGGTACACGT	4	4	0,628930807113647		
TACAGAGGGA	4	4	0,628930807113647		
GGCAACGTGG	4	4	0,628930807113647		
GTGGGGGGAG	6	6	0,628930807113647		
GGCCATCTCT	4	4	0,628930807113647		
GCAGGCGGCT	4	4	0,628930807113647		
TGCTGGGTGG	4	4	0,628930807113647		
CGCCGGAACA	6	6	0,628930807113647		
TAGTGCCAG	1	1	0,680272102355957		
TGAATGGCCT	1	1	0,680272102355957		
TCCTCTTTCC	1	1	0,680272102355957		
TCCTCCCTAC	1	1	0,680272102355957		
ATGTGGCACA	1	1	0,680272102355957		

CACGCGCTGG	1	1	0,680272102355957		
CAGAACATCA	1	1	0,680272102355957		
TAGTTGCACA	1	1	0,680272102355957		
ATCTCTGCTC	1	1	0,680272102355957		
TAGTTGTGTG	1	1	0,680272102355957		
CACCTTCCAG	1	1	0,680272102355957		
ATCTGCAGGA	1	1	0,680272102355957		
TATGAAGAAC	1	1	0,680272102355957		
TATGATTACC	1	1	0,680272102355957		
TATGGCTACA	1	1	0,680272102355957		
AGCCTCGGCC	1	1	0,680272102355957		
ATGTTGCCCC	1	1	0,680272102355957		
ATGTCACGAC	1	1	0,680272102355957		
CAGCCTGTCTG	1	1	0,680272102355957		
ATCCCCCTGG	1	1	0,680272102355957		
ATGGTGCACA	1	1	0,680272102355957		
TAGCTGCTGG	1	1	0,680272102355957		
CAGCCTCCCT	1	1	0,680272102355957		
ATGGTGGGCA	1	1	0,680272102355957		
TCCTTCTCCT	1	1	0,680272102355957		
CAGCCGAGGC	1	1	0,680272102355957		
TAGCTTGAAC	1	1	0,680272102355957		
CAGCCAACCC	1	1	0,680272102355957		
ATGTA CTCTG	1	1	0,680272102355957		
ATCGGGACCG	1	1	0,680272102355957		
TGACTCTTGA	1	1	0,680272102355957		
CACTTGCACA	1	1	0,680272102355957		
ATGTCCACAA	1	1	0,680272102355957		
TAGGCTGTCT	1	1	0,680272102355957		
CAGACTATGT	1	1	0,680272102355957		
TCCTGCAGCT	1	1	0,680272102355957		
TGACTAGCAA	1	1	0,680272102355957		
CAGACCCAC	1	1	0,680272102355957		
TAGGGAGTTT	1	1	0,680272102355957		
ATGGTCTCCC	1	1	0,680272102355957		
TGAAAAAAAA	1	1	0,680272102355957		
TAGGTTGTTT	1	1	0,680272102355957		
CACCCCAAG	1	1	0,680272102355957		
TGACCACTGA	1	1	0,680272102355957		
TGAGAGGAGA	1	1	0,680272102355957		
CAAGGACCAG	1	1	0,680272102355957		
TCCCGGGTAC	1	1	0,680272102355957		
ATGGGAACCA	1	1	0,680272102355957		
TCCCATTAAG	1	1	0,680272102355957		
CAAGTTTGCT	1	1	0,680272102355957		
CAAGTGCAA	1	1	0,680272102355957		

ATGCGAAAGG	1	1	0,680272102355957		
ATGCTGAGGT	1	1	0,680272102355957		
TCTAGACCCT	1	1	0,680272102355957		
ATGGCACAAG	1	1	0,680272102355957		
CAAGGGCCAA	1	1	0,680272102355957		
ATTAAACCAG	1	1	0,680272102355957		
TCACTGTACT	1	1	0,680272102355957		
TCGTAACGAG	1	1	0,680272102355957		
TCCATCCCTT	1	1	0,680272102355957		
TCAGTGCGCA	1	1	0,680272102355957		
TCATCATCAG	1	1	0,680272102355957		
CAAATATCTT	1	1	0,680272102355957		
CAACACCTGA	1	1	0,680272102355957		
CAACTGCACT	1	1	0,680272102355957		
CAACTCCACT	1	1	0,680272102355957		
CAACTGTGT	1	1	0,680272102355957		
ATGGCGCCTC	1	1	0,680272102355957		
TCCACCTGTC	1	1	0,680272102355957		
CAAGGCTGAA	1	1	0,680272102355957		
CACCATAACA	1	1	0,680272102355957		
TGAAGAGAAG	1	1	0,680272102355957		
TATGTTGAAG	1	1	0,680272102355957		
TCTGGTTTGT	1	1	0,680272102355957		
ATTAAAGTGC	1	1	0,680272102355957		
CAACAGCCCT	1	1	0,680272102355957		
CACCCACTGC	1	1	0,680272102355957		
CACCCAATTG	1	1	0,680272102355957		
TATTCCCCAC	1	1	0,680272102355957		
ATGATCAGGC	1	1	0,680272102355957		
ATTACAGCCA	1	1	0,680272102355957		
TCACAAACTT	1	1	0,680272102355957		
TCGGTCAGGC	1	1	0,680272102355957		
TCGTCTTTAT	1	1	0,680272102355957		
TCCGCCGATG	1	1	0,680272102355957		
CACCACGGTG	1	1	0,680272102355957		
TCTTTTTCAA	1	1	0,680272102355957		
ATTGCGCCAC	1	1	0,680272102355957		
TATTGTATAT	1	1	0,680272102355957		
TCAAAAGACC	1	1	0,680272102355957		
TCAAGTTCAC	1	1	0,680272102355957		
TCAATATTCT	1	1	0,680272102355957		
CAATGTGCTG	1	1	0,680272102355957		
ATTGGACACA	1	1	0,680272102355957		
TCGACGAGGC	1	1	0,680272102355957		
TCCTAGCCTG	1	1	0,680272102355957		
ACAAAGTTGT	1	1	0,680272102355957		

TGTATAAGCA	1	1	0,680272102355957		
ACAGCCTGTA	1	1	0,680272102355957		
TTACCGTCCC	1	1	0,680272102355957		
T TACTGTGTA	1	1	0,680272102355957		
ACAGACTGTT	1	1	0,680272102355957		
TTATGGGATC	1	1	0,680272102355957		
TTATTTTGAA	1	1	0,680272102355957		
TTCAATAAAA	1	1	0,680272102355957		
ACACCCAGAA	1	1	0,680272102355957		
TTCACAAAGG	1	1	0,680272102355957		
TTCCACAGTG	1	1	0,680272102355957		
TTACCCCAAA	1	1	0,680272102355957		
TTCCTCGGGC	1	1	0,680272102355957		
ACAGGGGCCG	1	1	0,680272102355957		
TTCTATTTCA	1	1	0,680272102355957		
TTCTCAGGCC	1	1	0,680272102355957		
AATTAActCC	1	1	0,680272102355957		
AATGTGAGTC	1	1	0,680272102355957		
AATGGCACCA	1	1	0,680272102355957		
AATGCTGCTG	1	1	0,680272102355957		
TTCTCGGCTC	1	1	0,680272102355957		
TTCTCTACAA	1	1	0,680272102355957		
AATGAGCATA	1	1	0,680272102355957		
TTCTGGACCC	1	1	0,680272102355957		
AATCCCCGAG	1	1	0,680272102355957		
ACAActGCTG	1	1	0,680272102355957		
TGTTCTCCAT	1	1	0,680272102355957		
AGCGCAGGGA	1	1	0,680272102355957		
ACGATGGGCT	1	1	0,680272102355957		
ACGAATAGAG	1	1	0,680272102355957		
ACCTTTACTG	1	1	0,680272102355957		
TGTCCCAGCC	1	1	0,680272102355957		
TGTCCTGGTT	1	1	0,680272102355957		
TGTGGTGACC	1	1	0,680272102355957		
ACCTGCTATC	1	1	0,680272102355957		
ACCTGCCCT	1	1	0,680272102355957		
TGTGTGTTAG	1	1	0,680272102355957		
ACCGGTCCGG	1	1	0,680272102355957		
ACAGCGTCTG	1	1	0,680272102355957		
ACCGACCTCT	1	1	0,680272102355957		
TTCTGGGTAA	1	1	0,680272102355957		
ACCCTCAGTA	1	1	0,680272102355957		
TGTTGAAAAA	1	1	0,680272102355957		
ACCCCTTCC	1	1	0,680272102355957		
TTAAATGCTC	1	1	0,680272102355957		
TTAATAGTGG	1	1	0,680272102355957		

TTAATCGAAG	1	1	0,680272102355957		
TTACACCTGT	1	1	0,680272102355957		
ACATTCTCAT	1	1	0,680272102355957		
ACATCTGCCT	1	1	0,680272102355957		
ACATCGTAGG	1	1	0,680272102355957		
TTACATAAGA	1	1	0,680272102355957		
ACCGCCTGTG	1	1	0,680272102355957		
TTTGAACTGC	1	1	0,680272102355957		
AACCTGGGGA	1	1	0,680272102355957		
AACCTGGGAA	1	1	0,680272102355957		
AACCTGGCCT	1	1	0,680272102355957		
AACCGGGTTA	1	1	0,680272102355957		
AACCCTTGGG	1	1	0,680272102355957		
TTTATCCGCT	1	1	0,680272102355957		
TTTCAGAGAG	1	1	0,680272102355957		
TTTCCTTCCT	1	1	0,680272102355957		
AACCCCTGGA	1	1	0,680272102355957		
AACCCCTGAG	1	1	0,680272102355957		
AACCCAGGG	1	1	0,680272102355957		
AATCAAGCAA	1	1	0,680272102355957		
AACATACTGG	1	1	0,680272102355957		
AACTAATACT	1	1	0,680272102355957		
TTTGAGACCT	1	1	0,680272102355957		
TTTGCTGAAC	1	1	0,680272102355957		
AACAAGCAAA	1	1	0,680272102355957		
TTTGGA AAAA	1	1	0,680272102355957		
AAAGCGTAAA	1	1	0,680272102355957		
AAAGAAACAT	1	1	0,680272102355957		
AAACTCCAGC	1	1	0,680272102355957		
AAACATTGGG	1	1	0,680272102355957		
TTTTGTGTGA	1	1	0,680272102355957		
AAACAGAGCT	1	1	0,680272102355957		
AAAAGCAATG	1	1	0,680272102355957		
TTTCTGCACT	1	1	0,680272102355957		
AAGGAATCGG	1	1	0,680272102355957		
ACGCGAAGAC	1	1	0,680272102355957		
TTCTTGCTTA	1	1	0,680272102355957		
AATAAAGGCT	1	1	0,680272102355957		
TTCTTGTTTT	1	1	0,680272102355957		
TTGAAAGCTC	1	1	0,680272102355957		
AAGTTGCTGG	1	1	0,680272102355957		
TTGACCAGGC	1	1	0,680272102355957		
AAGTGAAACA	1	1	0,680272102355957		
TTGAGTAGGA	1	1	0,680272102355957		
AAGGCCTCGG	1	1	0,680272102355957		
AAGGCCATCT	1	1	0,680272102355957		

AACGCGAACA	1	1	0,680272102355957		
TTGCTGTGTG	1	1	0,680272102355957		
AACTAAAAAA	1	1	0,680272102355957		
AAGGAAGATC	1	1	0,680272102355957		
TTGGCAACAT	1	1	0,680272102355957		
TTGGCCAGAA	1	1	0,680272102355957		
TTGGGAGCAG	1	1	0,680272102355957		
AAGATAGGTT	1	1	0,680272102355957		
TTGGTGCTTG	1	1	0,680272102355957		
AAGAGTTACG	1	1	0,680272102355957		
TTGGTGGGCG	1	1	0,680272102355957		
TTGGTTTGCT	1	1	0,680272102355957		
TTGTAGCAGT	1	1	0,680272102355957		
AACTGGCGGT	1	1	0,680272102355957		
AATCAAGATA	1	1	0,680272102355957		
TTGCCCCCGT	1	1	0,680272102355957		
AGGCTACGGC	1	1	0,680272102355957		
TGTCCACACA	1	1	0,680272102355957		
TGCCCTAGAA	1	1	0,680272102355957		
AGGGGCTGCA	1	1	0,680272102355957		
TGCCCTCAGA	1	1	0,680272102355957		
TGCCGCCAGG	1	1	0,680272102355957		
TGCCGTTTTG	1	1	0,680272102355957		
AGGGCCACCT	1	1	0,680272102355957		
AGGGATGGCC	1	1	0,680272102355957		
AGGGAAGCTG	1	1	0,680272102355957		
TGCCTAGACC	1	1	0,680272102355957		
TGCCTGCTCC	1	1	0,680272102355957		
TGCCCCCAAT	1	1	0,680272102355957		
AGGCTCTGCA	1	1	0,680272102355957		
TGCCCAGCAA	1	1	0,680272102355957		
TGCGTCACCG	1	1	0,680272102355957		
AGGCCCTGCT	1	1	0,680272102355957		
TGCGTCCCTC	1	1	0,680272102355957		
AGGATGTGGG	1	1	0,680272102355957		
AGGATGGTCC	1	1	0,680272102355957		
AGGATGGCGG	1	1	0,680272102355957		
AGGAGGGTGG	1	1	0,680272102355957		
TGCGTGTGTC	1	1	0,680272102355957		
TGCTAATTAT	1	1	0,680272102355957		
AGGAGCCCTTA	1	1	0,680272102355957		
AGGAGCCGGG	1	1	0,680272102355957		
AGGCTGCCCA	1	1	0,680272102355957		
AGTGATGGTT	1	1	0,680272102355957		
TGAGGGGGCA	1	1	0,680272102355957		
TGAGTCTGGC	1	1	0,680272102355957		

TGATAATTCA	1	1	0,680272102355957		
ATCACACCAG	1	1	0,680272102355957		
ATAGGAGCTG	1	1	0,680272102355957		
ATAGATGGGG	1	1	0,680272102355957		
TGATGTTTGC	1	1	0,680272102355957		
AGTTTGAGGC	1	1	0,680272102355957		
TGCAAGCAGC	1	1	0,680272102355957		
AGTTCCACCA	1	1	0,680272102355957		
AGTGCCTTG	1	1	0,680272102355957		
AGGTCCACCA	1	1	0,680272102355957		
AGTGCAGGGC	1	1	0,680272102355957		
AGGAACTGTA	1	1	0,680272102355957		
TGCACAACGA	1	1	0,680272102355957		
AGTCAGCTGG	1	1	0,680272102355957		
AGTCACCGTC	1	1	0,680272102355957		
AGTCACCACG	1	1	0,680272102355957		
AGTAGCTTGA	1	1	0,680272102355957		
TGCACTTGAG	1	1	0,680272102355957		
TGCAGAGACA	1	1	0,680272102355957		
AGGTGGGGGT	1	1	0,680272102355957		
TGCCAATTAA	1	1	0,680272102355957		
TGCCACAGAC	1	1	0,680272102355957		
TGCCATCTGT	1	1	0,680272102355957		
AGTGGTGGCT	1	1	0,680272102355957		
TGGTGTATGC	1	1	0,680272102355957		
TGGGCTGGAA	1	1	0,680272102355957		
AGAATAGGAG	1	1	0,680272102355957		
TGGGGAGCTC	1	1	0,680272102355957		
TGGGGCTGGC	1	1	0,680272102355957		
AGAAATGTAT	1	1	0,680272102355957		
TGGGGTTGCT	1	1	0,680272102355957		
TGGTCACACG	1	1	0,680272102355957		
TGGTCTGGAG	1	1	0,680272102355957		
ACTTAGGCCT	1	1	0,680272102355957		
ACTGTGGCGG	1	1	0,680272102355957		
ACTGTCTCCA	1	1	0,680272102355957		
TGCTGATGGG	1	1	0,680272102355957		
TGGTGGGGGT	1	1	0,680272102355957		
TGGCGTGTGT	1	1	0,680272102355957		
TGGTGTTGAT	1	1	0,680272102355957		
ACTGCTGACT	1	1	0,680272102355957		
ACTGCACTAC	1	1	0,680272102355957		
TGGTTCACAC	1	1	0,680272102355957		
ACTCTAGACA	1	1	0,680272102355957		
ACTATTAGTG	1	1	0,680272102355957		
ACGTGACACC	1	1	0,680272102355957		

ACGGTGATGT	1	1	0,680272102355957		
ACGGTGACAG	1	1	0,680272102355957		
ACGGCTGGTA	1	1	0,680272102355957		
TGTAAGTCTG	1	1	0,680272102355957		
TGGTGGCCGC	1	1	0,680272102355957		
TGGCACTCCA	1	1	0,680272102355957		
TGAGGGATGG	1	1	0,680272102355957		
TGCTGGTACC	1	1	0,680272102355957		
TGCTGTGACC	1	1	0,680272102355957		
TGCTTGACAA	1	1	0,680272102355957		
TGGAACCTTG	1	1	0,680272102355957		
TGGAAGCTAG	1	1	0,680272102355957		
TGGAAGGACC	1	1	0,680272102355957		
GTGGGTCAGC	1	1	0,680272102355957		
TGGACCAGGC	1	1	0,680272102355957		
TGGACCCAAC	1	1	0,680272102355957		
TGGACTCGTT	1	1	0,680272102355957		
TGGGAGAAGT	1	1	0,680272102355957		
TGGCACATAA	1	1	0,680272102355957		
TGGCTCCTCC	1	1	0,680272102355957		
AGCCACCACA	1	1	0,680272102355957		
AGCAGCAGAG	1	1	0,680272102355957		
TGGCAGAAGG	1	1	0,680272102355957		
TGGCAGCTTT	1	1	0,680272102355957		
AGCAACAGTG	1	1	0,680272102355957		
AGATTGGAGA	1	1	0,680272102355957		
AGAGGGTGGG	1	1	0,680272102355957		
TGGCCTAGGG	1	1	0,680272102355957		
AGAGACCCTG	1	1	0,680272102355957		
AGACGCTTCT	1	1	0,680272102355957		
AGACCACCAC	1	1	0,680272102355957		
AGGACCCCCA	1	1	0,680272102355957		
TGGCACACCA	1	1	0,680272102355957		
CTGTTACCAG	1	1	0,680272102355957		
GACGTCTTCT	1	1	0,680272102355957		
GAAACTTAGC	1	1	0,680272102355957		
GGGAAACAGA	1	1	0,680272102355957		
GAAACAAGAT	1	1	0,680272102355957		
GGGACGGGGT	1	1	0,680272102355957		
GGGAGAGATT	1	1	0,680272102355957		
CTTGGGATGT	1	1	0,680272102355957		
GGGATGGGGT	1	1	0,680272102355957		
GGGCACCAGC	1	1	0,680272102355957		
GGGCAGGCGT	1	1	0,680272102355957		
GAAATAAAGT	1	1	0,680272102355957		
GGGCCAAAGC	1	1	0,680272102355957		

GGCTTGCCAG	1	1	0,680272102355957		
CTGTGTGGGA	1	1	0,680272102355957		
CTGTGGCCGG	1	1	0,680272102355957		
CTGTGCTCGG	1	1	0,680272102355957		
CTGTGCCAAT	1	1	0,680272102355957		
GGGCCCCGCA	1	1	0,680272102355957		
GGGCCCTGG	1	1	0,680272102355957		
GGGCGGGGGC	1	1	0,680272102355957		
GGGCTACGTC	1	1	0,680272102355957		
CTGGGGAGTG	1	1	0,680272102355957		
CTGGGCTGCC	1	1	0,680272102355957		
GGGCAGGGGC	1	1	0,680272102355957		
GAATTTGCCA	1	1	0,680272102355957		
GGTGTATATG	1	1	0,680272102355957		
GGCCCTCTGA	1	1	0,680272102355957		
GCCACAAGTC	1	1	0,680272102355957		
GCCACCAAGT	1	1	0,680272102355957		
GACCCGGGAG	1	1	0,680272102355957		
GGCCTCGGCG	1	1	0,680272102355957		
GGCCTGAGGC	1	1	0,680272102355957		
GGCCTGTAAT	1	1	0,680272102355957		
GGCTATGCCA	1	1	0,680272102355957		
GGCTATGTTA	1	1	0,680272102355957		
GGCTTTAGGG	1	1	0,680272102355957		
GACACAGCAA	1	1	0,680272102355957		
GCCACTCTTG	1	1	0,680272102355957		
GAATTAACAT	1	1	0,680272102355957		
GGCTCCTTGA	1	1	0,680272102355957		
GGCTCTTCTG	1	1	0,680272102355957		
GGCTGCATTA	1	1	0,680272102355957		
GAAGAGAAAA	1	1	0,680272102355957		
GAACGTCTCT	1	1	0,680272102355957		
GAACCTGGAG	1	1	0,680272102355957		
GAACCTAGCT	1	1	0,680272102355957		
GAACAGAAGG	1	1	0,680272102355957		
GGCTGGTCAC	1	1	0,680272102355957		
GACACTACAC	1	1	0,680272102355957		
CTCTTATCAC	1	1	0,680272102355957		
GGGTTCCCCG	1	1	0,680272102355957		
GGTACACATA	1	1	0,680272102355957		
CTGAGGGTCG	1	1	0,680272102355957		
CTGAGGGGTG	1	1	0,680272102355957		
GGTACCCCTT	1	1	0,680272102355957		
GGTAGCTTGG	1	1	0,680272102355957		
CTGACCCTGG	1	1	0,680272102355957		
CTGACCCCTT	1	1	0,680272102355957		

CTGAACCTGA	1	1	0,680272102355957		
GGTGAAGACA	1	1	0,680272102355957		
GGGCTACGTT	1	1	0,680272102355957		
CTCTTCAGGA	1	1	0,680272102355957		
CTGCAGACCC	1	1	0,680272102355957		
GGTGAAGACC	1	1	0,680272102355957		
GCGGGGTGGA	1	1	0,680272102355957		
GGTGAGACCT	1	1	0,680272102355957		
GCCCAAATGA	1	1	0,680272102355957		
CTCGCGGCGG	1	1	0,680272102355957		
CTCGCAGTGG	1	1	0,680272102355957		
GGTGATGGAG	1	1	0,680272102355957		
GCAGCCATAC	1	1	0,680272102355957		
GGTGGGAAGG	1	1	0,680272102355957		
GGTGTAACA	1	1	0,680272102355957		
CTGAAACAGC	1	1	0,680272102355957		
GTGGTACGTG	1	1	0,680272102355957		
GGCCCCGTGT	1	1	0,680272102355957		
GGGCTGGAGG	1	1	0,680272102355957		
GGGGAACTGC	1	1	0,680272102355957		
GCTAGGTCTG	1	1	0,680272102355957		
GCCAGACGTG	1	1	0,680272102355957		
CTGGCTATCC	1	1	0,680272102355957		
GGGGTAGGAC	1	1	0,680272102355957		
CTGGCCAAGG	1	1	0,680272102355957		
CTGGCCAAGA	1	1	0,680272102355957		
CTGGATGCCG	1	1	0,680272102355957		
CTGATGCGAC	1	1	0,680272102355957		
CTGGAGTGCA	1	1	0,680272102355957		
GCCAGGTTGC	1	1	0,680272102355957		
TAGCCACCGC	1	1	0,680272102355957		
GCCAGCTGAC	1	1	0,680272102355957		
CTGCTTTCTG	1	1	0,680272102355957		
GGGGTCTGGG	1	1	0,680272102355957		
GGGGTGGGTG	1	1	0,680272102355957		
GGGTCCGCTT	1	1	0,680272102355957		
GGGTCCGTCC	1	1	0,680272102355957		
GCGGTTGTGG	1	1	0,680272102355957		
CTGCCCCCA	1	1	0,680272102355957		
GGGTGGGGTT	1	1	0,680272102355957		
GGGCTCACCT	1	1	0,680272102355957		
GCTAAACTGC	1	1	0,680272102355957		
GATGAACTGA	1	1	0,680272102355957		
GCCAATAATA	1	1	0,680272102355957		
GGAAGGGGGG	1	1	0,680272102355957		
GGAAGTGCAA	1	1	0,680272102355957		

GGAAGTGGAG	1	1	0,680272102355957		
GATTGGCGGC	1	1	0,680272102355957		
GCTGACACAG	1	1	0,680272102355957		
GATGTAGTGG	1	1	0,680272102355957		
GCTCTTAATA	1	1	0,680272102355957		
GGACCTGCGC	1	1	0,680272102355957		
GCCAACTGGT	1	1	0,680272102355957		
GCAAAACCTC	1	1	0,680272102355957		
GCCAAGGGGC	1	1	0,680272102355957		
GGAACCTTCC	1	1	0,680272102355957		
GGAGCAGGCT	1	1	0,680272102355957		
GATCTCATCT	1	1	0,680272102355957		
GATCTCACTG	1	1	0,680272102355957		
GATCCGCTCT	1	1	0,680272102355957		
GATCCCAACT	1	1	0,680272102355957		
GATCACAGTT	1	1	0,680272102355957		
GATATCAGTC	1	1	0,680272102355957		
GATATCAACA	1	1	0,680272102355957		
GATAGGGTCG	1	1	0,680272102355957		
GGAGCTCTTG	1	1	0,680272102355957		
GCCAAGATGC	1	1	0,680272102355957		
GCACCCTCAG	1	1	0,680272102355957		
GCAGCTAATT	1	1	0,680272102355957		
GCAGACTATC	1	1	0,680272102355957		
GCACTGCACA	1	1	0,680272102355957		
GCACTCCAAG	1	1	0,680272102355957		
GCACCTTATT	1	1	0,680272102355957		
GCTGTAATCC	1	1	0,680272102355957		
GCTGCTGCGC	1	1	0,680272102355957		
GCTGTAGGGG	1	1	0,680272102355957		
GCACCTATTG	1	1	0,680272102355957		
GCACCGCCGG	1	1	0,680272102355957		
GCAAAAACCC	1	1	0,680272102355957		
GCAGGCATCA	1	1	0,680272102355957		
GGAGCTGGCC	1	1	0,680272102355957		
GCTGTTGATG	1	1	0,680272102355957		
GCTTGATGTG	1	1	0,680272102355957		
GCAAGCCATA	1	1	0,680272102355957		
GCTTTTAAGG	1	1	0,680272102355957		
GCAACTTAGA	1	1	0,680272102355957		
GCAGGCCAAG	1	1	0,680272102355957		
GCTGCGCAGA	1	1	0,680272102355957		
GCAACACATC	1	1	0,680272102355957		
GCAAAGCCCA	1	1	0,680272102355957		
GGAACCAGGT	1	1	0,680272102355957		
GCACCGAGGT	1	1	0,680272102355957		

GAGAATCTGC	1	1	0,680272102355957		
GGCACTGCAG	1	1	0,680272102355957		
GGCAGCGCCC	1	1	0,680272102355957		
GGCAGTCCTA	1	1	0,680272102355957		
GAGCAGGAGC	1	1	0,680272102355957		
GAGCAAATGT	1	1	0,680272102355957		
GAGAGGTTGA	1	1	0,680272102355957		
GGCCAAGATC	1	1	0,680272102355957		
GAGAGAAGAG	1	1	0,680272102355957		
GGCCACCACA	1	1	0,680272102355957		
GAGACGACGT	1	1	0,680272102355957		
GAGTTGGCAC	1	1	0,680272102355957		
GGCCAGGGCA	1	1	0,680272102355957		
GAGCTGCAGG	1	1	0,680272102355957		
GGCCAGGGTG	1	1	0,680272102355957		
GAGAAACATT	1	1	0,680272102355957		
GGCCCATATG	1	1	0,680272102355957		
GACTTGTATA	1	1	0,680272102355957		
GGCCCCAGGC	1	1	0,680272102355957		
GACTTCACTT	1	1	0,680272102355957		
GACTGGTACC	1	1	0,680272102355957		
GACTCTTCAG	1	1	0,680272102355957		
GGCCCCATTT	1	1	0,680272102355957		
GACTCCTGGG	1	1	0,680272102355957		
GAGACCCTGG	1	1	0,680272102355957		
GGCAAAGACC	1	1	0,680272102355957		
GGTGGTGCCT	1	1	0,680272102355957		
GGAGGCAGAG	1	1	0,680272102355957		
GAGTGAGTGA	1	1	0,680272102355957		
GGAGGCCGAG	1	1	0,680272102355957		
GAGTCTTGCT	1	1	0,680272102355957		
GGAGGCGGAG	1	1	0,680272102355957		
GGAGGTGGAG	1	1	0,680272102355957		
GAGTAGTAAT	1	1	0,680272102355957		
GGATGATGTC	1	1	0,680272102355957		
GGATGGGTGT	1	1	0,680272102355957		
GAGCGCATCG	1	1	0,680272102355957		
GAGGGAGGCA	1	1	0,680272102355957		
GAGCGGCTCT	1	1	0,680272102355957		
GAGGCCGGAA	1	1	0,680272102355957		
GAGGCCCTGC	1	1	0,680272102355957		
GAGGCAGCTC	1	1	0,680272102355957		
GAGGAGAAGA	1	1	0,680272102355957		
GCTCTCCCCC	1	1	0,680272102355957		
GAGGACTCCG	1	1	0,680272102355957		
GGCAAGAGGG	1	1	0,680272102355957		

GAGCTTCTCG	1	1	0,680272102355957		
GGCAAGTGCA	1	1	0,680272102355957		
GGCAATATGG	1	1	0,680272102355957		
GAGTTAGGCA	1	1	0,680272102355957		
GAGGGCCCAT	1	1	0,680272102355957		
GCCTGTGGCT	1	1	0,680272102355957		
GTTGCGGAGG	1	1	0,680272102355957		
CCAGCTTCCT	1	1	0,680272102355957		
CCAGCCATCC	1	1	0,680272102355957		
GCCGGCGCTC	1	1	0,680272102355957		
GTGGTGCTCG	1	1	0,680272102355957		
CCACTTCACT	1	1	0,680272102355957		
CCACTGCTAG	1	1	0,680272102355957		
CCACTGCTAC	1	1	0,680272102355957		
GTGTAACCCC	1	1	0,680272102355957		
GTGTAGTTGA	1	1	0,680272102355957		
GTGGTACACA	1	1	0,680272102355957		
GTGTGTA AAA	1	1	0,680272102355957		
GCCTCTCTAC	1	1	0,680272102355957		
CCACTGCAAT	1	1	0,680272102355957		
GTGTTGGTGA	1	1	0,680272102355957		
GTTCACTGCA	1	1	0,680272102355957		
CCACTATGCC	1	1	0,680272102355957		
GTTCCAGCAG	1	1	0,680272102355957		
CCACTAATGG	1	1	0,680272102355957		
GCCTCAGAGT	1	1	0,680272102355957		
GTTCCAGCCG	1	1	0,680272102355957		
GTTCCCCAGT	1	1	0,680272102355957		
GTGGAGGGTG	1	1	0,680272102355957		
GTGTGCCTCC	1	1	0,680272102355957		
CCCCCCTGAC	1	1	0,680272102355957		
GTGGCACAAA	1	1	0,680272102355957		
GCCGCCTGCC	1	1	0,680272102355957		
CCCTCAATCC	1	1	0,680272102355957		
CTCCCTTGCC	1	1	0,680272102355957		
CCCCTCAAAA	1	1	0,680272102355957		
CCCCTATTAA	1	1	0,680272102355957		
CCCCGTATGG	1	1	0,680272102355957		
GCCGGCCCGG	1	1	0,680272102355957		
CCCCGATCTT	1	1	0,680272102355957		
GTGGCATATG	1	1	0,680272102355957		
GTGGTGACCC	1	1	0,680272102355957		
CCCCCCTTCT	1	1	0,680272102355957		
GTTGCTGGGG	1	1	0,680272102355957		
GTGGCGGCGC	1	1	0,680272102355957		
CCCCAATGCT	1	1	0,680272102355957		

GTGGCGTACC	1	1	0,680272102355957		
CCCATCATCC	1	1	0,680272102355957		
CCCATAAGGA	1	1	0,680272102355957		
CCCACAAAAG	1	1	0,680272102355957		
GTGGCTTGTG	1	1	0,680272102355957		
CCATTGTA CT	1	1	0,680272102355957		
GTGGGGCACG	1	1	0,680272102355957		
CCATCCTCTC	1	1	0,680272102355957		
CCCCCGTGAA	1	1	0,680272102355957		
TACCCAGCAT	1	1	0,680272102355957		
GTTGAGGTTA	1	1	0,680272102355957		
TACAAAACCA	1	1	0,680272102355957		
CAGGGCTCAC	1	1	0,680272102355957		
CAGGGATCAA	1	1	0,680272102355957		
GCCTGGACCA	1	1	0,680272102355957		
TACATCATTC	1	1	0,680272102355957		
TACATCCGAA	1	1	0,680272102355957		
CAGGCTCCTG	1	1	0,680272102355957		
TACATTCTGT	1	1	0,680272102355957		
CAGGCCTCTG	1	1	0,680272102355957		
CAGTCCCACA	1	1	0,680272102355957		
TACCAGGTGG	1	1	0,680272102355957		
TAAGTGGA AAA	1	1	0,680272102355957		
TACCCCATAA	1	1	0,680272102355957		
TACCCCGAG	1	1	0,680272102355957		
CAGGAACATT	1	1	0,680272102355957		
TAGAAACCAG	1	1	0,680272102355957		
TAGACTTATT	1	1	0,680272102355957		
CAGCTGTACC	1	1	0,680272102355957		
CAGCTCCGCT	1	1	0,680272102355957		
CAGCTCAGCT	1	1	0,680272102355957		
CAGCGCTTTG	1	1	0,680272102355957		
CAGCGCTGCA	1	1	0,680272102355957		
TACCAACTTG	1	1	0,680272102355957		
TAAAGCACTT	1	1	0,680272102355957		
CCACAGGCAA	1	1	0,680272102355957		
GCCTCAGTTC	1	1	0,680272102355957		
CCACAGGAAT	1	1	0,680272102355957		
CCACACCTCT	1	1	0,680272102355957		
GTTTCCCAAT	1	1	0,680272102355957		
GTTTGTTGCC	1	1	0,680272102355957		
GTTTTCCATA	1	1	0,680272102355957		
TAAAATATGT	1	1	0,680272102355957		
TAAACGGCCT	1	1	0,680272102355957		
TAAACTGTTA	1	1	0,680272102355957		
CAGTAAATTG	1	1	0,680272102355957		

GCCTGGCTCC	1	1	0,680272102355957		
CCCTCTTTGG	1	1	0,680272102355957		
TAACAGCCAG	1	1	0,680272102355957		
CATACATTGG	1	1	0,680272102355957		
CATACAGAAA	1	1	0,680272102355957		
CAGTTTTGGT	1	1	0,680272102355957		
CAGTTGTATG	1	1	0,680272102355957		
CAGTTAGTAA	1	1	0,680272102355957		
TAACTTGCCA	1	1	0,680272102355957		
TAAGCAAAAA	1	1	0,680272102355957		
TAAGGCCACC	1	1	0,680272102355957		
CAGTCCCGGC	1	1	0,680272102355957		
CATTTAGAAG	1	1	0,680272102355957		
GTCAAGGAGT	1	1	0,680272102355957		
GTCATAGCTG	1	1	0,680272102355957		
GTAAGGAGT	1	1	0,680272102355957		
GTAGACACCT	1	1	0,680272102355957		
CGCCGGGGGC	1	1	0,680272102355957		
GTAGTTTACA	1	1	0,680272102355957		
GCGCTGGATT	1	1	0,680272102355957		
GTATCTCCCC	1	1	0,680272102355957		
CGCCCAGTCC	1	1	0,680272102355957		
GTCAACAGTA	1	1	0,680272102355957		
CGGAAGGAAC	1	1	0,680272102355957		
CGCAGCGGGT	1	1	0,680272102355957		
CGGACTCACT	1	1	0,680272102355957		
CGATATTCCC	1	1	0,680272102355957		
CGAGTGCCCA	1	1	0,680272102355957		
CGAGCTTCCA	1	1	0,680272102355957		
CGAGACTCTG	1	1	0,680272102355957		
GCGCGCCGCT	1	1	0,680272102355957		
GTCACACTGG	1	1	0,680272102355957		
GTCACTCAGA	1	1	0,680272102355957		
GCCGCTGCCA	1	1	0,680272102355957		
GTCATACAGT	1	1	0,680272102355957		
GTGGAGACGG	1	1	0,680272102355957		
CCTTCTTGCT	1	1	0,680272102355957		
TTTTTTTTTC	1	1	0,680272102355957		
GTACCCGGAC	1	1	0,680272102355957		
GGTGTGGGTG	1	1	0,680272102355957		
CTCAGACAGT	1	1	0,680272102355957		
GGTGTGCGG	1	1	0,680272102355957		
GGTTGTGGTT	1	1	0,680272102355957		
GTAACGCCAC	1	1	0,680272102355957		
CTAGAACAGA	1	1	0,680272102355957		

CTACTGTACT	1	1	0,680272102355957		
GTACAATGTG	1	1	0,680272102355957		
CGTGACCTGG	1	1	0,680272102355957		
CGTCTTCACC	1	1	0,680272102355957		
GTACTIONGTAC	1	1	0,680272102355957		
GCGGCCATCC	1	1	0,680272102355957		
GCGCCTGCAG	1	1	0,680272102355957		
GCCCAGGACA	1	1	0,680272102355957		
GTACCTAGAG	1	1	0,680272102355957		
CGGGCAGGGA	1	1	0,680272102355957		
CGGGATTCCCT	1	1	0,680272102355957		
CGGGATAACC	1	1	0,680272102355957		
CGGGACCTGT	1	1	0,680272102355957		
GTACGTATTC	1	1	0,680272102355957		
CGGCCCGGGA	1	1	0,680272102355957		
GTACGTCCCA	1	1	0,680272102355957		
GCGGCATACA	1	1	0,680272102355957		
CGGAGGTGGG	1	1	0,680272102355957		
CGTCCCGGAG	1	1	0,680272102355957		
GTGATGGGTG	1	1	0,680272102355957		
GCGCCAGCC	1	1	0,680272102355957		
GCGACAGAGT	1	1	0,680272102355957		
CGAAACCTCG	1	1	0,680272102355957		
GTGACAGGTG	1	1	0,680272102355957		
CCTCAGGGAC	1	1	0,680272102355957		
GTGACGTCGA	1	1	0,680272102355957		
CCTACCTGGG	1	1	0,680272102355957		
CCTAAGGCTA	1	1	0,680272102355957		
GTGAGACCTT	1	1	0,680272102355957		
GCCCTGGGGC	1	1	0,680272102355957		
GCCCTCCAAT	1	1	0,680272102355957		
CCGTAGTGCC	1	1	0,680272102355957		
CCTCCCTGTG	1	1	0,680272102355957		
GCGAACCCCC	1	1	0,680272102355957		
CCGGCACAGG	1	1	0,680272102355957		
GTGATTCCAC	1	1	0,680272102355957		
GCCGCAGTCA	1	1	0,680272102355957		
GCCGCCACCC	1	1	0,680272102355957		
GTGCTGATTC	1	1	0,680272102355957		
GCGAAACCCA	1	1	0,680272102355957		
GTGCTGCCTG	1	1	0,680272102355957		
CCGCCGGATC	1	1	0,680272102355957		
CCGCCAAGCC	1	1	0,680272102355957		
GCCGAGGAAA	1	1	0,680272102355957		
GTCTGTTGGA	1	1	0,680272102355957		
GTCCGGAGTC	1	1	0,680272102355957		

CCTCTGCACT	1	1	0,680272102355957		
CCTGGAGCAA	1	1	0,680272102355957		
GCCCTCCGG	1	1	0,680272102355957		
GTCCTAGTTG	1	1	0,680272102355957		
GTCTCAGTTA	1	1	0,680272102355957		
CCTGGCCAGA	1	1	0,680272102355957		
CCTGTAGCCC	1	1	0,680272102355957		
GCCCTGAAG	1	1	0,680272102355957		
CCTGGACAAA	1	1	0,680272102355957		
GCGATGGGGG	1	1	0,680272102355957		
CCTGCAATCC	1	1	0,680272102355957		
GTCTATGCCT	1	1	0,680272102355957		
GTCATAGGAA	1	1	0,680272102355957		
GTGAAAACCC	1	1	0,680272102355957		
GCCCGCAGTC	1	1	0,680272102355957		
GCCCTCCAG	1	1	0,680272102355957		
GCCCGAGCC	1	1	0,680272102355957		
GCCTGCTCCC	2	2	0,714285731315613		
GCGGGGCCCC	2	2	0,714285731315613		
AGCCTGTTGC	2	2	0,714285731315613		
GCTCCACTGG	2	2	0,714285731315613		
TTGGCCAGGG	2	2	0,714285731315613		
TTGCAATGCA	2	2	0,714285731315613		
TTTGTGTCAC	2	2	0,714285731315613		
TTGCCCAGGT	2	2	0,714285731315613		
GCGTGCTCTC	2	2	0,714285731315613		
AAAAGAGTGG	2	2	0,714285731315613		
GCCGGGCACG	2	2	0,714285731315613		
GCATTTAAAT	2	2	0,714285731315613		
GCCACCCCGT	2	2	0,714285731315613		
GCCCGTGCCA	2	2	0,714285731315613		
AAACCCCAAT	2	2	0,714285731315613		
GTCTGGGGGA	2	2	0,714285731315613		
AGCCTGCAGA	2	2	0,714285731315613		
TCTGGTCTGG	2	2	0,714285731315613		
CCGTCATCCT	2	2	0,714285731315613		
GTGACAGAAG	2	2	0,714285731315613		
ATGAAACCCC	2	2	0,714285731315613		
GTGAAACTCC	2	2	0,714285731315613		
CCGCTTCTGC	2	2	0,714285731315613		
CCTGCACACT	2	2	0,714285731315613		
ATGGCACGGA	2	2	0,714285731315613		
TGACCCACACA	2	2	0,714285731315613		
GTCCTGGTGG	2	2	0,714285731315613		
CCTGTAGTCT	2	2	0,714285731315613		
CCTGTGGTCC	2	2	0,714285731315613		

ATCACACCAC	2	2	0,714285731315613		
CGACCGTGGC	2	2	0,714285731315613		
ATCTCGGCTC	2	2	0,714285731315613		
CAAAC TAACC	2	2	0,714285731315613		
TACCCTAGAA	2	2	0,714285731315613		
CACTGAGCCA	2	2	0,714285731315613		
TAGTAGATGC	2	2	0,714285731315613		
CATTGCCTTC	2	2	0,714285731315613		
GTTGGTCTGT	2	2	0,714285731315613		
TCAGAAGGTG	2	2	0,714285731315613		
CCGGCCCTAC	2	2	0,714285731315613		
CAACATTCT	2	2	0,714285731315613		
CGGATAACCA	2	2	0,714285731315613		
TCCCCGTA CT	2	2	0,714285731315613		
CCCAAACGTG	2	2	0,714285731315613		
CCCCGCCAAG	2	2	0,714285731315613		
CCCGCCTCTT	2	2	0,714285731315613		
CCCTGCCTTG	2	2	0,714285731315613		
ATGGCCATAG	2	2	0,714285731315613		
GTGTGTGGTG	2	2	0,714285731315613		
GGAATATGCA	2	2	0,714285731315613		
GGCCCGAGTT	2	2	0,714285731315613		
ACCGACTGAT	2	2	0,714285731315613		
GGAGTGTGCT	2	2	0,714285731315613		
GATGACGACT	2	2	0,714285731315613		
GGACTGGCCC	2	2	0,714285731315613		
GATGCAGCAG	2	2	0,714285731315613		
CGCCACCAAG	2	2	0,714285731315613		
TTCCGGTTCC	2	2	0,714285731315613		
GGCCGCTGCT	2	2	0,714285731315613		
GCAACTGTGA	2	2	0,714285731315613		
TTCTGCACTG	2	2	0,714285731315613		
GCTTCCATCT	2	2	0,714285731315613		
GCACCCGCCT	2	2	0,714285731315613		
TTCTTGTGGC	2	2	0,714285731315613		
AAGTTGCTAT	2	2	0,714285731315613		
GATGCTGCCA	2	2	0,714285731315613		
AGCCTTTGTT	2	2	0,714285731315613		
GCAGATCGGG	2	2	0,714285731315613		
AGGTGCAGAG	2	2	0,714285731315613		
CGGTTTCAA	2	2	0,714285731315613		
GGTGTGAGCC	2	2	0,714285731315613		
GGTGA GCGTG	2	2	0,714285731315613		
CTCTCACCT	2	2	0,714285731315613		
GGCCCTGGTG	2	2	0,714285731315613		
GGGTGCTTGG	2	2	0,714285731315613		

GACCCTAGCT	2	2	0,714285731315613		
GGGGTCCTTC	2	2	0,714285731315613		
AGCCGGGATG	2	2	0,714285731315613		
CTGGCTGCAA	2	2	0,714285731315613		
AGCCCAGGAG	2	2	0,714285731315613		
TGGAGTGGAG	2	2	0,714285731315613		
CTTGATTCCC	2	2	0,714285731315613		
TGCAATAAGC	2	2	0,714285731315613		
GGGTGTGGTG	2	2	0,714285731315613		

Anexo 2. Genoteca correspondiente al paciente B

Secuencia Tag	Antes	Después	P	Nº Identificación Unigene	Gen
ACTTTTTCAA	92	23	0	Hs.550481	MYO5B
CCCATCGTCC	297	184	0,00001	Hs.465061	SMAD2
ATAATTCTTT	29	4	1,33514E-05	Hs.156367	RPS29
GCAGGGCCTC	4	22	0,000166662	Hs.301350	FYXD3
TCTCCATACC	36	10	1,27E-04	Hs.478044	PA2G4
GGGCTGGGGT	51	90	2,27E-04	Hs425125	RPL29
GTTGTGGTTA	59	96	0,000769973	Hs.534255	B2M
GTGCGCTGAG	6	22	0,001177192	Hs.534125	HLA-C
CTCCACCCGA	21	5	0,00172921	Hs.82961	TFF3
ATTTGAGAAG	33	12	0,00178349	Hs.521640	RAD23B
TGGAAATGAC	18	39	0,002449473	Hs.172928	COL1A1
AAACTGTGGT	14	2	0,002660473	Hs.227253	TOMM70A
GGGAGGGGTG	3	15	0,003105839	Hs.2399	MMP14
AGCAGATCAG	20	40	0,004611969	Hs.143878	S100A10
ATGGCTGGTA	25	9	0,006165703	Hs.498569	RPS2
AGCTCTTGGA	20	6	0,006808241	Hs.334841	SELENBP1
CGCCGCGGTG	4	14	0,012040099	Hs.535464	EST
AAGGGAGCAC	4	14	0,012040099	Hs.449585	IGLC2
CTGTTGATTG	13	3	0,01306355	Hs.546261	HNRPA1
TCCCCGTACA	11	2	0,013428171	No está en SAGE	
GTTCGTGCCA	18	6	0,015142322	Hs.529631	RPL35A
GCCGTGTCCG	7	18	0,016950448	Hs.408073	RPS6
TCAATAAAA	6	0	0,018742323	Hs.356502	RPLP1
CTGCCAAGTT	6	16	0,021723549	Hs.409415	ZYX
CTCCCCAAG	3	11	0,022918979326884	Hs.514635	PCYT2
TGTACCTGTA	3	11	0,022918979326884	Hs.524390	K-ALPHA-1
GCCTGTATGA	17	6	0,023314516	Hs.356794	RPS24
GGGCCGTGGG	0	5	0,030461947	Hs.199625	HAX1
GTCATAGCTG	0	5	0,030461947	Hs.356502	RPL1
AAGGGCAGTG	0	5	0,030461947	Hs.377416	ELMO3
ATCAGTGGCT	1	7	0,031841437	Hs.89545	PSMB4

GAAGCAGGAC	22	36	0,03249673	Hs.170622	CFL1
TGAGGACACA	5	0	0,03536133	Hs.535847	EST
CTCTCACCT	5	0	0,03536133	Hs.530687	RNH
AAAGTGAAGA	5	0	0,03536133	Hs.356766	EST
CAAGGACCAG	9	2	0,036827842	Hs.109	DPEP1
GCTCCCAGAC	3	10	0,03709610303243	Hs.464210	SYNGR2
TTGGGGTTTC	33	18	0,037693779	Hs.448738	FTH1
CACCTAATTG	39	23	0,038534959	No tiene	EST
GCCAGCCCAG	5	13	0,040037672	Hs.467408	TRIM28
ACATCATCGA	45	27	0,040106455	Hs.408054	RPL12
CGTGGGGTGG	2	8	0,045701504	Hs.528713	KIFC2
GTGGCCACGG	2	8	0,045701504	Hs.112405	S100A9
GGGCCCAGGA	2	8	0,045701504	Hs.118983	GSDMDC1
GCTGCGCCG	2	8	0,045701504	Hs.381061	RPL19
TCGCCGCGAC	2	8	0,045701504	Hs.433701	RPL37A
AGCCCTACAA	49	31	0,045728167	No tiene	EST
AAGGTGGAGG	32	18	0,046763261	Hs.337766	RPL18A
CCACTGCACT	81	100	0,050747223	Hs.107003	CCNB1IP1
AGGTGGCAAG	12	4	0,051483154296875	Hs.9613	ANGPTL4
GTTACATTA	4	11	0,051962097	Hs.529901	XIST
TGGGTGAGCC	4	11	0,051962097		
GCGCAGAGGT	11	20	0,05396688		
TACCTCTGAT	10	3	0,054244995		
TGGTGTATGC	10	3	0,054244995		
TAAATTGCAA	0	4	0,056126753		
TACCCACCC	0	4	0,056126753		
CATATCATTA	0	4	0,056126753		
GGCAACGTGG	0	4	0,056126753		
CCGGGTGATG	0	4	0,056126753		
TTGCCGGTTA	0	4	0,056126753		
GGACCACTGA	19	30	0,056424499		
GCCGAGGAAG	3	9	0,058069388071696		
CTCATAGCAG	3	9	0,058069388071696		
GGGCGCTGTG	3	9	0,058069388071696		
CCGTCCAAGG	1	6	0,058375716		
GTGGCATCAC	1	6	0,058375716		
GCTGGCTGGC	1	6	0,058375716		
GCATAGGCTG	1	6	0,058375716		
TAGTTGAAGT	5	12	0,061711073		
TGCACGTTTT	37	23	0,06276679		
CGCCGCCGGC	28	40	0,064477801322937		
ACTTTTTTAC	8	2	0,065128763516744		
CCTGGGAAGT	8	2	0,065128763516744		
TAGCTCTATG	4	0	0,066716194152832		
ATTATTTTTT	4	0	0,066716194152832		
AAACCCCAAT	4	0	0,066716194152832		

AATGCAGGCA	4	0	0,066716194152832		
GTGATGTACG	4	0	0,066716194		
ATCGCACACC	4	0	0,066716194152832		
ATGGAAGGTG	4	0	0,066716194152832		
TGTATGAATT	4	0	0,066716194152832		
CCTGTAATCC	34	21	0,073532462		
GCCCCTGCTG	2	7	0,07635959		
GAGGGCCGGT	4	10	0,082122167		
AATATGTGGG	9	3	0,086031357		
CACAAACGGT	23	33	0,086734335		
GCCCTCGGCC	3	8	0,089932005		
TTCATACACC	50	35	0,095826109		
TGGGCAAAGC	32	21	0,097060759862264		
AGGGCTGCAG	1	5	0,099299430847168		
GCCGGGTGGG	1	5	0,099299430847168		
GGGGTCAGGG	1	5	0,099299430847168		
CAGGGGTGAC	1	5	0,099299430847168		
GGGGGACGGC	1	5	0,099299430847168		
CTCATCTGCT	1	5	0,099299430847168		
TTTGGGCCTA	1	5	0,099299430847168		
GACGACACGA	21	12	0,102665503819784		
GTAGGGGTAA	7	2	0,109972834587097		
CCATTGCACT	12	19	0,112390279769897		
AAAACATTCT	15	8	0,114492217699687		
TTCCGGTTCC	5	1	0,114596923192342		
GCATTTAAAT	5	1	0,114596923192342		
CCTGCTGCAG	5	1	0,114596923192342		
CCTGCAATCC	5	1	0,114596923192342		
TACCCTAGAA	5	1	0,114596923192342		
AGGAGCTGCT	5	1	0,114596923192342		
ACTGCTTGCC	5	1	0,114596923192342		
TTGTGATGTA	5	1	0,114596923192342		
GTGGTGCGCA	0	3	0,116503636042277		
CTGGCGCCGA	0	3	0,116503636042277		
ATAGGTCAGA	0	3	0,116503636042277		
GCCCACATCC	0	3	0,116503636042277		
GAAACCGAGG	0	3	0,116503636042277		
GGAGGTAGGG	0	3	0,116503636042277		
GTGAAACCCA	0	3	0,116503636042277		
GTGACTGCCA	0	3	0,116503636042277		
GTGGGGCCAA	0	3	0,116503636042277		
GCCTGTACAA	0	3	0,116503636042277		
GTGAAACCAT	0	3	0,116503636042277		
GCTGGGACAG	0	3	0,116503636042277		
TGGCAACCTT	0	3	0,116503636042277		
CTGGCGAGCG	0	3	0,116503636042277		

GAGACAGCAC	0	3	0,116503636042277		
TGGAAGGGCA	0	3	0,116503636042277		
GGGATCAAGG	0	3	0,116503636042277		
GATTAAGTGA	0	3	0,116503636042277		
GTCCAACAAC	0	3	0,116503636042277		
GGCCCACTAG	0	3	0,116503636042277		
GATCCCAACT	0	3	0,116503636042277		
TGCCTGTAGT	0	3	0,116503636042277		
GTAAGATTTG	0	3	0,116503636042277		
CTGTGCCCAG	0	3	0,116503636042277		
GGGTGCTTGG	0	3	0,116503636042277		
TTAAAGGCCG	0	3	0,116503636042277		
GCTTAACCTG	0	3	0,116503636042277		
TACCAGCACA	0	3	0,116503636042277		
GCACTCCAGC	0	3	0,116503636042277		
TGTGAGGGAA	0	3	0,116503636042277		
GGCCTGCTGC	0	3	0,116503636042277		
GCGGAGAGAG	0	3	0,116503636042277		
GCGGCAGCGG	0	3	0,116503636042277		
GCGCTGGAGT	4	9	0,116911649703979		
CAGGCCCCAC	4	9	0,116911649703979		
GCGAAACCCT	6	12	0,117835521697998		
TCCCTATTAA	11	5	0,121599793434143		
GAAAAATGGT	11	5	0,121599793434143		
GCCCCCAATA	7	13	0,121838887532552		
GGAAAACAGA	8	3	0,125667055447896		
GGGCTGGGCC	2	6	0,125962018966675		
GCCCAGCGGC	2	6	0,125962018966675		
TACTCTTGGC	2	6	0,125962018966675		
TGGACCCAAC	3	0	0,131376226743062		
TACTGCTCGG	3	0	0,131376226743062		
GCTTTGATGA	3	0	0,131376226743062		
CCACTGTACT	3	0	0,131376226743062		
GGGGTAAGAA	3	0	0,131376226743062		
AATCCCGTC	3	0	0,131376226743062		
GCTTTCTCAC	3	0	0,131376226743062		
TACGTTGCAG	3	0	0,131376226743062		
CTACTGCACT	3	0	0,131376226743062		
CCTTGGTGCC	3	0	0,131376226743062		
AATGAGCAAC	3	0	0,131376226743062		
GCTGCACCGG	3	0	0,131376226743062		
GGGGCTGGAG	3	0	0,131376226743062		
CAGTGTGCG	3	0	0,131376226743062		
CCTTGTCCAG	3	0	0,131376226743062		
AAGGTAATGC	3	0	0,131376226743062		
GCTCCCCTGT	3	0	0,131376226743062		

ATGGCGGGTG	3	0	0,131376226743062		
CGGCTCAAGT	3	0	0,131376226743062		
CAGCTCACTG	3	0	0,131376226743062		
CAAGTTTGCT	3	0	0,131376226743062		
CAGTCAGGCT	3	0	0,131376226743062		
AGCCACCACG	3	0	0,131376226743062		
TCTGTGCTGT	3	0	0,131376226743062		
CCATTGCATT	3	0	0,131376226743062		
ATCGTGCCAC	3	0	0,131376226743062		
AAGCTCTGTG	3	0	0,131376226743062		
TCACCTGAAA	3	0	0,131376226743062		
TGGTTTTTGG	3	0	0,131376226743062		
TGGCCCCACC	3	0	0,131376226743062		
TTATTGTTCC	3	0	0,131376226743062		
CAGCTATTTT	3	0	0,131376226743062		
GGGTTGACTT	3	0	0,131376226743062		
CTGTCATTTG	3	0	0,131376226743062		
TAATAAAGGT	21	13	0,13682222366333		
GCCCAGGTCA	8	14	0,13835871219635		
TGAGGGAATA	16	9	0,141329526901245		
TGTGCTAAAT	16	9	0,141329526901245		
AACCTGGGAG	16	9	0,141329526901245		
TGGAATGCTG	6	11	0,142012238502502		
TTCGGTTGGT	6	11	0,142012238502502		
CTTCCTTGCC	12	18	0,145918846130371		
GACTCTGGTG	13	7	0,148965398470561		
TTGGTGAAGG	28	19	0,15015451113383		
GTGTGTTTGT	6	2	0,155831019083659		
AGCCTGGACT	6	2	0,155831019083659		
ATGACTCAAG	6	2	0,155831019083659		
GGGCCTGTGC	3	7	0,158182223637899		
CCGTGGTCGT	3	7	0,158182223637899		
GGAGGTGGGG	3	7	0,158182223637899		
TGGGGAGAGG	3	7	0,158182223637899		
GGGCATCTCT	3	7	0,158182223637899		
TTCACTGTGA	18	11	0,158697724342346		
GCATAATAGG	58	45	0,165265083312988		
TTGGAGATCT	9	4	0,165868918100993		
GCTGCCCTTG	9	4	0,165868918100993		
TGTGTTGAGA	8	13	0,166265726089478		
CCTAGCTGGA	31	39	0,166510542233785		
TCAGATCTTT	25	17	0,171304146448771		
TTGAGGGGGT	1	4	0,177259961764018		
GTGTTAACCA	1	4	0,177259961764018		
TGATAATTCA	1	4	0,177259961764018		
CGGCTGGTGA	1	4	0,177259961764018		

GCAACAGCAA	1	4	0,177259961764018		
CGACTGCACT	1	4	0,177259961764018		
AGGATGTGGG	1	4	0,177259961764018		
GGTAGCCTGG	1	4	0,177259961764018		
CAGTTCTCTG	1	4	0,177259961764018		
TGTCATCACA	1	4	0,177259961764018		
GCAGGGTGGG	1	4	0,177259961764018		
GCCACTACCC	1	4	0,177259961764018		
GTGGTGCACG	1	4	0,177259961764018		
GCCAGGGCGG	1	4	0,177259961764018		
TGGCTGTGTG	1	4	0,177259961764018		
ATGAAACCCC	1	4	0,177259961764018		
CCCAAGCTAG	1	4	0,177259961764018		
CCACTGCAGT	1	4	0,177259961764018		
GGCTGATGTG	1	4	0,177259961764018		
GCCCCCCTTG	1	4	0,177259961764018		
TGTGCCCTGA	1	4	0,177259961764018		
GTGGTGCACA	7	3	0,178167621294657		
TGCCCTCAGG	7	3	0,178167621294657		
AGGTCAGGAG	7	3	0,178167621294657		
AGGGTGTTTT	7	3	0,178167621294657		
TTAACCCCTC	5	9	0,184720357259115		
GATCTCTTGG	5	9	0,184720357259115		
CAATAAATGT	16	10	0,186676184336344		
GCAGCTCAGG	4	8	0,186747550964355		
GCAGCCATCC	41	49	0,190612395604452		
GCGACGAGGC	11	16	0,19381042321523		
AATCCTGTGG	21	14	0,20064103603363		
AGGTCCTAGC	8	12	0,20716671148936		
CTGGGTTAAT	52	41	0,209325234095256		
TCAGTGAACG	4	1	0,211350321769714		
GAGGCTCAAT	4	1	0,211350321769714		
GCTTTATTTG	4	1	0,211350321769714		
TCCCGTACAT	4	1	0,211350321769714		
TGGAAGGGCT	4	1	0,211350321769714		
GCTTCCATCT	4	1	0,211350321769714		
TTGATGCCCG	4	1	0,211350321769714		
CCCCAGCCCC	4	1	0,211350321769714		
CGCCTGTAGT	4	1	0,211350321769714		
CCGCTTCTGC	4	1	0,211350321769714		
TGTAGTTTGA	4	1	0,211350321769714		
GACACCTCCT	4	1	0,211350321769714		
AAGATTGGTG	4	1	0,211350321769714		
GGCACCGTGC	4	1	0,211350321769714		
CCTCTTCAGG	4	1	0,211350321769714		
ATGGCGCAGT	4	1	0,211350321769714		

TGTCGCTGGG	4	1	0,211350321769714		
GCCCCGCCCT	4	1	0,211350321769714		
GTGCCTAGGG	4	1	0,211350321769714		
GATGCTGCCA	4	1	0,211350321769714		
CTCATAAGGA	4	1	0,211350321769714		
GGGAGCCCGG	4	1	0,211350321769714		
TGCTGAATCA	4	1	0,211350321769714		
GATCAGGCCA	4	1	0,211350321769714		
GCACAAGAAG	4	1	0,211350321769714		
CAGCAGAAGC	4	1	0,211350321769714		
AAGACAGTGG	37	28	0,211876551310221		
GGCAAGCCCC	43	50	0,217568039894104		
GAACACATCC	9	5	0,218467156092326		
GGGGGTCACC	3	6	0,220494826634725		
TCCGTGGTTG	3	6	0,220494826634725		
GAGGCCATCC	3	6	0,220494826634725		
GGCTCCCACT	3	6	0,220494826634725		
GGCTTTACCC	3	6	0,220494826634725		
GTGGTGGGCA	3	6	0,220494826634725		
GAGGTCCCTG	3	6	0,220494826634725		
GTGGCGGGTG	3	6	0,220494826634725		
AGTAGGTGGC	8	4	0,221777598063151		
CACCCCTGAT	10	14	0,232192953427633		
ATGGCAGGAG	2	5	0,232975006103516		
GGGGACTGAA	2	5	0,232975006103516		
GTGTGTGGTG	2	5	0,232975006103516		
GCAACGGGCC	2	5	0,232975006103516		
CCCTCCTGGG	2	5	0,232975006103516		
TGCTGGGTGG	2	5	0,232975006103516		
GTGTGATGCT	0	2	0,238976875940959		
GGAAGCTAAG	0	2	0,238976875940959		
GTTTGTGGTT	0	2	0,238976875940959		
GGAAGGGAGG	0	2	0,238976875940959		
GCGGGGCGAG	0	2	0,238976875940959		
GCGGTGAGGG	0	2	0,238976875940959		
GGAGGCGGAG	0	2	0,238976875940959		
CTGTAATCCC	0	2	0,238976875940959		
CTGGTCCTCC	0	2	0,238976875940959		
GCTAATAATG	0	2	0,238976875940959		
GGGAAGTGTG	0	2	0,238976875940959		
GGAAGAGAAG	0	2	0,238976875940959		
CTGCTGCAGG	0	2	0,238976875940959		
CTGGCCAGGC	0	2	0,238976875940959		
GGGAGCCTCA	0	2	0,238976875940959		
GGCCAGGAAG	0	2	0,238976875940959		
GGGAGTAATA	0	2	0,238976875940959		

CTGGCCTGTG	0	2	0,238976875940959		
GGTAGCAGGG	0	2	0,238976875940959		
GGGCAGGGCA	0	2	0,238976875940959		
GGCCGCTGCT	0	2	0,238976875940959		
GGCAACATAG	0	2	0,238976875940959		
GGCTGGTCAC	0	2	0,238976875940959		
GCTGCATCCC	0	2	0,238976875940959		
GGGAAATGA	0	2	0,238976875940959		
CTGCTTTAGG	0	2	0,238976875940959		
CTGCGGTGGC	0	2	0,238976875940959		
GCTTGATGTG	0	2	0,238976875940959		
GGGGAGGGGG	0	2	0,238976875940959		
GCTGAGGGCT	0	2	0,238976875940959		
GGGGCAGCCG	0	2	0,238976875940959		
GCTGTGCCTG	0	2	0,238976875940959		
GGCCAAATCT	0	2	0,238976875940959		
GTAGCAGGTG	0	2	0,238976875940959		
GCCTCCCAGG	0	2	0,238976875940959		
GCCTCACACA	0	2	0,238976875940959		
GCCTAGATAG	0	2	0,238976875940959		
GTGGCAGGAG	0	2	0,238976875940959		
GAGGAAGAAG	0	2	0,238976875940959		
GAGGAAGGCT	0	2	0,238976875940959		
GAGGCCTCAG	0	2	0,238976875940959		
GAGGGATGGC	0	2	0,238976875940959		
GTGCTGGTGC	0	2	0,238976875940959		
GAAATGACCT	0	2	0,238976875940959		
GAGTGGAGGG	0	2	0,238976875940959		
GTACTCCAGT	0	2	0,238976875940959		
GGAGGGACCC	0	2	0,238976875940959		
GCCACCAAGT	0	2	0,238976875940959		
GTGAACCCAC	0	2	0,238976875940959		
GGCTCGGGAT	0	2	0,238976875940959		
GCAGCTCAAA	0	2	0,238976875940959		
GCAAAACCTC	0	2	0,238976875940959		
GTGCCAGCCC	0	2	0,238976875940959		
GCAACAGCCA	0	2	0,238976875940959		
GTGAGCCCAT	0	2	0,238976875940959		
GCAACTTAGA	0	2	0,238976875940959		
GCCGGGCACG	0	2	0,238976875940959		
GTGAGTGCCC	0	2	0,238976875940959		
GCGAGACCCC	0	2	0,238976875940959		
GGTGGATGTG	0	2	0,238976875940959		
GCGACGCGGG	0	2	0,238976875940959		
GGTGGTACAC	0	2	0,238976875940959		
GGTGTGAGCC	0	2	0,238976875940959		

GCCTTTACTG	0	2	0,238976875940959		
GGTTCAAGGC	0	2	0,238976875940959		
GGTTGGGTAG	0	2	0,238976875940959		
GAAAACAGAA	0	2	0,238976875940959		
GCCTTGCTCA	0	2	0,238976875940959		
GTAGCAGGGC	0	2	0,238976875940959		
GGTTTGTGTG	0	2	0,238976875940959		
GCCTCCTCTT	0	2	0,238976875940959		
GAAATGATGA	0	2	0,238976875940959		
GAACGACCTA	0	2	0,238976875940959		
GTACCATCAA	0	2	0,238976875940959		
GAAGTGTGAG	0	2	0,238976875940959		
GTACCCGGAC	0	2	0,238976875940959		
GAATTATACT	0	2	0,238976875940959		
GACAGCCTTA	0	2	0,238976875940959		
GTGGCGACTG	0	2	0,238976875940959		
GGCCAGCCCT	0	2	0,238976875940959		
GTACGTCCCA	0	2	0,238976875940959		
CTGTCCGCTG	0	2	0,238976875940959		
GGCACTGCAG	0	2	0,238976875940959		
CACTCACCT	0	2	0,238976875940959		
TGAACCCAGG	0	2	0,238976875940959		
CAGATTTTGC	0	2	0,238976875940959		
AGAACAAAAC	0	2	0,238976875940959		
TGAATCTGGG	0	2	0,238976875940959		
CACTGTGTTG	0	2	0,238976875940959		
AGAAGACGTT	0	2	0,238976875940959		
TGATGTGATC	0	2	0,238976875940959		
CACTGAGCCA	0	2	0,238976875940959		
ACTGATCTGC	0	2	0,238976875940959		
CACGCAGCCA	0	2	0,238976875940959		
AGAGTTGCTT	0	2	0,238976875940959		
AGATGAGATG	0	2	0,238976875940959		
CACCTGTAAT	0	2	0,238976875940959		
CACCGGACAC	0	2	0,238976875940959		
CCAACCGTGC	0	2	0,238976875940959		
CACTGCATAT	0	2	0,238976875940959		
TCTCAGCCTC	0	2	0,238976875940959		
ACCAGCTCCC	0	2	0,238976875940959		
ACGACAAAGC	0	2	0,238976875940959		
ACGCAGGCGC	0	2	0,238976875940959		
ACGGAACAGG	0	2	0,238976875940959		
ACTAACACCC	0	2	0,238976875940959		
TCGCCACCGC	0	2	0,238976875940959		
TGAAATAAAA	0	2	0,238976875940959		
TCTACTCAGC	0	2	0,238976875940959		

ACTGCGAGGA	0	2	0,238976875940959		
CAGTTACAAA	0	2	0,238976875940959		
CAGTGTATTC	0	2	0,238976875940959		
CAGGCAGGAG	0	2	0,238976875940959		
AGTGCAAGAC	0	2	0,238976875940959		
CAGGAGGCAA	0	2	0,238976875940959		
CAGCCTGGGG	0	2	0,238976875940959		
AGCCATTGTG	0	2	0,238976875940959		
CATCTAAACT	0	2	0,238976875940959		
ATCGTGCGCT	0	2	0,238976875940959		
TGTTTATTGC	0	2	0,238976875940959		
TGGCAAACGT	0	2	0,238976875940959		
ATGATGGCAC	0	2	0,238976875940959		
ATGAGGCAGC	0	2	0,238976875940959		
TGGCCACAAA	0	2	0,238976875940959		
TGGCCAGCTC	0	2	0,238976875940959		
CACACCCATT	0	2	0,238976875940959		
ATGAAACCCT	0	2	0,238976875940959		
TGGAACAGGA	0	2	0,238976875940959		
ATCCACATCG	0	2	0,238976875940959		
TGGGGCTAGG	0	2	0,238976875940959		
ATCACACCAC	0	2	0,238976875940959		
AGGTGCGGGG	0	2	0,238976875940959		
AGTGAGGGGA	0	2	0,238976875940959		
TGGTTGGTGG	0	2	0,238976875940959		
AGGGCCACCT	0	2	0,238976875940959		
CCGTCATCCT	0	2	0,238976875940959		
TGCACCTTGG	0	2	0,238976875940959		
TTAGATCGTT	0	2	0,238976875940959		
CAAGACGGGG	0	2	0,238976875940959		
CAACTGCAAC	0	2	0,238976875940959		
CAACGAAACC	0	2	0,238976875940959		
TGCCTCCCAT	0	2	0,238976875940959		
ATGGCAGGCG	0	2	0,238976875940959		
AGCCTGTTGC	0	2	0,238976875940959		
AGGAGCGGGG	0	2	0,238976875940959		
ATTCACCCCC	0	2	0,238976875940959		
AGCGTCCGGT	0	2	0,238976875940959		
ATGTGCGTGG	0	2	0,238976875940959		
AGCTCTGTAG	0	2	0,238976875940959		
ATGGTGATGG	0	2	0,238976875940959		
AGGAGCCGGG	0	2	0,238976875940959		
CAGTCTCAGT	0	2	0,238976875940959		
CTCTCAAAC	0	2	0,238976875940959		
TACAAAAGTG	0	2	0,238976875940959		
TTGTATTCCA	0	2	0,238976875940959		

CGATGACACT	0	2	0,238976875940959		
CCCTGGTGGG	0	2	0,238976875940959		
CCCTTCAGAT	0	2	0,238976875940959		
TAATGGGAGT	0	2	0,238976875940959		
AACTAACATT	0	2	0,238976875940959		
TTGTGGTTAA	0	2	0,238976875940959		
TTTGGGGCTG	0	2	0,238976875940959		
AAGCTGAGTG	0	2	0,238976875940959		
TATTGACAAC	0	2	0,238976875940959		
TTTGCCTCAG	0	2	0,238976875940959		
AAGATGCACA	0	2	0,238976875940959		
CCGGCAAACG	0	2	0,238976875940959		
TTGGTCCTCC	0	2	0,238976875940959		
AAGCTCCCTG	0	2	0,238976875940959		
TAGTTTGTGG	0	2	0,238976875940959		
TTTGAATCAG	0	2	0,238976875940959		
AAGCAGAAGG	0	2	0,238976875940959		
CCAAGGAATG	0	2	0,238976875940959		
CGGCCAGCC	0	2	0,238976875940959		
CGGCCAAACG	0	2	0,238976875940959		
CCTCCAGCAG	0	2	0,238976875940959		
CGGAGCCGGC	0	2	0,238976875940959		
CGCGCCCGGC	0	2	0,238976875940959		
CCTGGAGCAA	0	2	0,238976875940959		
CCTGTCCTGC	0	2	0,238976875940959		
TTTAACTGAC	0	2	0,238976875940959		
CTCAGCCTGA	0	2	0,238976875940959		
CCACCACACT	0	2	0,238976875940959		
CCACGGCACT	0	2	0,238976875940959		
ACAGGCTACG	0	2	0,238976875940959		
AACTGCCTG	0	2	0,238976875940959		
CCATTGCAGT	0	2	0,238976875940959		
CCCATCGCTC	0	2	0,238976875940959		
TCAGTTTGGGA	0	2	0,238976875940959		
AAAAGAGTGG	0	2	0,238976875940959		
TCAGGGAGAT	0	2	0,238976875940959		
AACACACAGA	0	2	0,238976875940959		
CCCCGCCAGG	0	2	0,238976875940959		
TCACCCAGGG	0	2	0,238976875940959		
TTGGTCCCCT	0	2	0,238976875940959		
CGTTCCTGG	0	2	0,238976875940959		
CCCCTCACCC	0	2	0,238976875940959		
CCCCCACAG	0	2	0,238976875940959		
AATGATGGGG	0	2	0,238976875940959		
TAATAAATGT	0	2	0,238976875940959		
CCCCCTCCGG	0	2	0,238976875940959		

CTGACCTGTG	11	15	0,24220343430837		
GGTCCAGTGT	4	7	0,2471577723821		
TAATGGTAAC	5	2	0,248938878377279		
ATGGCGATCT	5	2	0,248938878377279		
AACTAACAAA	5	2	0,248938878377279		
AGGTCTGCCA	5	2	0,248938878377279		
TGGTACACGT	5	2	0,248938878377279		
GTAAGTGTAC	5	2	0,248938878377279		
CTGGGAGAGG	5	2	0,248938878377279		
GGTTGGCAGG	5	2	0,248938878377279		
GTTTGGCAGT	5	2	0,248938878377279		
ATTTGTCCCA	5	2	0,248938878377279		
ACAGTGGGGA	5	2	0,248938878377279		
GAGAACCGTA	5	2	0,248938878377279		
AAGAAGATAG	5	2	0,248938878377279		
CCCCAGCCAG	30	23	0,25179918607076		
ACTGGGGAAT	2	0	0,256885170936584		
GCGGTGGGTT	2	0	0,256885170936584		
AGGCTGAGGC	2	0	0,256885170936584		
AATGCTTTGT	2	0	0,256885170936584		
AACCAGAATG	2	0	0,256885170936584		
AGGGCCGACT	2	0	0,256885170936584		
ACTCCCTCCT	2	0	0,256885170936584		
AATGTGAGTC	2	0	0,256885170936584		
AGCCGAGATT	2	0	0,256885170936584		
AAAGTCTAGA	2	0	0,256885170936584		
AATAAACGG	2	0	0,256885170936584		
GCTTTTAAGG	2	0	0,256885170936584		
AATCAATTA	2	0	0,256885170936584		
AGTCTGCTGG	2	0	0,256885170936584		
GGCCCGAGTT	2	0	0,256885170936584		
ACCATTGGAT	2	0	0,256885170936584		
GCCCATGGA	2	0	0,256885170936584		
AGCAAGCAAG	2	0	0,256885170936584		
AGCCTCGGGC	2	0	0,256885170936584		
AGCGTCGATG	2	0	0,256885170936584		
ACTAACTGTG	2	0	0,256885170936584		
AGCTGTCGTA	2	0	0,256885170936584		
GCTCACACCA	2	0	0,256885170936584		
AACTAATACT	2	0	0,256885170936584		
AGCTGTTTCT	2	0	0,256885170936584		
GCTGGCCTTG	2	0	0,256885170936584		
AGCAGGTCAG	2	0	0,256885170936584		
AGGCAAGATA	2	0	0,256885170936584		
AGATTACTGA	2	0	0,256885170936584		
GCTAAGGAGA	2	0	0,256885170936584		

GCGTGAGTGC	2	0	0,256885170936584		
GCTGCGCAGA	2	0	0,256885170936584		
AAGTGAAACA	2	0	0,256885170936584		
AAGTTTATAG	2	0	0,256885170936584		
AGAGCAAACC	2	0	0,256885170936584		
AACTCCCAGT	2	0	0,256885170936584		
AAGCCAGCCC	2	0	0,256885170936584		
CCATTTTTAC	2	0	0,256885170936584		
CCGCGTCCCT	2	0	0,256885170936584		
GAAATAAAGT	2	0	0,256885170936584		
CCCTGAAGAG	2	0	0,256885170936584		
CCCGTAATCC	2	0	0,256885170936584		
CCCCTGCACT	2	0	0,256885170936584		
CCCCCTCGTG	2	0	0,256885170936584		
GAATGTCCTT	2	0	0,256885170936584		
ATTGCGCCAC	2	0	0,256885170936584		
GACCAGCTGG	2	0	0,256885170936584		
CCGCTGTACT	2	0	0,256885170936584		
CCAGTGCACT	2	0	0,256885170936584		
CCAGGGCAAC	2	0	0,256885170936584		
CCAATGCACG	2	0	0,256885170936584		
GAGGCGTCCA	2	0	0,256885170936584		
CATTTGGGTC	2	0	0,256885170936584		
CATTTAGATT	2	0	0,256885170936584		
CATTGAAGGG	2	0	0,256885170936584		
GAGGGCCGTG	2	0	0,256885170936584		
GACAAGATGC	2	0	0,256885170936584		
CTGGGACTGA	2	0	0,256885170936584		
CTCTAAGAAG	2	0	0,256885170936584		
CTGAGGCCTG	2	0	0,256885170936584		
CTATTGAATG	2	0	0,256885170936584		
CTAGTCCCAT	2	0	0,256885170936584		
CTGCTGCACT	2	0	0,256885170936584		
CTGGCAGATT	2	0	0,256885170936584		
CTGGCCCTCG	2	0	0,256885170936584		
CTGGCCGACT	2	0	0,256885170936584		
CTTGCAAACC	2	0	0,256885170936584		
CGTGAACAAT	2	0	0,256885170936584		
CTTCTGTGTA	2	0	0,256885170936584		
CCTGAGGGTA	2	0	0,256885170936584		
CCTCCACACT	2	0	0,256885170936584		
CTGTGAGACC	2	0	0,256885170936584		
CCTCACTTTC	2	0	0,256885170936584		
CTGTGCTCGG	2	0	0,256885170936584		
GGCCCGGCTT	2	0	0,256885170936584		
CCGGAAACAC	2	0	0,256885170936584		

GATTTGTGTT	2	0	0,256885170936584		
CGTGCTGGCC	2	0	0,256885170936584		
ATGACTGTAC	2	0	0,256885170936584		
CATCTGTGAG	2	0	0,256885170936584		
ATGGTGCCAC	2	0	0,256885170936584		
ATGGTGACA	2	0	0,256885170936584		
ATGGTCAGTA	2	0	0,256885170936584		
ATGGGCACTG	2	0	0,256885170936584		
ATGGCCATAG	2	0	0,256885170936584		
ATGGCAGCTG	2	0	0,256885170936584		
ATGCGGAGTC	2	0	0,256885170936584		
ATGTGAAACT	2	0	0,256885170936584		
GCCTGATATT	2	0	0,256885170936584		
ATTACACCAC	2	0	0,256885170936584		
ATGAACAGCG	2	0	0,256885170936584		
GCCTTGATCT	2	0	0,256885170936584		
ATCGTTGTAA	2	0	0,256885170936584		
ATCCGACCCA	2	0	0,256885170936584		
ATCAAGAATC	2	0	0,256885170936584		
ATACTGTCAG	2	0	0,256885170936584		
ATACATACTG	2	0	0,256885170936584		
ATAAAGTAAC	2	0	0,256885170936584		
ATGCAGCCAT	2	0	0,256885170936584		
GCAGGGGTTA	2	0	0,256885170936584		
AGTGTCCGGC	2	0	0,256885170936584		
CAGCCCCAAA	2	0	0,256885170936584		
CAGCCATAAA	2	0	0,256885170936584		
CAGCCAGGGG	2	0	0,256885170936584		
CAGAAGTGTC	2	0	0,256885170936584		
GCACCTATTG	2	0	0,256885170936584		
GCAGAAAATT	2	0	0,256885170936584		
CACTCTATCC	2	0	0,256885170936584		
GCCGCCCTGC	2	0	0,256885170936584		
CACCTGTAGT	2	0	0,256885170936584		
GATTCAACCA	2	0	0,256885170936584		
GCATAATAAG	2	0	0,256885170936584		
CACAAAATCT	2	0	0,256885170936584		
GCATTTCAGG	2	0	0,256885170936584		
CAAGTGCAA	2	0	0,256885170936584		
GCCAGACCCC	2	0	0,256885170936584		
CAACTTAGTT	2	0	0,256885170936584		
CAAAAGGCTC	2	0	0,256885170936584		
ATTGGCTTAA	2	0	0,256885170936584		
GCAGGAGTAG	2	0	0,256885170936584		
TTAGACATTA	2	0	0,256885170936584		
TTTTACCAA	2	0	0,256885170936584		

TGGATCCTCG	2	0	0,256885170936584		
TACTAGTCCT	2	0	0,256885170936584		
TACGTCCACG	2	0	0,256885170936584		
TACCTGCAGT	2	0	0,256885170936584		
GTAACACTTG	2	0	0,256885170936584		
GGTGAAGAGG	2	0	0,256885170936584		
TACCCCGGAG	2	0	0,256885170936584		
GGTGAAGACA	2	0	0,256885170936584		
TACCAAGACC	2	0	0,256885170936584		
GTCCCGGGCA	2	0	0,256885170936584		
TTACCTTTTT	2	0	0,256885170936584		
TACATCCGAA	2	0	0,256885170936584		
TACAGCACGG	2	0	0,256885170936584		
GTCTTCTCTG	2	0	0,256885170936584		
TTAGCAGTTG	2	0	0,256885170936584		
TTTTATCTGG	2	0	0,256885170936584		
GCAGGTCAGC	2	0	0,256885170936584		
TGCTTTTAAA	2	0	0,256885170936584		
TTCATTGTAG	2	0	0,256885170936584		
GGGCTCACCT	2	0	0,256885170936584		
GGGCTGGACG	2	0	0,256885170936584		
GGCCCTCTGA	2	0	0,256885170936584		
TTGGCCAGAG	2	0	0,256885170936584		
TTCACGGATT	2	0	0,256885170936584		
TAATTTTGGGA	2	0	0,256885170936584		
GGGGCTTAGG	2	0	0,256885170936584		
GGGGGAGAAG	2	0	0,256885170936584		
GGGGGTCGGG	2	0	0,256885170936584		
TATTTACCG	2	0	0,256885170936584		
TATCTGTCTA	2	0	0,256885170936584		
TATCCAGAA	2	0	0,256885170936584		
TCAACTGAAG	2	0	0,256885170936584		
TGTGGTGGTG	2	0	0,256885170936584		
GTTTCCAGGT	2	0	0,256885170936584		
TGGGGACTGG	2	0	0,256885170936584		
TTTCAGAGAG	2	0	0,256885170936584		
GTTCTGGGCG	2	0	0,256885170936584		
TTGTCCAGAG	2	0	0,256885170936584		
TTAAATTATA	2	0	0,256885170936584		
GTCTTCTTAA	2	0	0,256885170936584		
TTTACCTGCC	2	0	0,256885170936584		
GTGAGGGCTA	2	0	0,256885170936584		
TTGTGATTAA	2	0	0,256885170936584		
GTGGCGGGCT	2	0	0,256885170936584		
TGTTTGAAGA	2	0	0,256885170936584		
TTGTGCACGT	2	0	0,256885170936584		

TGTTGTGCGC	2	0	0,256885170936584		
TGTTCCACTC	2	0	0,256885170936584		
TTTATAACTA	2	0	0,256885170936584		
TTTCCCATCC	2	0	0,256885170936584		
TTGGGCAGGC	2	0	0,256885170936584		
TAATTCTTCT	2	0	0,256885170936584		
TAAGCAGATG	2	0	0,256885170936584		
TGGCGTACGG	2	0	0,256885170936584		
TGGCGTGGCC	2	0	0,256885170936584		
TAAGAACTGG	2	0	0,256885170936584		
GTTTGAAGGG	2	0	0,256885170936584		
GTGAAGCCCA	2	0	0,256885170936584		
TAAATAATTT	2	0	0,256885170936584		
GTGAAGCTGA	2	0	0,256885170936584		
TGGCTAAATG	2	0	0,256885170936584		
TAAATTCACC	2	0	0,256885170936584		
TTCCACACC	2	0	0,256885170936584		
TTACAAAGGC	2	0	0,256885170936584		
GTGAGGGCAC	2	0	0,256885170936584		
GTCTTTAGGA	2	0	0,256885170936584		
TTTCTAGGGG	2	0	0,256885170936584		
GGCTCTGCCA	2	0	0,256885170936584		
TCCCCGTAAT	2	0	0,256885170936584		
TTTTGTTTTT	2	0	0,256885170936584		
GGGAAACCCT	2	0	0,256885170936584		
TTCTCTACAC	2	0	0,256885170936584		
TGCTTGCGCA	2	0	0,256885170936584		
GGGAGGATTA	2	0	0,256885170936584		
TCTGCTTACA	2	0	0,256885170936584		
GGGAGGGAAG	2	0	0,256885170936584		
TCTGGACCGG	2	0	0,256885170936584		
TTGCTCACAA	2	0	0,256885170936584		
GGGATCGCCC	2	0	0,256885170936584		
TCTGTTATTG	2	0	0,256885170936584		
TCTCCTCCTT	2	0	0,256885170936584		
TGAAGACTCA	2	0	0,256885170936584		
TGAAGGTTTT	2	0	0,256885170936584		
GGGCCCCAAA	2	0	0,256885170936584		
TCAGCCTTCT	2	0	0,256885170936584		
TCAGCACCTG	2	0	0,256885170936584		
TGACGTCAGC	2	0	0,256885170936584		
GATGACCCCC	5	8	0,269789020220439		
ATCACGCCCT	6	9	0,287378311157227		
AACCCGGGAG	21	16	0,295007427533468		
CTGTACAGAC	9	12	0,295214136441549		
CCCCCTGCAG	6	3	0,297230402628581		

GTGGCGGGCG	6	3	0,297230402628581		
ACCTCAGGAA	6	3	0,297230402628581		
ATGAGCTGAC	1	3	0,299292842547099		
AGCTGGTTTC	1	3	0,299292842547099		
CGATTCTGGA	1	3	0,299292842547099		
GTGAAACTCC	1	3	0,299292842547099		
AAAGCACAAG	1	3	0,299292842547099		
GTCTACTCCT	1	3	0,299292842547099		
GTAATCCTGC	1	3	0,299292842547099		
CGATGGTCCC	1	3	0,299292842547099		
GTGGCCAGAG	1	3	0,299292842547099		
GGAAGATGAA	1	3	0,299292842547099		
GAGCGGCCTC	1	3	0,299292842547099		
GGCTGTACCC	1	3	0,299292842547099		
AGAACCTTCA	1	3	0,299292842547099		
TTCTGTGCTG	1	3	0,299292842547099		
GGCTGGGCCT	1	3	0,299292842547099		
CGCAAGCTGG	1	3	0,299292842547099		
TGATGCCTCC	1	3	0,299292842547099		
TTGCGGAGCC	1	3	0,299292842547099		
GGCCGGGGGC	1	3	0,299292842547099		
AGTTTCTTGT	1	3	0,299292842547099		
GAGCGGGATG	1	3	0,299292842547099		
GATTTTGTAG	1	3	0,299292842547099		
GACATCGAGG	1	3	0,299292842547099		
GCAAGACCCC	1	3	0,299292842547099		
CTCCTGAAGG	1	3	0,299292842547099		
CAGGAACGGG	1	3	0,299292842547099		
TGAAGGAGCC	1	3	0,299292842547099		
CACCACGGTG	1	3	0,299292842547099		
GTGCCTAGGA	1	3	0,299292842547099		
TGGGGGCCGA	1	3	0,299292842547099		
GGAATGTCA	1	3	0,299292842547099		
AGCCACTGCG	1	3	0,299292842547099		
TGCTGTGTGC	1	3	0,299292842547099		
CCTGGCTAAT	1	3	0,299292842547099		
GCGACGGCCG	1	3	0,299292842547099		
TATGTGATTT	1	3	0,299292842547099		
CCTGGTCCCA	1	3	0,299292842547099		
GGAGGTTGAG	1	3	0,299292842547099		
TCACCCACAC	13	9	0,307191093762716		
GCCTGCTGGG	11	14	0,307621439297994		
TGCATCTGGT	11	14	0,307621439297994		
GTGCTGAATG	19	22	0,313201824824015		
TACCATCAAT	31	26	0,315662781397502		
GTGGCAGGCA	9	6	0,317460815111796		

CTTGAGCAAT	3	1	0,331437826156616		
GCTCACTGCA	3	1	0,331437826156616		
TCTGTGCTCA	3	1	0,331437826156616		
AGCTGGAGTC	3	1	0,331437826156616		
TGTCCTGGTT	3	1	0,331437826156616		
ACTCCAAAAA	3	1	0,331437826156616		
GTGCTGCGTG	3	1	0,331437826156616		
AGTAGCCGTG	3	1	0,331437826156616		
TTTCCTCTCA	3	1	0,331437826156616		
AGCCACCACA	3	1	0,331437826156616		
GTGAAACCTT	3	1	0,331437826156616		
TCATTGTAAT	3	1	0,331437826156616		
GTGAGACCTC	3	1	0,331437826156616		
ACCTTGTAAT	3	1	0,331437826156616		
CCGTAGTGCC	3	1	0,331437826156616		
TGCAATATGG	3	1	0,331437826156616		
TCTGTGCTCC	3	1	0,331437826156616		
TTTTGGGGGC	3	1	0,331437826156616		
GCTTGCTGGC	3	1	0,331437826156616		
AAGTTTGCCT	3	1	0,331437826156616		
TGATTTCACT	3	1	0,331437826156616		
TCAACGGTGT	3	1	0,331437826156616		
CTGGAGGCTG	3	1	0,331437826156616		
TTCGGGTGTG	3	1	0,331437826156616		
CCGGCCCTAC	3	1	0,331437826156616		
GTTGGTCTGT	3	1	0,331437826156616		
AGCAAAGTGA	3	1	0,331437826156616		
AGCCACTGCA	3	1	0,331437826156616		
GGAAGCCCAC	3	1	0,331437826156616		
CGCCTGTAAT	3	1	0,331437826156616		
TACCAGTGTA	3	1	0,331437826156616		
TTGTTATATT	3	1	0,331437826156616		
GTCTCACGTG	3	1	0,331437826156616		
AAAGTGCATC	3	1	0,331437826156616		
TAGGCCCAAG	3	1	0,331437826156616		
ACTGGAGTTT	3	1	0,331437826156616		
TGCCTGCACC	3	1	0,331437826156616		
TGTGTGTGTG	3	1	0,331437826156616		
CGGAGGTGGG	3	1	0,331437826156616		
CCACGAGGTG	3	1	0,331437826156616		
GGGGATGGGG	3	1	0,331437826156616		
TGGCTAGTGT	3	1	0,331437826156616		
GCTGAACGCG	3	1	0,331437826156616		
TCGTAACGAG	3	1	0,331437826156616		
ACAAACTGTG	3	1	0,331437826156616		
TGCTTCATCT	3	1	0,331437826156616		

CCAGCCTGGG	3	1	0,331437826156616		
AGGGGCGCAG	3	1	0,331437826156616		
CTTTGATCAG	3	1	0,331437826156616		
GGGTTGGCTT	26	21	0,332412441571554		
GCGAGCAGCG	3	5	0,336739897727966		
GTGGCAGGCG	3	5	0,336739897727966		
GGTGAGACAC	3	5	0,336739897727966		
GTCACACCAC	3	5	0,336739897727966		
GAGAAACCT	3	5	0,336739897727966		
CCTGGAAGAG	3	5	0,336739897727966		
GGTGGTGTCT	13	16	0,338074723879496		
ATGTGTAACG	2	4	0,339508454004924		
TGGTTTTGGC	2	4	0,339508454004924		
GTGGTGGCAG	2	4	0,339508454004924		
GCTGCTGCGC	2	4	0,339508454004924		
CTTCCAGCTA	2	4	0,339508454004924		
GTGGTGGACA	2	4	0,339508454004924		
GTGCTTGTAC	2	4	0,339508454004924		
TCAGTTTGTC	2	4	0,339508454004924		
CAATAAACTG	2	4	0,339508454004924		
GACTCACTTT	2	4	0,339508454004924		
CCTCAGGATA	2	4	0,339508454004924		
GTA AACCCC	2	4	0,339508454004924		
ATTGTGCCAC	2	4	0,339508454004924		
TTACCTCCTT	2	4	0,339508454004924		
TAACTTGTGA	2	4	0,339508454004924		
TAACCAATCA	2	4	0,339508454004924		
GCGGCTTTCC	2	4	0,339508454004924		
ATCGTGGCGG	2	4	0,339508454004924		
GTTTTCCATA	2	4	0,339508454004924		
GTGATGGTGT	2	4	0,339508454004924		
GGAATGTACG	8	5	0,34229322274526		
ACCTGTATCC	8	5	0,34229322274526		
AAGGAGATGG	8	5	0,34229322274526		
CCCTGGGTTC	8	5	0,34229322274526		
GTGCACTGAG	38	32	0,344637473424276		
CTAGCCTCAC	10	7	0,355222940444946		
CTGTTGGTGA	10	7	0,355222940444946		
GAAATACAGT	10	7	0,355222940444946		
GCCTGGGCTG	4	2	0,357123295466105		
AGCCACCGCG	4	2	0,357123295466105		
AACTTGGAG	4	2	0,357123295466105		
TTATGGGGAG	4	2	0,357123295466105		
ACGCAGGGAG	4	2	0,357123295466105		
GCTCTGGCCG	4	2	0,357123295466105		
ATGGATGCAC	4	2	0,357123295466105		

TGGGGATTAC	4	2	0,357123295466105		
GCAGATCGGG	4	2	0,357123295466105		
CCACTCCTCA	4	2	0,357123295466105		
ACTTTCCAAA	4	2	0,357123295466105		
TTGGCTAGGC	4	2	0,357123295466105		
TCTGTCAAGA	4	2	0,357123295466105		
GAGTCTGAGG	4	2	0,357123295466105		
AATACCTCGT	4	2	0,357123295466105		
ACCCTTGGCC	4	2	0,357123295466105		
CTCCCTTGCC	4	2	0,357123295466105		
AGCTGTTCTG	4	2	0,357123295466105		
GGGTCTGCGG	4	2	0,357123295466105		
AGGAAAGCTG	36	31	0,358726541201274		
TTTGGTTTTTC	7	9	0,361765185991923		
TGCCTCTGCG	7	9	0,361765185991923		
CCACCGCACT	4	6	0,366774121920268		
CGGTTACTGT	4	6	0,366774121920268		
GTGAAACCTC	4	6	0,366774121920268		
GTGGCACACG	4	6	0,366774121920268		
GGCTGGGGGC	29	32	0,367294152577718		
TTAACGGCC	8	10	0,368606249491374		
CAGCGCGCCC	8	10	0,368606249491374		
GTGGCAGGTG	8	10	0,368606249491374		
AACCCAGGAG	8	10	0,368606249491374		
ACCAAAAACC	8	10	0,368606249491374		
CTCCTCACCT	11	13	0,368669271469116		
CAATGTGTTA	5	3	0,369920134544373		
ACCGCCTGTG	5	3	0,369920134544373		
GTGGGTTGGC	5	3	0,369920134544373		
TGCTGCCTGT	5	3	0,369920134544373		
TGCAGGCCTG	5	3	0,369920134544373		
CCGTGCTCAT	5	3	0,369920134544373		
GGTGGCACTC	5	3	0,369920134544373		
ACTGGGTCTA	5	3	0,369920134544373		
GATGAGTCTC	5	3	0,369920134544373		
GGTTTGGCTT	5	3	0,369920134544373		
GCGACAGCTC	11	8	0,370485583941142		
TGTTCTGGAG	5	7	0,374041597048442		
GAAATAAAGC	5	7	0,374041597048442		
CCTCCAGCTA	33	28	0,375143607457479		
TTGGTCCTCT	62	55	0,379896243413289		
AGGGCTTCCA	32	34	0,380946516990662		
TGGCCCCAGG	9	11	0,381047646204631		
GTGCTGGACC	9	11	0,381047646204631		
GAGGGAGTTT	50	44	0,381519198417664		
TTACCATATC	12	9	0,385649085044861		

CTAAGACTTC	14	11	0,392049272855123		
GGGGAAATCG	6	8	0,39255424340566		
GCCTCCTCCC	6	8	0,39255424340566		
ATGTGAAGAG	16	18	0,396258672078451		
TTGGCAGCCC	8	6	0,396840294202169		
GCCTTCCAAT	8	6	0,396840294202169		
TAGGTTGTCT	62	63	0,405499180157979		
GTGAAACCCC	73	66	0,40831716855367		
TAAGGAGCTG	21	23	0,413056294123332		
GTGGTACAGG	6	4	0,413472175598145		
TGTGCTCGGG	6	4	0,413472175598145		
TTGCCAGGC	6	4	0,413472175598145		
AGCCACCGCA	6	4	0,413472175598145		
TTGGCCAGGA	6	4	0,413472175598145		
CAAACCATCC	6	4	0,413472175598145		
CGCTGGTTCC	21	18	0,436294237772624		
GTGTGGGGGG	9	7	0,441111127535502		
GCGAAACCCC	9	7	0,441111127535502		
Compared	7344	7008	0,441246143349078		
CCAGAACAGA	23	24	0,452588041623433		
GGATTTGGCC	48	44	0,453325112660726		
TTGGTCAGGC	11	12	0,454665740331014		
AACGCGGCCA	11	12	0,454665740331014		
TAGGACAACCT	4	5	0,457420786221822		
ATCAAGGGTG	4	5	0,457420786221822		
TCGAAGCCCC	4	5	0,457420786221822		
GCTGCTCCCT	4	5	0,457420786221822		
GGGACGAGTG	4	5	0,457420786221822		
GGAGGCTGAG	4	5	0,457420786221822		
GACCGCAGGA	4	5	0,457420786221822		
GTGGCGTGCA	4	5	0,457420786221822		
CAGGAGACCC	4	5	0,457420786221822		
CGCCGGAACA	4	5	0,457420786221822		
TGATGTCTGG	4	5	0,457420786221822		
ATGGCACGGA	4	5	0,457420786221822		
CCCCCTGGAT	7	8	0,459109266599019		
GGGAAGCAGA	7	8	0,459109266599019		
TGTGATCAGA	7	8	0,459109266599019		
CACTTGCCCT	7	8	0,459109266599019		
GTACTGTATG	1	2	0,463372826576233		
ATGGCGACTG	1	2	0,463372826576233		
CCCCGATCTT	1	2	0,463372826576233		
TCACAACTT	1	2	0,463372826576233		
CCCGCCTCTT	1	2	0,463372826576233		
TCACCGGTCA	1	2	0,463372826576233		
GTAGGAGCTG	1	2	0,463372826576233		

CCCTGCCTTG	1	2	0,463372826576233		
AACAGATATT	1	2	0,463372826576233		
AGAGGTGGTG	1	2	0,463372826576233		
TTAGCCGGGA	1	2	0,463372826576233		
TTCATAGCTG	1	2	0,463372826576233		
CCTTTGAACA	1	2	0,463372826576233		
TGGCAAGATG	1	2	0,463372826576233		
ATGGCGGGCA	1	2	0,463372826576233		
TGGATCCTAG	1	2	0,463372826576233		
GGTGACAGAG	1	2	0,463372826576233		
CCTGCATCCC	1	2	0,463372826576233		
AATGGGAGTT	1	2	0,463372826576233		
GCGACCGTCA	1	2	0,463372826576233		
TAGAAGCCAA	1	2	0,463372826576233		
TGGAGCAGTT	1	2	0,463372826576233		
TAGGCTGTCT	1	2	0,463372826576233		
CCGAAGGAGA	1	2	0,463372826576233		
GAGAAGGCAG	1	2	0,463372826576233		
GCTCCGAGCG	1	2	0,463372826576233		
TTTTACCAGT	1	2	0,463372826576233		
CCGGGGAGCA	1	2	0,463372826576233		
GCGTCTGGGG	1	2	0,463372826576233		
AACAGCAGGC	1	2	0,463372826576233		
CCAGGCACTG	1	2	0,463372826576233		
CCTGTGATCC	1	2	0,463372826576233		
CCTGAGCCCG	1	2	0,463372826576233		
TGGAGAGCAA	1	2	0,463372826576233		
TGAACTTACA	1	2	0,463372826576233		
AAACCTGGGA	1	2	0,463372826576233		
CAACGTCTTG	1	2	0,463372826576233		
GGAGTCCTAG	1	2	0,463372826576233		
CAGGTTTCAT	1	2	0,463372826576233		
ACAGTGCTTG	1	2	0,463372826576233		
CAGGGGAGTG	1	2	0,463372826576233		
TTCTGCACTG	1	2	0,463372826576233		
CAGGACAGTT	1	2	0,463372826576233		
TTGAATTCCC	1	2	0,463372826576233		
AAACATCCTA	1	2	0,463372826576233		
GGCAAGGGGG	1	2	0,463372826576233		
GGCTGAGAAT	1	2	0,463372826576233		
GGGCAGCTGG	1	2	0,463372826576233		
CAAGTTAGTG	1	2	0,463372826576233		
GGCTTGCCAG	1	2	0,463372826576233		
GGCAGAGGGC	1	2	0,463372826576233		
GGCAGCGCCC	1	2	0,463372826576233		
GGCTCCTGGC	1	2	0,463372826576233		

ACTTGTTCCGC	1	2	0,463372826576233		
TGACCCACACA	1	2	0,463372826576233		
TGATGTTCCA	1	2	0,463372826576233		
TGACCTCCAG	1	2	0,463372826576233		
TGAGCCCGGC	1	2	0,463372826576233		
ACATCATACT	1	2	0,463372826576233		
ACATCGTAGG	1	2	0,463372826576233		
TGATGTCTCC	1	2	0,463372826576233		
CACAACCTCC	1	2	0,463372826576233		
CAAGGGCTTG	1	2	0,463372826576233		
GGAATATGCA	1	2	0,463372826576233		
TCAGATGGCG	1	2	0,463372826576233		
GCTGGGGGAC	1	2	0,463372826576233		
AAAGTGGCTA	1	2	0,463372826576233		
TCATAACTGT	1	2	0,463372826576233		
TGCTGGTGTG	1	2	0,463372826576233		
TCCAGAATAA	1	2	0,463372826576233		
ATGTGGCACA	1	2	0,463372826576233		
CGGACTCACT	1	2	0,463372826576233		
AGAAGCACTG	1	2	0,463372826576233		
ACACTACGGG	1	2	0,463372826576233		
ACCCACTGTG	1	2	0,463372826576233		
ACACTTCACC	1	2	0,463372826576233		
TCTCGGTAGC	1	2	0,463372826576233		
GGGAAGGCAC	1	2	0,463372826576233		
CAGTGTTGGG	1	2	0,463372826576233		
GGAGCACTGT	1	2	0,463372826576233		
GGAGCGTGGG	1	2	0,463372826576233		
TCCTAGCCTG	1	2	0,463372826576233		
CCACACCGGT	1	2	0,463372826576233		
CCAATGCACT	1	2	0,463372826576233		
ATTCCTTGA	1	2	0,463372826576233		
ACAGGGTGAC	1	2	0,463372826576233		
ACAGTCTTGC	1	2	0,463372826576233		
TGCCACCACA	1	2	0,463372826576233		
CAAACCTAACC	1	2	0,463372826576233		
TCGGGAGCTG	1	2	0,463372826576233		
GGGAAACCCC	1	2	0,463372826576233		
GCTGGGAGGG	1	2	0,463372826576233		
GGAAATTGTC	1	2	0,463372826576233		
GCACCTCAGC	1	2	0,463372826576233		
GTGCTGGAGA	1	2	0,463372826576233		
GATGAACTGA	1	2	0,463372826576233		
GTGGCGCACA	1	2	0,463372826576233		
ACTAATCGTT	1	2	0,463372826576233		
GTGTCCCTGT	1	2	0,463372826576233		

TTAATATGTG	1	2	0,463372826576233		
TAAACCGGAA	1	2	0,463372826576233		
CTGAGCACAA	1	2	0,463372826576233		
GAGGCCAGTG	1	2	0,463372826576233		
TTGTCCAGGC	1	2	0,463372826576233		
AGGTCCAAAG	1	2	0,463372826576233		
ACGAAACCT	1	2	0,463372826576233		
CTCGGAGGCC	1	2	0,463372826576233		
ATCTTGCTC	1	2	0,463372826576233		
CTCCCGCGA	1	2	0,463372826576233		
CTGCTGTGAT	1	2	0,463372826576233		
GCAGGCGGCT	1	2	0,463372826576233		
GTGACAGAAG	1	2	0,463372826576233		
GATCTCGCAA	1	2	0,463372826576233		
GTGCCCTGTT	1	2	0,463372826576233		
AAGCCGGCCC	1	2	0,463372826576233		
CTGGATGGGC	1	2	0,463372826576233		
GATTGGGGAT	1	2	0,463372826576233		
AATAAAGGCT	1	2	0,463372826576233		
GTGCTAAGCG	1	2	0,463372826576233		
GATGGGGCTG	1	2	0,463372826576233		
AGGACAATGC	1	2	0,463372826576233		
TGGGGGCACC	1	2	0,463372826576233		
GTGGCGGTTG	1	2	0,463372826576233		
AGGCCAAGGG	1	2	0,463372826576233		
CTGCCCTGGG	1	2	0,463372826576233		
GACAGTGACG	1	2	0,463372826576233		
AAGCTGGAGG	1	2	0,463372826576233		
ATCCGGCGCC	1	2	0,463372826576233		
GCAAGAATTT	1	2	0,463372826576233		
AGGCCAACAG	1	2	0,463372826576233		
GTGCTGATTC	1	2	0,463372826576233		
TGGCTCCTCC	1	2	0,463372826576233		
TGGGCTGGGG	1	2	0,463372826576233		
GTGGAACCCC	1	2	0,463372826576233		
AGTGACAGAG	1	2	0,463372826576233		
AGGAGCAAAG	1	2	0,463372826576233		
GTGCTGGTCA	1	2	0,463372826576233		
CGTGGGTGGG	1	2	0,463372826576233		
GTGAAAACCT	1	2	0,463372826576233		
GTGGTGAATG	1	2	0,463372826576233		
GAGTCAGCAT	1	2	0,463372826576233		
GAAGATGTGT	1	2	0,463372826576233		
CTAACGCAGC	1	2	0,463372826576233		
GAGGGTGGCG	1	2	0,463372826576233		
TAATCCTCAA	1	2	0,463372826576233		

TACAATAAAC	1	2	0,463372826576233		
TTGCAATGCA	1	2	0,463372826576233		
AAGCGGGACC	1	2	0,463372826576233		
GAGGCTGAGG	1	2	0,463372826576233		
TGTGCTGTGC	1	2	0,463372826576233		
GTGGGGGGGA	1	2	0,463372826576233		
AGGGAGACCT	1	2	0,463372826576233		
GTGGGGGGAG	1	2	0,463372826576233		
AGGTCCTGT	1	2	0,463372826576233		
CTGTTGCTGG	1	2	0,463372826576233		
TAACAGCCAG	1	2	0,463372826576233		
TTAAGAGGGA	1	2	0,463372826576233		
GTGACAACAC	1	2	0,463372826576233		
GATAGTTGTG	1	2	0,463372826576233		
ATGAACCGCA	1	2	0,463372826576233		
GAGTGGGGGC	1	2	0,463372826576233		
GAGATCCGCA	1	2	0,463372826576233		
TTACTGGA	1	2	0,463372826576233		
CTCAACATCT	1	2	0,463372826576233		
CTCACCTAAG	1	2	0,463372826576233		
GGAACAAACA	5	6	0,466454029083252		
ATCGGGCCCG	5	6	0,466454029083252		
CCACTGCACC	5	6	0,466454029083252		
AGCTCTCCCT	19	20	0,468327681223551		
TGGTGTGAG	13	11	0,472629189491272		
TACCCTAAAA	6	7	0,473648111025492		
GGCCAGGGG	6	7	0,473648111025492		
ACTGGTACGT	6	7	0,473648111025492		
CAAGCATCCC	8	9	0,474509557088216		
AGCACCTCCA	40	37	0,478696982065837		
TGCAGCACGA	3	4	0,478870987892151		
AGCCACCGTG	3	4	0,478870987892151		
GGCAAGAAGA	3	4	0,478870987892151		
GTGGTGGGCG	3	4	0,478870987892151		
CCACTCCTCC	3	4	0,478870987892151		
TCACTGCACT	3	4	0,478870987892151		
CCACTACT	3	4	0,478870987892151		
TCACAAGCAA	3	4	0,478870987892151		
TGAGCCTCGT	3	4	0,478870987892151		
GCAAGCCAAC	3	4	0,478870987892151		
CCCCTCCCTC	3	4	0,478870987892151		
CCTGTGGTCC	3	4	0,478870987892151		
AAGGGGGCAA	3	4	0,478870987892151		
GAGGAGGGTG	3	4	0,478870987892151		
TGGACCCCC	3	4	0,478870987892151		
TCACAGTGCC	3	4	0,478870987892151		

CTGCTATACG	3	4	0,478870987892151		
GGCAGAGGAC	3	4	0,478870987892151		
AGCCTTTGTT	3	4	0,478870987892151		
GTGAAACCT	24	22	0,481722156206767		
ATTCTCCAGT	12	13	0,490752935409546		
GTCTGCACCT	4	3	0,491617600123088		
TTGACCAGGC	4	3	0,491617600123088		
TGAGGCCTCT	4	3	0,491617600123088		
ACTTGGAGCC	4	3	0,491617600123088		
TCTCCAGGAA	4	3	0,491617600123088		
GTGGGCCGCT	4	3	0,491617600123088		
TCAGACGCAG	4	3	0,491617600123088		
GTCTTAATC	4	3	0,491617600123088		
GCGTGCTCTC	4	3	0,491617600123088		
ATGATGATGA	4	3	0,491617600123088		
AAGTTGCTAT	4	3	0,491617600123088		
GCGGTGAGGT	4	3	0,491617600123088		
CAACATTCCT	4	3	0,491617600123088		
AATCCAGGAG	4	3	0,491617600123088		
GTATTGGCCT	4	3	0,491617600123088		
TGGTTTGCCT	4	3	0,491617600123088		
CCACGGGATT	2	3	0,494582851727804		
TCTGTACACC	2	3	0,494582851727804		
CCACCCCGAA	2	3	0,494582851727804		
CCACAGGGGA	2	3	0,494582851727804		
CAGGGAGCGC	2	3	0,494582851727804		
GACTCTGGGA	2	3	0,494582851727804		
CGACCCACG	2	3	0,494582851727804		
GAGTCAGGAG	2	3	0,494582851727804		
GGATCCTCGG	2	3	0,494582851727804		
AGGCGAGATC	2	3	0,494582851727804		
GAGAGCTCCC	2	3	0,494582851727804		
AGCGCTGATG	2	3	0,494582851727804		
GCCCCCACT	2	3	0,494582851727804		
CGCTGTGGGG	2	3	0,494582851727804		
AGCCCTCCCT	2	3	0,494582851727804		
GAATCCAAC	2	3	0,494582851727804		
ATCAGTGTGC	2	3	0,494582851727804		
CCCGACGTGC	2	3	0,494582851727804		
CCCCGCAAG	2	3	0,494582851727804		
GAGGATGGTG	2	3	0,494582851727804		
CCCATCCGAA	2	3	0,494582851727804		
CCCCCGTGAA	2	3	0,494582851727804		
GTGCGCTAGG	2	3	0,494582851727804		
GCTGTAGGGG	2	3	0,494582851727804		
TTCCACTAAC	2	3	0,494582851727804		

AGGGGATTCC	2	3	0,494582851727804		
CGGATAACCA	2	3	0,494582851727804		
CAGGAACCAC	2	3	0,494582851727804		
ACAGCGGCAA	2	3	0,494582851727804		
GAATGAGGAC	2	3	0,494582851727804		
CAGAAGAGGC	2	3	0,494582851727804		
ACCGGTCCGG	2	3	0,494582851727804		
AGCTGTCCCC	2	3	0,494582851727804		
GTGAGACCCC	2	3	0,494582851727804		
GCAGACCCAC	2	3	0,494582851727804		
CCACTGCATT	2	3	0,494582851727804		
TGGAGGCCAG	2	3	0,494582851727804		
AGACCCACAA	2	3	0,494582851727804		
GACCCGGGAG	2	3	0,494582851727804		
CTCCCCAAA	2	3	0,494582851727804		
GGAAAGTGAC	2	3	0,494582851727804		
GTGGCACGCA	2	3	0,494582851727804		
CCTATTTACT	2	3	0,494582851727804		
GTGTGGTGGT	2	3	0,494582851727804		
ATCAAGTTCG	2	3	0,494582851727804		
TAGGGCAATC	8	7	0,494840423266093		
GTTCCCTGGC	8	7	0,494840423266093		
ACACAGCAAG	14	12	0,49580709139506		
ACTCAGAAGA	2	1	0,500912547111511		
AGGCATTTTA	2	1	0,500912547111511		
ATGGCCTGTA	2	1	0,500912547111511		
TTCACAGTGG	2	1	0,500912547111511		
TGGCTATTGA	2	1	0,500912547111511		
TGTGTGTGAC	2	1	0,500912547111511		
TTATGGGATC	2	1	0,500912547111511		
TTAGGCAAGT	2	1	0,500912547111511		
ATGGCAAGGG	2	1	0,500912547111511		
TGCTGTAAAG	2	1	0,500912547111511		
ATGCTGGACA	2	1	0,500912547111511		
TGCAATAAGC	2	1	0,500912547111511		
AGGGCCCTCA	2	1	0,500912547111511		
TTACAGTCTT	2	1	0,500912547111511		
TGGCCTGCCC	2	1	0,500912547111511		
AGCCACTGTG	2	1	0,500912547111511		
AGCCAGGGAA	2	1	0,500912547111511		
TGGCAGCTTT	2	1	0,500912547111511		
TTAGATAAGC	2	1	0,500912547111511		
AGCCGGGATG	2	1	0,500912547111511		
AGCCTGCAGA	2	1	0,500912547111511		
TTACGAGGAA	2	1	0,500912547111511		
AGGCCTGGGC	2	1	0,500912547111511		

ATATAATCTG	2	1	0,500912547111511		
CAAATGCTGT	2	1	0,500912547111511		
AGAAAGATGT	2	1	0,500912547111511		
ACGGTGATGT	2	1	0,500912547111511		
ACGCTCTGTG	2	1	0,500912547111511		
AGTCAGCTGG	2	1	0,500912547111511		
TTGAGTGCAG	2	1	0,500912547111511		
TTGCGTGCTG	2	1	0,500912547111511		
ATTTAACTCC	2	1	0,500912547111511		
AGTGCAGGGC	2	1	0,500912547111511		
AGGAAGGTGT	2	1	0,500912547111511		
TGGTCTGGAG	2	1	0,500912547111511		
TGGAACCTTG	2	1	0,500912547111511		
ATTATCCAGG	2	1	0,500912547111511		
TGCTGCTGCT	2	1	0,500912547111511		
ACTGAGGTGC	2	1	0,500912547111511		
ACCGCCGTGG	2	1	0,500912547111511		
AGAGCTCACT	2	1	0,500912547111511		
TGCTTTGGGA	2	1	0,500912547111511		
ATCCAAATTT	2	1	0,500912547111511		
AGAGTGCCTG	2	1	0,500912547111511		
TGTGTGCCAC	2	1	0,500912547111511		
AGGTGCAGAG	2	1	0,500912547111511		
ACCCAATTTG	2	1	0,500912547111511		
AAGGCACAGA	2	1	0,500912547111511		
GTGATGGGGC	2	1	0,500912547111511		
GAAGTCTCCA	2	1	0,500912547111511		
TTGTGGCTGC	2	1	0,500912547111511		
GACATTGCTG	2	1	0,500912547111511		
GACCAGAAAA	2	1	0,500912547111511		
GACCCAAGAT	2	1	0,500912547111511		
GACCTCCTGC	2	1	0,500912547111511		
GACTAGTGCG	2	1	0,500912547111511		
GACTTCACTT	2	1	0,500912547111511		
GAACCCAAAG	2	1	0,500912547111511		
GAGCCAACCC	2	1	0,500912547111511		
GTGGCTGACA	2	1	0,500912547111511		
GAGCGGCTCT	2	1	0,500912547111511		
GAGCGGGATC	2	1	0,500912547111511		
AAGGAACTTG	2	1	0,500912547111511		
GAGGAGATGG	2	1	0,500912547111511		
AAGCCTGTAG	2	1	0,500912547111511		
GAGGTTTGAA	2	1	0,500912547111511		
GAGTGGCTAT	2	1	0,500912547111511		
GAGTTGGCAG	2	1	0,500912547111511		
GTTGCTGGGG	2	1	0,500912547111511		

GAGACCTTCT	2	1	0,500912547111511		
AAGTTGCTGG	2	1	0,500912547111511		
GTTCCACAGA	2	1	0,500912547111511		
GTGTTGACTG	2	1	0,500912547111511		
GTGTTAAATC	2	1	0,500912547111511		
CTGGGCGTGT	2	1	0,500912547111511		
CTGGTGATGG	2	1	0,500912547111511		
CTGTACTAGG	2	1	0,500912547111511		
CTGTATTTGA	2	1	0,500912547111511		
GTGTAATAAG	2	1	0,500912547111511		
GTGGTGTGCA	2	1	0,500912547111511		
AAGTGAGGAG	2	1	0,500912547111511		
TGATCTGGGA	2	1	0,500912547111511		
GCAAGGTTGC	2	1	0,500912547111511		
CGCAGTGTCC	2	1	0,500912547111511		
CTTACTG	2	1	0,500912547111511		
CTTCTACTAA	2	1	0,500912547111511		
GTGGTCAGTG	2	1	0,500912547111511		
GAAAAGCCTT	2	1	0,500912547111511		
GAAACAAGAT	2	1	0,500912547111511		
GAAACACGTA	2	1	0,500912547111511		
GAAATAAAAG	2	1	0,500912547111511		
GAAATGTAAG	2	1	0,500912547111511		
CTGTGTAAG	2	1	0,500912547111511		
GCTGTTGCAT	2	1	0,500912547111511		
GATCAGCAGC	2	1	0,500912547111511		
GCGCTGTCAG	2	1	0,500912547111511		
GCGGGGTACC	2	1	0,500912547111511		
AACCCTGCCC	2	1	0,500912547111511		
GCTAAGAGGG	2	1	0,500912547111511		
AACCCGGGAA	2	1	0,500912547111511		
AACATAAATT	2	1	0,500912547111511		
GGGCCTGGGG	2	1	0,500912547111511		
GCTGCTGGTG	2	1	0,500912547111511		
GCGCCAGTGC	2	1	0,500912547111511		
GGGCCCTTCC	2	1	0,500912547111511		
GCGAGTCTCC	2	1	0,500912547111511		
GCTTACCACA	2	1	0,500912547111511		
TTTTGTGGCC	2	1	0,500912547111511		
TTTTTGTACA	2	1	0,500912547111511		
GGATTGTCTG	2	1	0,500912547111511		
GGCAACAGAG	2	1	0,500912547111511		
AAAATTATTA	2	1	0,500912547111511		
GGCCCACACC	2	1	0,500912547111511		
GGCCCTGGTG	2	1	0,500912547111511		
AAAACGTTCT	2	1	0,500912547111511		

GGGCCTGACA	2	1	0,500912547111511		
GTATAATAGC	2	1	0,500912547111511		
GTGATGGCCA	2	1	0,500912547111511		
AAGCACTGTT	2	1	0,500912547111511		
GTGATGGATG	2	1	0,500912547111511		
GCAGGAGGTG	2	1	0,500912547111511		
GTGAAGTCTT	2	1	0,500912547111511		
GTGAAATCCT	2	1	0,500912547111511		
GCCACAAGTC	2	1	0,500912547111511		
AACTTGCCCA	2	1	0,500912547111511		
GCCCAGCCCT	2	1	0,500912547111511		
GCGCGATGCA	2	1	0,500912547111511		
GCCCTGGGGC	2	1	0,500912547111511		
CTGTTAGTGT	2	1	0,500912547111511		
GTAGCGCACA	2	1	0,500912547111511		
GCCTCTTGAA	2	1	0,500912547111511		
GCCTGAGCCT	2	1	0,500912547111511		
AACTGAATTC	2	1	0,500912547111511		
GTA AACCT	2	1	0,500912547111511		
GCCTGTGCTG	2	1	0,500912547111511		
GCCTGTGGAT	2	1	0,500912547111511		
TTTGAATGA	2	1	0,500912547111511		
GGTGTGGAAG	2	1	0,500912547111511		
GTGAAAACCC	2	1	0,500912547111511		
CCCGGGGCCT	2	1	0,500912547111511		
CAGGGCTCGC	2	1	0,500912547111511		
TAGCAGCAAT	2	1	0,500912547111511		
TCTGGCAGTA	2	1	0,500912547111511		
CCATTCTCCT	2	1	0,500912547111511		
CCTGAGTAAA	2	1	0,500912547111511		
CAGTGGGTGT	2	1	0,500912547111511		
TAGGCCACCA	2	1	0,500912547111511		
CCTAAGGCTA	2	1	0,500912547111511		
TATGTATCCT	2	1	0,500912547111511		
CATCATTCTT	2	1	0,500912547111511		
CCGCCCCCAG	2	1	0,500912547111511		
CCGAAAAAGT	2	1	0,500912547111511		
CCCTTGTGAC	2	1	0,500912547111511		
TAGAATGGTG	2	1	0,500912547111511		
TCATTACACT	2	1	0,500912547111511		
TCCAGTCCGG	2	1	0,500912547111511		
CCACTTCACT	2	1	0,500912547111511		
TTGGCCAGAC	2	1	0,500912547111511		
CCAGTACAGC	2	1	0,500912547111511		
CTTAAGGATT	2	1	0,500912547111511		
TCACAGCTGT	2	1	0,500912547111511		

TCCACCAGGG	2	1	0,500912547111511		
ACAACCTCAAT	2	1	0,500912547111511		
CCACTGCAAC	2	1	0,500912547111511		
CCACTGAACT	2	1	0,500912547111511		
CCACAGGAGA	2	1	0,500912547111511		
TCCTCAAGAT	2	1	0,500912547111511		
CATTGCCTTC	2	1	0,500912547111511		
CAGTCTCTCA	2	1	0,500912547111511		
AATAAAGTTG	2	1	0,500912547111511		
AATATTTACC	2	1	0,500912547111511		
GTTTTTGCTT	2	1	0,500912547111511		
CTGAACTGTG	2	1	0,500912547111511		
CAGCACAGAC	2	1	0,500912547111511		
CTGAGCTGTA	2	1	0,500912547111511		
TAGCCGCTGA	2	1	0,500912547111511		
ACAGTGGATT	2	1	0,500912547111511		
TGATCTCCAA	2	1	0,500912547111511		
CAGCCAGGAC	2	1	0,500912547111511		
TCTTTGCAAA	2	1	0,500912547111511		
TGACCGGCGA	2	1	0,500912547111511		
CTGCTGAGTG	2	1	0,500912547111511		
AATAAATTCC	2	1	0,500912547111511		
CAGCTTGACG	2	1	0,500912547111511		
CCTGTAGTCT	2	1	0,500912547111511		
CCTGTGTTGG	2	1	0,500912547111511		
CCTTCTGGTG	2	1	0,500912547111511		
CGAGGAGGAG	2	1	0,500912547111511		
CTACTGTACT	2	1	0,500912547111511		
TGATCTGCCT	2	1	0,500912547111511		
CGCCGACGAT	2	1	0,500912547111511		
TTGGCAACAT	2	1	0,500912547111511		
TAAGTAGCAA	2	1	0,500912547111511		
TCTTCCAGGA	2	1	0,500912547111511		
GTTGTAAAAT	2	1	0,500912547111511		
Total	10146	9719	0,504301739496325		
GCCGTGAGCA	3	2	0,512160181999207		
CCACTGCACA	3	2	0,512160181999207		
CACGCAATGC	3	2	0,512160181999207		
GCCCAGCTGG	3	2	0,512160181999207		
GGCCATCTCT	3	2	0,512160181999207		
TCCGCGAGAA	3	2	0,512160181999207		
GGGCAAGCCA	3	2	0,512160181999207		
TCCTCCCTCC	3	2	0,512160181999207		
TCCTGCCCCA	3	2	0,512160181999207		
GGGCAGGGGA	3	2	0,512160181999207		
AGAATTGCTT	3	2	0,512160181999207		

TCTTGTGCAT	3	2	0,512160181999207		
GCGACACCAG	3	2	0,512160181999207		
TCCTGCTGGC	3	2	0,512160181999207		
GCGGCGGCTC	3	2	0,512160181999207		
TGCTCCTACC	3	2	0,512160181999207		
GCTCTCCCCC	3	2	0,512160181999207		
TCCTGCTGCC	3	2	0,512160181999207		
TGGTTTGAGC	3	2	0,512160181999207		
GAGAAACCCC	3	2	0,512160181999207		
GCCATCCCCT	3	2	0,512160181999207		
GTGGCTCACG	3	2	0,512160181999207		
GTGAGACCCT	3	2	0,512160181999207		
TACAAGAGGA	3	2	0,512160181999207		
TGTCTGTGGT	3	2	0,512160181999207		
GAGAGCTTTG	3	2	0,512160181999207		
GTGGTGGGTG	3	2	0,512160181999207		
AATGTCCAGT	3	2	0,512160181999207		
GTGGTGTGTG	3	2	0,512160181999207		
ATAGACATAA	3	2	0,512160181999207		
CTCTGCCCTC	3	2	0,512160181999207		
GTTTGCAAGT	3	2	0,512160181999207		
CTGCACTTAC	3	2	0,512160181999207		
CTGGATGCCG	3	2	0,512160181999207		
CTCAGCAGAT	3	2	0,512160181999207		
ATGTAGAGTG	3	2	0,512160181999207		
ATGGGCTTGA	3	2	0,512160181999207		
TGCTGCCTCA	3	2	0,512160181999207		
CCAGGAGGAA	3	2	0,512160181999207		
AGCTGCCTAC	3	2	0,512160181999207		
ACAATATCGA	3	2	0,512160181999207		
TCCACGCACC	3	2	0,512160181999207		
TCAGTGTGTG	3	2	0,512160181999207		
TCATCATCAG	3	2	0,512160181999207		
TTAAGAGGGG	3	2	0,512160181999207		
GTGGCGGGCA	10	9	0,519052942593892		
CCGCTGCACT	20	18	0,523532708485921		
GGGATGGCAG	6	5	0,530786156654358		
AGTTTCCCAA	6	5	0,530786156654358		
GCGAGACCCT	6	5	0,530786156654358		
CTTGTGAACT	6	5	0,530786156654358		
CCTTCGAGAT	5	4	0,539985775947571		
GGCCCTGAGC	5	4	0,539985775947571		
TTTCAGGGGA	5	4	0,539985775947571		
TCACTGAGTT	5	4	0,539985775947571		
AACTCTTGAA	5	4	0,539985775947571		
CATCCTGCTG	5	4	0,539985775947571		

GGAGGGATCA	5	4	0,539985775947571		
CAATGCTGCC	5	4	0,539985775947571		
TTGCTGACTT	5	4	0,539985775947571		
CTGCCAACTT	5	4	0,539985775947571		
TTCTTGTGGC	5	4	0,539985775947571		
CCCCAGTTGC	12	11	0,546971162160238		
ACATTGGGTG	9	8	0,552976568539937		
CCAGGGGAGA	9	8	0,552976568539937		
AGAACCTTCC	9	8	0,552976568539937		
TTGGCCAGGC	26	25	0,574915051460266		
GAGACTCCTG	8	8	0,610076506932577		
GTCTGGGGCT	8	8	0,610076506932577		
TGCAGTCACT	8	8	0,610076506932577		
GTGAAGGCAG	27	27	0,613698840141296		
TTGTAATCGT	7	7	0,616488218307495		
CCTGTAGTCC	7	7	0,616488218307495		
CCCGTCCGGA	47	47	0,621154586474101		
CTCGCGCTGG	9	9	0,629276275634766		
AATAGGTCCA	13	13	0,638320922851563		
GTTAACGTCC	5	5	0,645285606384277		
CCAAACGTGT	5	5	0,645285606384277		
TACAGAGGGA	5	5	0,645285606384277		
ACTTACCTGC	5	5	0,645285606384277		
GTGACCTCCT	5	5	0,645285606384277		
GCTGTTGCGC	4	4	0,64648441473643		
GTGTTGCACA	4	4	0,64648441473643		
GACGCGGCGC	4	4	0,64648441473643		
GTGGCACGTG	4	4	0,64648441473643		
GTGGCTCACA	4	4	0,64648441473643		
GCGGGAGGGC	4	4	0,64648441473643		
GACATCAAGT	4	4	0,64648441473643		
AACTGCGGCA	4	4	0,64648441473643		
GTGGCACACA	4	4	0,64648441473643		
TTGACACTTT	4	4	0,64648441473643		
GCCTGCAGTC	4	4	0,64648441473643		
AGCAGGGCTC	4	4	0,64648441473643		
GGAGTGTGCT	4	4	0,64648441473643		
AGGCTACGGA	69	67	0,650129477183024		
GCAAAACCCT	3	3	0,666237314542135		
CCAAGGGCCC	3	3	0,666237314542135		
GCTCAGCTGG	3	3	0,666237314542135		
CTGTTGGCAT	3	3	0,666237314542135		
CCACTGCCCT	3	3	0,666237314542135		
TTTGTGTCAC	3	3	0,666237314542135		
CGAGGGGCCA	3	3	0,666237314542135		
CCCATCATCC	3	3	0,666237314542135		

GGGTGTGGTG	3	3	0,666237314542135		
CCCTGGCAAT	3	3	0,666237314542135		
TTTCTGCTCC	3	3	0,666237314542135		
CTCCCCTGCC	3	3	0,666237314542135		
GACTGCGTGC	3	3	0,666237314542135		
TTCTGTAGCC	3	3	0,666237314542135		
AGAATCACTT	3	3	0,666237314542135		
AGCTGATCAG	3	3	0,666237314542135		
GGCCCCGGAC	3	3	0,666237314542135		
AGGAACTGTA	3	3	0,666237314542135		
GGCGACAGAG	3	3	0,666237314542135		
TTGATGTACA	3	3	0,666237314542135		
TGTGGGTGCT	3	3	0,666237314542135		
GTGGATGGAC	3	3	0,666237314542135		
TGGTGACAGT	3	3	0,666237314542135		
ACCTTGTGCC	3	3	0,666237314542135		
ATAGTACAGC	3	3	0,666237314542135		
AAAGTCAGAA	3	3	0,666237314542135		
TGGAAGCTGTG	3	3	0,666237314542135		
AAGATCCCCG	3	3	0,666237314542135		
TGCTGTGCAT	3	3	0,666237314542135		
TGAGGCCAGG	3	3	0,666237314542135		
ATTGCACCAC	3	3	0,666237314542135		
ATTGTTTATG	3	3	0,666237314542135		
TGGAGTGGAG	3	3	0,666237314542135		
GCTAGGTTTA	3	3	0,666237314542135		
GGAAAGCTGC	3	3	0,666237314542135		
GGGAGCCCCT	3	3	0,666237314542135		
GCAAAACCCC	6	6	0,666800777117411		
GTGGACCCTG	2	2	0,710331678390503		
GTGAAGCCCC	2	2	0,710331678390503		
GCACCTAGTG	2	2	0,710331678390503		
GTGGAACCTT	2	2	0,710331678390503		
GATTGGTCTG	2	2	0,710331678390503		
GAGGACCCAA	2	2	0,710331678390503		
GGGGCGGGGT	2	2	0,710331678390503		
GGCAGTTAAC	2	2	0,710331678390503		
AAACTCTT	2	2	0,710331678390503		
GGCTGGTCTG	2	2	0,710331678390503		
GGAGTCATTG	2	2	0,710331678390503		
GGAGGCCGAG	2	2	0,710331678390503		
GGAAGGGGGA	2	2	0,710331678390503		
GCTGGGGTGG	2	2	0,710331678390503		
GGGCCGTGGC	2	2	0,710331678390503		
AACAGAAGCA	2	2	0,710331678390503		
GGGTCAAAAG	2	2	0,710331678390503		

GGGGCAGGGC	2	2	0,710331678390503		
GCCACACCCC	2	2	0,710331678390503		
GCTATGCTCC	2	2	0,710331678390503		
GTTGGATAGG	2	2	0,710331678390503		
GGGGGTGGAT	2	2	0,710331678390503		
GCGGCCACCA	2	2	0,710331678390503		
GGTTAACGTG	2	2	0,710331678390503		
GCCTGGCCAT	2	2	0,710331678390503		
GTGAAACCCG	2	2	0,710331678390503		
AAGAAAGTTC	2	2	0,710331678390503		
GCCAGCCAGT	2	2	0,710331678390503		
GGGGATTTGG	2	2	0,710331678390503		
TGCAGATATT	2	2	0,710331678390503		
CTGGCCTTCG	2	2	0,710331678390503		
CCACTGCGCT	2	2	0,710331678390503		
TCCCCATTAA	2	2	0,710331678390503		
ACAGCGTCTG	2	2	0,710331678390503		
TCCTCTTTCC	2	2	0,710331678390503		
TCTGGTTTGT	2	2	0,710331678390503		
CAGGCCTGGC	2	2	0,710331678390503		
CAGCGGCCAG	2	2	0,710331678390503		
CACTACTCAC	2	2	0,710331678390503		
CAATTAAGT	2	2	0,710331678390503		
CCAGCGCAGC	2	2	0,710331678390503		
CAAGGATCTA	2	2	0,710331678390503		
CCCCCACCTA	2	2	0,710331678390503		
TGCCACCACG	2	2	0,710331678390503		
ATGTGCCGGC	2	2	0,710331678390503		
ATGATGCGGT	2	2	0,710331678390503		
TGGGAGCCCT	2	2	0,710331678390503		
AGTCTGATGT	2	2	0,710331678390503		
TGTGCCACTA	2	2	0,710331678390503		
TGTGGAAACC	2	2	0,710331678390503		
AGGATGGTCC	2	2	0,710331678390503		
AGGAGGGAGG	2	2	0,710331678390503		
AGCTGGGTTG	2	2	0,710331678390503		
CAATCACAAA	2	2	0,710331678390503		
TTGTAAATGC	2	2	0,710331678390503		
GAGCTCCACA	2	2	0,710331678390503		
GAGCCTTGGT	2	2	0,710331678390503		
TTGTTCTGCT	2	2	0,710331678390503		
AAGGTAACAG	2	2	0,710331678390503		
GACATATGTA	2	2	0,710331678390503		
GTGGCGTGCG	2	2	0,710331678390503		
GTGGGTGTCC	2	2	0,710331678390503		
AAGTTTCCAA	2	2	0,710331678390503		

CCCTCTGTGA	2	2	0,710331678390503		
GTTCTGGTTT	2	2	0,710331678390503		
TCCATCCCTT	2	2	0,710331678390503		
CTCAACAGCA	2	2	0,710331678		
GTGGCAGCGC	2	2	0,710331678390503		
AATCTGCGCC	2	2	0,710331678390503		
TACCGCCCGT	2	2	0,710331678390503		
TACCTGCAGA	2	2	0,710331678390503		
CCTGTAATCT	2	2	0,710331678390503		
TAGACTTATT	2	2	0,710331678390503		
TAGCCAGTTA	2	2	0,710331678390503		
CCTCCCTGAT	2	2	0,710331678390503		
CCTCCCCCGT	2	2	0,710331678390503		
TATCACTCTG	2	2	0,710331678390503		
ACAAACCCCC	2	2	0,710331678390503		
TAACCCAGCA	2	2	0,710331678		

Anexo 3. Genoteca correspondiente al paciente C

Secuencia Tag	Antes	Después	P	Nº Identificación Unigene	Gen
CCCATCGTCC	266	178	0	Hs.465061	SMAD2
GGGCTGGGGT	122	60	0	Hs.425125	RPL29
GCAGGGCCTC	52	16	1,00136E-05	Hs.301350	FYXD3
GGTGGTGTCT	46	17	6,99759E-05	Hs.2704	GPX2
TCCCCGTACA	29	6	7,99894E-05	No existe	EST
TGGAATGAC	10	34	0,00030005	Hs.172928	COL1A1
GGATTTGGCC	72	37	0,00030005	Hs.437594	RPLP2
GCAGCCATCC	81	48	0,00136137	Hs.356371	RPL28
GTTGTGGTTA	50	86	0,001847744	Hs.534255	B2M
AGGTCAGGAG	18	4	0,001912594	Hs.529420	UBE2G2
TCCCTATTAA	18	4	0,001912594	No existe	EST
CTGACCTGTG	3	16	0,002735972	Hs.77961	HLA-B
GAAGCAGGAC	55	31	0,004073977	Hs.170622	CFL1
CTCCCCAAG	23	8	0,00447309	Hs.514635	PCYT2
GCATAATAGG	69	43	0,005334735	Hs.381123	RPL21
GGGAGGGGTG	2	12	0,006062031	Hs.2399	MMP14
AATAGGTCCA	19	6	0,00635159	Hs.512676	RPS25
CTTCCTTGCC	5	18	0,00686717	Hs.2785	KRT17
TGCAGGCCTG	9	1	0,009092569	Hs.497599	WARS
GGGCGCTGTG	0	7	0,009546518	Hs.8372	UQCR
CACCCCTGAT	25	11	0,010100007	Hs.173724	CKB
GTGACCACGG	6	0	0,01406467	Hs.436980	GRIN2C
GGAGGGGGCT	6	0	0,01406467	Hs.20516	HDAC4
GCGATGGCCG	6	0	0,01406467	Hs.12106	MMAB
ATGTGAAGAG	6	18	0,014186382	Hs.111779	SPARC

AAAACATTCT	1	9	0,014236927	Hs.528295	AASS
CGCCGCGGTG	12	3	0,014662743	Hs.535464	EST
GGGTTGGCTT	36	20	0,015847802	Hs.481571	UQCRH
AAGGGAGCAC	21	9	0,015994906	Hs.449585	IGLC2
CAACATTCT	0	6	0,016110897064209	Hs.433902	DDT
GCTGTTGCGC	0	6	0,016110897064209	Hs.8102	RPS20
GAACACATCC	13	4	0,019440174	Hs.381061	RPL19
CCCCCTGGAT	13	4	0,019440174	Hs.275243	S100A6
GTTCACATTA	3	12	0,020639777	Hs.529901	XIST
GTCACACCAC	1	8	0,024108052	Hs.459927	PTMA
CAAGGACCAG	2	10	0,025081515	Hs.109	DPEP1
GCGAAACCCC	17	7	0,025354981	Hs.521171	HIG2
CCACTGCACT	104	79	0,026574542	Hs.107003	CCNB1IP1
AGGCTACGGA	67	47	0,026602864	Hs.446637	EST
CCCGTCCGGA	53	35	0,027137041	Hs.410817	RPL13
TCACCCACAC	4	13	0,027925134	Hs.406300	RPL23
ACCGCCGTGG	5	0	0,02918005	Hs.513803	CYBA
ACCCGCCGGG	5	0	0,02918005	Hs.335106	ZFYNE1
GAGTTGGCAG	5	0	0,02918005	Hs.520205	EIF2AK1
AAAAAAAAAA	5	0	0,02918005	Hs.148741	IBRDC2
GTGCTGGAGA	5	0	0,02918005	Hs.515472	SNRPD2
GCCTGGGCTG	9	2	0,029429078	Hs.532188	EST
GGCAAGCCCC	32	52	0,030066133	Hs.148340	RPL10A
CGCAAGCTGG	7	1	0,030066133	Hs.491359	LMNA
AGCTCTTGGA	14	5	0,030432105	Hs.334841	SELENBP1
CAAGCATCCC	3	11	0,031113862991333	No existe	EST
GCCCCTGCTG	1	7	0,03165555	Hs.433845	KRT5
GTGGCTCACA	1	7	0,03165555	Hs.433381	C6orf89C
GTGAAACCTT	30	17	0,033388972	Hs.182476	WBSCR21
AGCAGATCAG	21	37	0,033658743	Hs.143873	S100A10
GTGGTGCACA	0	5	0,033840895	Hs.319334	NASP
TAGCTCTATG	0	5	0,033840895	Hs.371889	ATP1A1
CAGGCCTGGC	0	5	0,033840895	Hs.288761	EST
GCGGCAGCGG	0	5	0,033840895	Hs.271224	PH4
GTGCGCTGAG	7	17	0,039714098	Hs.534125	HLA-C
AGGTCCTAGC	16	7	0,045808554	Hs.523836	GSTP1
TAGTTGAAGT	4	12	0,046189427	Hs.131255	UQCRB
GGTGAGACAC	13	5	0,046489953994751	Hs.350927	SLC25A6
CCGGGTGATG	8	2	0,05285418	Hs.125213	ATOX1
TAGGGCAATC	3	10	0,052910089	Hs.546298	SUMO2
TGTACCTGTA	3	10	0,052910089	Hs.524390	K-ALPHA-1
GATCTCTTGG	3	10	0,052910089		
GTTCCCTGGC	5	13	0,053276538848877		
CTGTTGATTG	15	7	0,054585099		
CCTCCAGCTA	43	30	0,055897117		
GGGGGAGAAG	4	0	0,056818128		

CATTTGGGTC	4	0	0,056818128		
CTGGGTCTCC	4	0	0,056818128		
TCTGGCAGTA	4	0	0,056818128		
GCCCCCACT	4	0	0,056818128		
GTTTAAATCG	4	0	0,056818128		
GGTGGATGTG	4	0	0,056818128		
CTGGCGAGCG	4	0	0,056818128		
TGCTTTGGGA	4	0	0,056818128		
CAAGTTTGCT	4	0	0,056818128		
CCTGGAATCC	4	0	0,056818128		
GCTCTGGCCG	4	0	0,056818128		
GTGGCTCACG	4	0	0,056818128		
GTGAGGGCTA	4	0	0,056818128		
GCGGAGGTGG	6	1	0,06071651		
GCAAAAAAAAA	6	1	0,06071651		
ATTGCACCAC	6	1	0,06071651		
ACTGCTTGCC	6	1	0,06071651		
CTCCCCAAA	6	1	0,06071651		
TTCTGTGCTG	1	6	0,06146276		
GCAAGCCAAC	1	6	0,06146276		
GGGTCAAAAG	1	6	0,06146276		
GGGAAGGCAC	1	6	0,06146276		
ACTGGGTCTA	1	6	0,06146276		
GGGCCAGGA	1	6	0,06146276		
AGTTTCCCAA	1	6	0,06146276		
ATTGTTTATG	1	6	0,06146276		
GTGCCTAGGG	0	4	0,067476392		
TTATGGGGAG	0	4	0,067476392		
CAGTTCTCTG	0	4	0,067476392		
AGCCACCGCG	0	4	0,067476392		
GGCAGTTAAC	0	4	0,067476392		
CCCTGGCAAT	0	4	0,067476392		
GAGATCCGCA	0	4	0,067476392		
GTGCTAAGCG	0	4	0,067476392		
GACATCGAGG	0	4	0,067476392		
GCTGTTGCAT	0	4	0,067476392		
GATGGGGCTG	0	4	0,067476392		
CCACTCCTCC	0	4	0,067476392		
GCGGCTTTCC	0	4	0,067476392		
GGGCCTGTGC	0	4	0,067476392		
ACCAAAAACC	2	8	0,067613244		
ATGGCACGGA	2	8	0,067613244		
TGCCTCTGCG	2	8	0,067613244		
CAGCGCGCCC	10	4	0,069156289100647		
CTCGCGCTGG	16	8	0,071174383		
CAGGAACGGG	9	3	0,0715307		

GCGCTGGAGT	14	7	0,071684599		
GACGACACGA	23	14	0,073691964		
TAGGTTGTCT	46	63	0,074794292		
AGCACCTCCA	45	32	0,075414776802063		
GTGCTGGACC	3	9	0,078616381		
CCCCAGCCAG	28	18	0,085984468460083		
TACCCTAAAA	2	7	0,088888884		
TTTGGTTTTTC	2	7	0,088888884		
GTGGCCACGG	2	7	0,088888884		
GGCAACAGAG	5	1	0,089525461		
ATGGCAAGGG	5	1	0,089525461		
TTTACAGCTG	5	1	0,089525461		
GGGGTGCTGT	5	1	0,089525461		
CGCTGTGGGG	5	1	0,089525461		
TCCGCGAGAA	5	1	0,089525461		
CAGCTTGACG	5	1	0,089525461		
ACCCTTGGCC	5	1	0,089525461		
CCCTGCCTTG	7	2	0,089847207069397		
TGGTGTATGC	7	2	0,089847207069397		
ATTCTCCAGT	8	16	0,092678427696228		
TGGTGTGAG	8	16	0,092678427696228		
TAATAAAGGT	8	15	0,10000023841858		
GCGACAGCTC	8	15	0,10000023841858		
ACATCATCGA	35	25	0,101832985877991		
TTACCTCCTT	1	5	0,103519678115845		
AAGGGGGCAA	1	5	0,103519678115845		
CATATCATT	1	5	0,103519678115845		
TTCCGGTTCC	1	5	0,103519678115845		
GCATAGGCTG	1	5	0,103519678115845		
GAGGAGGGTG	1	5	0,103519678115845		
GAAATACAGT	4	10	0,107758641242981		
CCAGAACAGA	29	20	0,107874870300293		
ACTTTTTCAA	54	43	0,110253572463989		
AATCCTGTGG	19	12	0,110375285148621		
AAGACAGTGG	37	27	0,113378643989563		
GTGAGACCCT	6	2	0,114416480064392		
CCTAGCTGGA	28	41	0,115340232849121		
TTGGTCCTCT	46	60	0,124069452285767		
TCTCCATACC	9	16	0,124223589897156		
TGCTGCCTGT	8	3	0,12453305721283		
CCGGCGCGTG	3	0	0,125470519065857		
GTCACTGCCT	3	0	0,125470519065857		
GCACCCGCCT	3	0	0,125470519065857		
GAGAGACCCT	3	0	0,125470519065857		
CAGCTCACTG	3	0	0,125470519065857		
CTGTTGTTGG	3	0	0,125470519065857		

AGGGCAGTAC	3	0	0,125470519065857		
CCCTCTTTGG	3	0	0,125470519065857		
AAGAATCTGA	3	0	0,125470519065857		
AAAGCAAACC	3	0	0,125470519065857		
CCCGGGGCCT	3	0	0,125470519065857		
AGTGAACTCC	3	0	0,125470519065857		
CAGCTGTAGT	3	0	0,125470519065857		
GGCAAAGAGG	3	0	0,125470519065857		
AGCCGAGATT	3	0	0,125470519065857		
GTGGTGTGCG	3	0	0,125470519065857		
GCTGGCCTTG	3	0	0,125470519065857		
GAGGGCCGTG	3	0	0,125470519065857		
CCTTGAAAG	3	0	0,125470519065857		
GCCTTGATGA	3	0	0,125470519065857		
TCACAAGCAA	3	0	0,125470519065857		
CACAAAATCT	3	0	0,125470519065857		
GGCCTATGAG	3	0	0,125470519065857		
CCAGGGCAAC	3	0	0,125470519065857		
TGGCAAAAAA	3	0	0,125470519065857		
ACGTTTAAGG	3	0	0,125470519065857		
AGGTGCAGAG	3	0	0,125470519065857		
GGCTCCACCC	3	0	0,125470519065857		
TATGTGCGTG	3	0	0,125470519065857		
CTAGAACAGA	3	0	0,125470519065857		
GGAAGTGTGA	3	0	0,125470519065857		
CACGCACACA	3	0	0,125470519065857		
GCCTGCTCCC	3	0	0,125470519065857		
TACGGGGATC	3	0	0,125470519065857		
CTGAACTGTG	3	0	0,125470519065857		
GGTGTGGGTG	3	0	0,125470519065857		
CATCTAGAGG	3	0	0,125470519065857		
CTGGGCCTGG	3	0	0,125470519065857		
GCAGGGTCTC	3	0	0,125470519065857		
TGAGCAAGCC	3	0	0,125470519065857		
CTGCTGCACT	3	0	0,125470519065857		
ACAAACTGTG	3	0	0,125470519065857		
GCCCCTGCGC	3	0	0,125470519065857		
TACCCACCCC	3	0	0,125470519065857		
CTGTGAGACC	3	0	0,125470519065857		
ATCGCGCCAC	3	0	0,125470519065857		
CTCGGTGATG	3	0	0,125470519065857		
GCAGAAAATT	3	0	0,125470519065857		
GCAGGAGAAG	3	0	0,125470519065857		
GCCCAGCCCT	3	0	0,125470519065857		
GCCCCACAGC	3	0	0,125470519065857		
TGGTTGCGAC	3	0	0,125470519065857		

TCAGTTTGTC	0	3	0,127064824104309		
ATCGTGCCAC	0	3	0,127064824104309		
GGCTCGGGAT	0	3	0,127064824104309		
GGCTTGCCAG	0	3	0,127064824104309		
TGTGTTGGGA	0	3	0,127064824104309		
TCAGGGAGAT	0	3	0,127064824104309		
GTGCGCTAGG	0	3	0,127064824104309		
TGCCACCACA	0	3	0,127064824104309		
AACAGCAGGC	0	3	0,127064824104309		
CCAGTGGCCC	0	3	0,127064824104309		
GCAGGAGGTG	0	3	0,127064824104309		
AAGGACAAGA	0	3	0,127064824104309		
TAATCCTCAA	0	3	0,127064824104309		
CACTACTCAC	0	3	0,127064824104309		
TGTGAGGGAA	0	3	0,127064824104309		
GTGGCGTGCG	0	3	0,127064824104309		
GCCACTACCC	0	3	0,127064824104309		
ATGATGCGGT	0	3	0,127064824104309		
AATACCTCGT	0	3	0,127064824104309		
GTTTTCCATA	0	3	0,127064824104309		
GGATCCTCGG	0	3	0,127064824104309		
TTAGATAAGC	0	3	0,127064824104309		
GGAGGTAGGG	0	3	0,127064824104309		
TTTGGGGCTG	0	3	0,127064824104309		
GTAAGATTTG	0	3	0,127064824104309		
GACCTCCTGC	0	3	0,127064824104309		
TGAACTTACA	0	3	0,127064824104309		
GGTGTGGAAG	0	3	0,127064824104309		
CTGGCGCCGA	0	3	0,127064824104309		
CCTGTGATCC	0	3	0,127064824104309		
CCCTCGCATT	0	3	0,127064824104309		
GACCCGGGAG	0	3	0,127064824104309		
CCCTCCTGGG	0	3	0,127064824104309		
GCCAGACACC	0	3	0,127064824104309		
AAAGCACAAAG	0	3	0,127064824104309		
TTAAGAGGGG	0	3	0,127064824104309		
GGCCGCTGCT	0	3	0,127064824104309		
TGATGCCTCC	0	3	0,127064824104309		
CCTGTAATCT	0	3	0,127064824104309		
CCAGGCACTG	0	3	0,127064824104309		
GAGCGGCTCT	0	3	0,127064824104309		
CCTCCAGCAG	0	3	0,127064824104309		
GTTCCAGCCG	0	3	0,127064824104309		
ATGGTCAGTA	0	3	0,127064824104309		
GCCTCACACA	0	3	0,127064824104309		
GTTAACGTCC	0	3	0,127064824104309		

ATGGCGACTG	0	3	0,127064824104309		
TAGCAGCAAT	0	3	0,127064824104309		
TGGAAGTGTG	0	3	0,127064824104309		
AAGCTGAGTG	0	3	0,127064824104309		
AACCCGGGAA	0	3	0,127064824104309		
ACACTTCACC	0	3	0,127064824104309		
ACCGGTCCGG	0	3	0,127064824104309		
TGGCAACCTT	0	3	0,127064824104309		
CAGGGAGCGC	0	3	0,127064824104309		
GCGAGACCCT	0	3	0,127064824104309		
TAGCCAGTTA	0	3	0,127064824104309		
TAGGTTTCGTG	0	3	0,127064824104309		
CGTTCCCTGG	0	3	0,127064824104309		
GTGAAACTCC	0	3	0,127064824104309		
GGGGTCAGGG	0	3	0,127064824104309		
ATAGGTCAGA	0	3	0,127064824104309		
GTTCCACAGA	0	3	0,127064824104309		
GGGCCTGACA	0	3	0,127064824104309		
GCGCTGTCAG	0	3	0,127064824104309		
AAGATTGGTG	0	3	0,127064824104309		
TGGAACAGGA	0	3	0,127064824104309		
ACTAACACCC	0	3	0,127064824104309		
ATGGCGCAGT	0	3	0,127064824104309		
CCACGTTCCA	0	3	0,127064824104309		
CTTGTGAACT	3	8	0,127388477325439		
GACTCTGGTG	10	17	0,133511304855347		
CCGCTGCACT	18	12	0,136239767074585		
TGGGTGAGCC	4	9	0,136986255645752		
GAAATAAAGC	14	8	0,142450094223022		
AACCTGGGAG	16	10	0,143678188323975		
GGTGGCACTC	11	6	0,151285886764526		
TTCGGTTGGT	5	10	0,152671813964844		
ATCACGCCCT	5	10	0,152671813964844		
CAATAAATGT	5	10	0,152671813964844		
TGCAGTCACT	5	10	0,152671813964844		
CGCCGCCGGC	47	38	0,153139352798462		
TTGGAGATCT	2	6	0,154798746109009		
GTGGCGGGTG	2	6	0,154798746109009		
GGAGGGATCA	2	6	0,154798746109009		
TTGAGGGGGT	2	6	0,154798746109009		
CTCAACATCT	2	6	0,154798746109009		
GCCTGCAGTC	2	6	0,154798746109009		
ATAATTCTTT	9	15	0,163666129112244		
TTCATACACC	22	31	0,165289282798767		
GGAGGGCTGG	4	1	0,167504191398621		
GGCCAAAGGC	4	1	0,167504191398621		

CTCTGCCCTC	4	1	0,167504191398621		
AAACCCAAGC	4	1	0,167504191398621		
CCGCTGTACT	4	1	0,167504191398621		
CCACGGGATT	4	1	0,167504191398621		
GCGCCAGTGC	4	1	0,167504191398621		
GTGGCACACG	4	1	0,167504191398621		
CTCATAAGGA	4	1	0,167504191398621		
TGTCTGTGGT	4	1	0,167504191398621		
GTGGTGTACG	4	1	0,167504191398621		
TGCTGCCCTG	4	1	0,167504191398621		
TACAAGAGGA	4	1	0,167504191398621		
CGGTTTCCAA	4	1	0,167504191398621		
ACTGGGGAAT	4	1	0,167504191398621		
ATGGTGGGCA	4	1	0,167504191398621		
GTGGTGCCTG	4	1	0,167504191398621		
CTACTGCACT	4	1	0,167504191398621		
GTGATGTACG	4	1	0,167504191398621		
TGTCGCTGGG	4	1	0,167504191398621		
CCAGCCTGGG	4	1	0,167504191398621		
ACTGATCTGC	4	1	0,167504191398621		
GACCCAAGAT	4	1	0,167504191398621		
CAGGGGAGTG	4	1	0,167504191398621		
GCGGCCAGTA	4	1	0,167504191398621		
CCACTGCCCT	4	1	0,167504191398621		
GTGGCAGGCG	7	3	0,169779300689697		
TCCTGCTGCC	7	3	0,169779300689697		
GAGGTCCCTG	7	3	0,169779300689697		
GGCACCGTGC	7	3	0,169779300689697		
GTGATGGTGT	7	3	0,169779300689697		
GCCCAGCGGC	7	3	0,169779300689697		
GGCCCTGAGC	7	3	0,169779300689697		
GTGTTGCACA	7	3	0,169779300689697		
TGCACGTTTT	40	32	0,173010349273682		
TGAGGGAATA	12	7	0,176991105079651		
AAGGAGATGG	9	5	0,177304983139038		
ATCAGTGGCT	1	4	0,190839648246765		
TAAATTGCAA	1	4	0,190839648246765		
GGAAGCAGA	1	4	0,190839648246765		
GGCTCCTGGC	1	4	0,190839648246765		
TTTCAGGGGA	1	4	0,190839648246765		
GAGGCTCAAT	1	4	0,190839648246765		
GCCGTGAGCA	1	4	0,190839648246765		
AGAACCTTCA	1	4	0,190839648246765		
TGCAATAAGC	1	4	0,190839648246765		
AATAAAGGCT	1	4	0,190839648246765		
TGAGCCCCGGC	1	4	0,190839648246765		

TGGGGGCCGA	1	4	0,190839648246765		
AGCCACCGCA	1	4	0,190839648246765		
AAGGAAGTTG	1	4	0,190839648246765		
GCACCTAGTG	1	4	0,190839648246765		
TGGACCCAAC	1	4	0,190839648246765		
TGAAGGAGCC	1	4	0,190839648246765		
ACCGCCTGTG	1	4	0,190839648246765		
GGAACAAACA	8	4	0,194552540779114		
GGCGACAGAG	8	4	0,194552540779114		
GGTCCAGTGT	8	4	0,194552540779114		
GAGAAACCCC	5	2	0,199203133583069		
GCGGGAGGGC	5	2	0,199203133583069		
GTGGACCCTG	5	2	0,199203133583069		
ACACAGCAAG	19	13	0,202839732170105		
GTGAAACCCC	66	58	0,207039356231689		
CCCGACGTGC	6	3	0,219298243522644		
GCCTCCTCCC	6	3	0,219298243522644		
TGGTGACAGT	6	3	0,219298243522644		
CGCCGGAACA	6	3	0,219298243522644		
GTGGTGTGCA	6	3	0,219298243522644		
GTGGTGGGCA	6	3	0,219298243522644		
CCCCAGTTGC	7	12	0,220264315605164		
AGGTCTGCCA	3	7	0,221729516983032		
AGAACCTTCC	3	7	0,221729516983032		
GCGACGAGGC	25	20	0,224215269088745		
ACATTGGGTG	16	12	0,225733637809753		
ATGGCTGGTA	18	14	0,228832960128784		
GCCCCAATA	10	15	0,23201858997345		
CTCCTCACCT	12	18	0,234741806983948		
GGCTGGGGGC	44	38	0,236966848373413		
GAAAAATGGT	14	10	0,242718458175659		
CTGTACAGAC	8	13	0,245700240135193		
GTCCTGGTGG	2	0	0,246305465698242		
GCACTCCAAG	2	0	0,246305465698242		
CTTAATCCTG	2	0	0,246305465698242		
CTGCTGAGCC	2	0	0,246305465698242		
CATTCCAGAG	2	0	0,246305465698242		
GTCAGATGTC	2	0	0,246305465698242		
CAGGCAAATG	2	0	0,246305465698242		
GCCCCGCCCT	2	0	0,246305465698242		
GTCCCAACAC	2	0	0,246305465698242		
GGTGGAGTGT	2	0	0,246305465698242		
GTCCGGAGTC	2	0	0,246305465698242		
GCAAGGTTGC	2	0	0,246305465698242		
CTTTTGTCT	2	0	0,246305465698242		
GCAAGCGCAG	2	0	0,246305465698242		

CTGTGCTCGG	2	0	0,246305465698242		
GCACCACTGC	2	0	0,246305465698242		
GTCTACTCCT	2	0	0,246305465698242		
GCACAGGCCA	2	0	0,246305465698242		
CTTGCTGATC	2	0	0,246305465698242		
CTTTCCCCTT	2	0	0,246305465698242		
CTGCTAAGGT	2	0	0,246305465698242		
GCAGGGTGGG	2	0	0,246305465698242		
CTGGGGAGGG	2	0	0,246305465698242		
CATAGTGCTA	2	0	0,246305465698242		
GTAATGAAGC	2	0	0,246305465698242		
CATCCAATAA	2	0	0,246305465698242		
CTGGGCGGCA	2	0	0,246305465698242		
CATACACACA	2	0	0,246305465698242		
GAAATGCTGC	2	0	0,246305465698242		
GTAATAAAT	2	0	0,246305465698242		
GTAACGCTG	2	0	0,246305465698242		
CAGTGTTGGG	2	0	0,246305465698242		
GCCAGGGGCC	2	0	0,246305465698242		
CAGTGCGCC	2	0	0,246305465698242		
CTGGGGGAAT	2	0	0,246305465698242		
CAGGGATCAA	2	0	0,246305465698242		
GGTTAACGTG	2	0	0,246305465698242		
GTAGTGTGTG	2	0	0,246305465698242		
GTATGATGAG	2	0	0,246305465698242		
GGTGTATCT	2	0	0,246305465698242		
GCAGCCTGGA	2	0	0,246305465698242		
GCCACCCCGT	2	0	0,246305465698242		
GCAGATCGGG	2	0	0,246305465698242		
GCATAACAGG	2	0	0,246305465698242		
GCACTGCACT	2	0	0,246305465698242		
CTGGGCAAAC	2	0	0,246305465698242		
CACCATCAGA	2	0	0,246305465698242		
GAGGCCGTTT	2	0	0,246305465698242		
CACACACACA	2	0	0,246305465698242		
GAGGGGATGT	2	0	0,246305465698242		
CACACCTGGC	2	0	0,246305465698242		
CACCACTATG	2	0	0,246305465698242		
CACCCCTGTT	2	0	0,246305465698242		
CACCATCACA	2	0	0,246305465698242		
GACATCTACC	2	0	0,246305465698242		
GACAGCAGAG	2	0	0,246305465698242		
GACACTGAAA	2	0	0,246305465698242		
GAGGTCCTTA	2	0	0,246305465698242		
GTGATGGCCA	2	0	0,246305465698242		
GTGATGCGTG	2	0	0,246305465698242		

GCAAAATCCT	2	0	0,246305465698242		
GAGGGGGAAA	2	0	0,246305465698242		
GACCCTGACT	2	0	0,246305465698242		
CAAGGGCCAA	2	0	0,246305465698242		
GAGACCAAGC	2	0	0,246305465698242		
GAGACCCTGG	2	0	0,246305465698242		
GAGAGAAGAG	2	0	0,246305465698242		
GAGAGGGAGA	2	0	0,246305465698242		
GTGGACGCCT	2	0	0,246305465698242		
GAGGCCGGCC	2	0	0,246305465698242		
CAATGGCTTG	2	0	0,246305465698242		
GAGGCATTTG	2	0	0,246305465698242		
GAGCCACCGG	2	0	0,246305465698242		
GACCACACAC	2	0	0,246305465698242		
GAGCTGTTGG	2	0	0,246305465698242		
GTGCTAAATG	2	0	0,246305465698242		
GAGGAACAAG	2	0	0,246305465698242		
GAGTCTATGA	2	0	0,246305465698242		
GACCCTGGGG	2	0	0,246305465698242		
GTGAAACACC	2	0	0,246305465698242		
CAGATTTGCC	2	0	0,246305465698242		
GAACCGGTCCG	2	0	0,246305465698242		
CAGCCTCCCT	2	0	0,246305465698242		
GAACAGCCAA	2	0	0,246305465698242		
GTGAAACCGT	2	0	0,246305465698242		
GACACTACAC	2	0	0,246305465698242		
CCAATGCACG	2	0	0,246305465698242		
GATGCAGCAG	2	0	0,246305465698242		
GCCCTACAGA	2	0	0,246305465698242		
GCAAAGATTG	2	0	0,246305465698242		
GTGAAAACCTC	2	0	0,246305465698242		
CAGCTCATCT	2	0	0,246305465698242		
GCAAAATCCTG	2	0	0,246305465698242		
GAAAGGGGAG	2	0	0,246305465698242		
GATTTTGCAC	2	0	0,246305465698242		
GAATTGGAGT	2	0	0,246305465698242		
GAATTTGGGG	2	0	0,246305465698242		
GCATTTTGTG	2	0	0,246305465698242		
GAATTTGGCC	2	0	0,246305465698242		
GTGAGACTCT	2	0	0,246305465698242		
GTGAGACCTC	2	0	0,246305465698242		
GAGTGGGGGG	2	0	0,246305465698242		
GAAGGAAGTC	2	0	0,246305465698242		
GATCACCTGA	2	0	0,246305465698242		
GTGAAGACAG	2	0	0,246305465698242		
GATCCGCTCT	2	0	0,246305465698242		

CACTTTGGGA	2	0	0,246305465698242		
GAAGTGAAGA	2	0	0,246305465698242		
GTGAAGCCCA	2	0	0,246305465698242		
GAAGGGCAGA	2	0	0,246305465698242		
CAGGAACCAC	2	0	0,246305465698242		
GAGTTTGTGT	2	0	0,246305465698242		
CGACCGCCGG	2	0	0,246305465698242		
GGAAAAAAA	2	0	0,246305465698242		
GGCTCCTTGA	2	0	0,246305465698242		
GCTTTCTCAC	2	0	0,246305465698242		
CCCCGCCGGT	2	0	0,246305465698242		
CCCCCTTCT	2	0	0,246305465698242		
GCTTTCTCAA	2	0	0,246305465698242		
GGCTGGAGCC	2	0	0,246305465698242		
GGCTGGGTTT	2	0	0,246305465698242		
GGCTGGTCTC	2	0	0,246305465698242		
GGCTGGTCTG	2	0	0,246305465698242		
CCTTGACCAA	2	0	0,246305465698242		
GCTTGATCT	2	0	0,246305465698242		
GCTTGCTGGC	2	0	0,246305465698242		
GCTGCCGGCC	2	0	0,246305465698242		
CCCAGCCAAC	2	0	0,246305465698242		
CCAAGGAATG	2	0	0,246305465698242		
CCAGTTGGGC	2	0	0,246305465698242		
CCCAAACGTG	2	0	0,246305465698242		
CCCACCCTTG	2	0	0,246305465698242		
GCTGGAAAAA	2	0	0,246305465698242		
CCCAATGCT	2	0	0,246305465698242		
GCTGGCAGGC	2	0	0,246305465698242		
GCTTCAGCGG	2	0	0,246305465698242		
GGGAGCATT	2	0	0,246305465698242		
CCCATCGCTC	2	0	0,246305465698242		
CGCCACCAAG	2	0	0,246305465698242		
GGGAATAGTT	2	0	0,246305465698242		
CGCAGAACTT	2	0	0,246305465698242		
GGCGATTGGG	2	0	0,246305465698242		
CCCACTGCC	2	0	0,246305465698242		
GGAGGGAGCT	2	0	0,246305465698242		
CCTGTATGAG	2	0	0,246305465698242		
CCTCCCACAG	2	0	0,246305465698242		
CCTCCAGCTT	2	0	0,246305465698242		
GGAGGCAGGC	2	0	0,246305465698242		
GGCCAAACAA	2	0	0,246305465698242		
CCTGAAATTT	2	0	0,246305465698242		
GGAGGCTGAA	2	0	0,246305465698242		
GGAGAAACAG	2	0	0,246305465698242		

GGCAGCGCCC	2	0	0,246305465698242		
CCTCCACCTA	2	0	0,246305465698242		
CCTAGCTAGA	2	0	0,246305465698242		
GGATAGGTGT	2	0	0,246305465698242		
CCGCTTCACT	2	0	0,246305465698242		
CCGGTAGTCT	2	0	0,246305465698242		
GGCATCAGGC	2	0	0,246305465698242		
GGCCGCGTTC	2	0	0,246305465698242		
CCAGTGCGCT	2	0	0,246305465698242		
CCTGTACCCC	2	0	0,246305465698242		
GGAAGCACGG	2	0	0,246305465698242		
GGCCGTGCTG	2	0	0,246305465698242		
CCTGGCCTGA	2	0	0,246305465698242		
CCCTGCAAGA	2	0	0,246305465698242		
CCTGGCCCTG	2	0	0,246305465698242		
GGCGCCTCCT	2	0	0,246305465698242		
GGCCGCCGGC	2	0	0,246305465698242		
CCCGGCTAAT	2	0	0,246305465698242		
CCTGGCCAGA	2	0	0,246305465698242		
CCTGGACAAA	2	0	0,246305465698242		
CACCTCCTAG	2	0	0,246305465698242		
CCCTCACCCA	2	0	0,246305465698242		
CCCGGCCAGC	2	0	0,246305465698242		
CTGACCCCTT	2	0	0,246305465698242		
GCGATGCAGG	2	0	0,246305465698242		
GGGGGGGTCT	2	0	0,246305465698242		
GCGAGAGTCC	2	0	0,246305465698242		
GCGACTCTAG	2	0	0,246305465698242		
GCGACGGGTC	2	0	0,246305465698242		
GCGAAACCTG	2	0	0,246305465698242		
GGGGGTCACG	2	0	0,246305465698242		
GGGGTACTGT	2	0	0,246305465698242		
CTCCCCCAGG	2	0	0,246305465698242		
GGGGTGGCAG	2	0	0,246305465698242		
GGGGTGTGAG	2	0	0,246305465698242		
CCACCTGCAG	2	0	0,246305465698242		
GGGTGGGGTT	2	0	0,246305465698242		
CGCCTATAGT	2	0	0,246305465698242		
GGTGACAAAG	2	0	0,246305465698242		
GCCGAGCCTC	2	0	0,246305465698242		
GGTGAGCGTG	2	0	0,246305465698242		
GCCGCCCTCG	2	0	0,246305465698242		
GCCGCCCTGC	2	0	0,246305465698242		
GCCGCCGCCG	2	0	0,246305465698242		
GCCTCCAGCT	2	0	0,246305465698242		
CAAACAGCC	2	0	0,246305465698242		

GGGTGGGTAG	2	0	0,246305465698242		
GGTGAAGACC	2	0	0,246305465698242		
CTGAGGGAGC	2	0	0,246305465698242		
CCACCCACTC	2	0	0,246305465698242		
CTGAGAGCTG	2	0	0,246305465698242		
GGGTGTACCT	2	0	0,246305465698242		
GGGGCTGTGG	2	0	0,246305465698242		
GGTGACTGAC	2	0	0,246305465698242		
GCTCTGCTGT	2	0	0,246305465698242		
CCACTGCAAT	2	0	0,246305465698242		
GGGCTCCCCT	2	0	0,246305465698242		
GGGCTCACCT	2	0	0,246305465698242		
CGTGACTAAT	2	0	0,246305465698242		
GCTCAAAGAG	2	0	0,246305465698242		
CCAGCTTGAT	2	0	0,246305465698242		
GCTCATTAAT	2	0	0,246305465698242		
GGGCTGGAGG	2	0	0,246305465698242		
GCTGACTGAC	2	0	0,246305465698242		
CGCTTTTGTA	2	0	0,246305465698242		
GCTGCCAATA	2	0	0,246305465698242		
GGGCCAGGGT	2	0	0,246305465698242		
GCTGCCCTTA	2	0	0,246305465698242		
CCAGTGC ACT	2	0	0,246305465698242		
CGTCATCGTG	2	0	0,246305465698242		
CTAGGCCATA	2	0	0,246305465698242		
CTGCCTTATT	2	0	0,246305465698242		
CTCAGACTTT	2	0	0,246305465698242		
CTCAATGGCA	2	0	0,246305465698242		
GGGGCGGTAA	2	0	0,246305465698242		
GCGGCCTCAG	2	0	0,246305465698242		
GCTACGTAGC	2	0	0,246305465698242		
CCACTGTGCT	2	0	0,246305465698242		
GCGCCAAGGA	2	0	0,246305465698242		
GCGTGAGTGC	2	0	0,246305465698242		
GGGGACAGAG	2	0	0,246305465698242		
CCAGCTGCCA	2	0	0,246305465698242		
GGGCTTGTTT	2	0	0,246305465698242		
CGTTCCTGCG	2	0	0,246305465698242		
GCTAACACGG	2	0	0,246305465698242		
GCGGGGCCCC	2	0	0,246305465698242		
ACAATAAGCC	2	0	0,246305465698242		
ACTGTCTCCA	2	0	0,246305465698242		
ACTGTCTCAA	2	0	0,246305465698242		
TGCATACATA	2	0	0,246305465698242		
TAAGTGTCTT	2	0	0,246305465698242		
TAAGA ACTGG	2	0	0,246305465698242		

TAAGCGAGCT	2	0	0,246305465698242		
TGCATTACAG	2	0	0,246305465698242		
AATGCTTTGT	2	0	0,246305465698242		
AATGTGAGTC	2	0	0,246305465698242		
AGGAAGACTA	2	0	0,246305465698242		
TGGTGCCCT	2	0	0,246305465698242		
ACAACCTCTG	2	0	0,246305465698242		
TGCACACATA	2	0	0,246305465698242		
TACATTCTGT	2	0	0,246305465698242		
TACCAAGCCA	2	0	0,246305465698242		
TCCAGCCTAT	2	0	0,246305465698242		
AGGAGCAACT	2	0	0,246305465698242		
TGCCACCAGG	2	0	0,246305465698242		
TACCACCACA	2	0	0,246305465698242		
ATCCGCCTGC	2	0	0,246305465698242		
AGAACTACGT	2	0	0,246305465698242		
TGCCCACACA	2	0	0,246305465698242		
ATGGCAGGTG	2	0	0,246305465698242		
TCCCCGTA	2	0	0,246305465698242		
TCACCACACC	2	0	0,246305465698242		
GTTGGGACAT	2	0	0,246305465698242		
GTTGGGGGCC	2	0	0,246305465698242		
TTCTGTGTCA	2	0	0,246305465698242		
AGAAAAGCAG	2	0	0,246305465698242		
TTCTGGACCC	2	0	0,246305465698242		
TTCTGCACTG	2	0	0,246305465698242		
ATGGAATGCT	2	0	0,246305465698242		
TTCTCAGACA	2	0	0,246305465698242		
TTCCTTGCCA	2	0	0,246305465698242		
TCGCTGGAGG	2	0	0,246305465698242		
ATGAACAGCG	2	0	0,246305465698242		
ACTTGCCTTG	2	0	0,246305465698242		
AATGAGTTTG	2	0	0,246305465698242		
TCCTTTCCTT	2	0	0,246305465698242		
AAGTTGCTGG	2	0	0,246305465698242		
ATGCCAGCTG	2	0	0,246305465698242		
TTAGCCAGGA	2	0	0,246305465698242		
ACTTCTTCAA	2	0	0,246305465698242		
TAACACCCAG	2	0	0,246305465698242		
AGCGTCGATG	2	0	0,246305465698242		
TCCTGCAGCT	2	0	0,246305465698242		
ATGACTGCTA	2	0	0,246305465698242		
TTACACCTGT	2	0	0,246305465698242		
AGGATCACTT	2	0	0,246305465698242		
AAGGACTTGC	2	0	0,246305465698242		
TATTTTGAAG	2	0	0,246305465698242		

TAGTTGCACA	2	0	0,246305465698242		
ACCGACTGAT	2	0	0,246305465698242		
TGGCGCGTGA	2	0	0,246305465698242		
ACTGCACCTC	2	0	0,246305465698242		
TGGCCCTCCA	2	0	0,246305465698242		
TGGCCCGACG	2	0	0,246305465698242		
AGGTGGAGGT	2	0	0,246305465698242		
TATAGGGTTT	2	0	0,246305465698242		
ACTGCAAAAC	2	0	0,246305465698242		
TATTCCAGAA	2	0	0,246305465698242		
TGAAACTCAT	2	0	0,246305465698242		
ACCTGCTGGT	2	0	0,246305465698242		
ACCCTACCTC	2	0	0,246305465698242		
TATTTTTGGC	2	0	0,246305465698242		
TCAAAAGACC	2	0	0,246305465698242		
TCAACTGAAG	2	0	0,246305465698242		
ACCTGGGTGC	2	0	0,246305465698242		
AGGTCGGGAG	2	0	0,246305465698242		
AGGGAAAGAG	2	0	0,246305465698242		
TCAATGTATT	2	0	0,246305465698242		
AGGTCAGGGG	2	0	0,246305465698242		
ACGGTGATGT	2	0	0,246305465698242		
ACTACCTCCC	2	0	0,246305465698242		
ACCGGCTATT	2	0	0,246305465698242		
AGGCCGCCAG	2	0	0,246305465698242		
TGCCCTCAAA	2	0	0,246305465698242		
TCATCATCTG	2	0	0,246305465698242		
TGCCGCCAGG	2	0	0,246305465698242		
TGGTCCACGG	2	0	0,246305465698242		
ATATCACAGC	2	0	0,246305465698242		
ATAGTGCCAC	2	0	0,246305465698242		
TGCCTGCTCC	2	0	0,246305465698242		
TCAGTGTGTG	2	0	0,246305465698242		
TGCCTGTAAT	2	0	0,246305465698242		
TCAGGCCGTT	2	0	0,246305465698242		
AGGTTCTTTT	2	0	0,246305465698242		
ATAGACGCAA	2	0	0,246305465698242		
ACTGCTCATT	2	0	0,246305465698242		
ACATTTGCCA	2	0	0,246305465698242		
ATACTGCCCT	2	0	0,246305465698242		
TAGCCCCGAC	2	0	0,246305465698242		
AGTGCTACGG	2	0	0,246305465698242		
AGGCGGCAAG	2	0	0,246305465698242		
TGCGGATCAA	2	0	0,246305465698242		
ACCATTGGAT	2	0	0,246305465698242		
TAGGATGGGG	2	0	0,246305465698242		

ACCCACCGCG	2	0	0,246305465698242		
TGGCTGCTCA	2	0	0,246305465698242		
AAGGCCGAGT	2	0	0,246305465698242		
ACAGTGGATT	2	0	0,246305465698242		
TTGGCGGGTG	2	0	0,246305465698242		
AGACGCTTCT	2	0	0,246305465698242		
GTGGCGTACC	2	0	0,246305465698242		
AGCCCGACCA	2	0	0,246305465698242		
TTGGCTCCGC	2	0	0,246305465698242		
AGAATAAAGC	2	0	0,246305465698242		
CAACACTGTG	2	0	0,246305465698242		
ATTACAGCCA	2	0	0,246305465698242		
TTGGGTTAAT	2	0	0,246305465698242		
TGAAGGTGGA	2	0	0,246305465698242		
CAAACAAACA	2	0	0,246305465698242		
TTTATAACTA	2	0	0,246305465698242		
TTGGCCTGGA	2	0	0,246305465698242		
TCTCGGTTTA	2	0	0,246305465698242		
TTTCAGAGAG	2	0	0,246305465698242		
AACCTGTTTT	2	0	0,246305465698242		
TTGGCAGTGG	2	0	0,246305465698242		
GTGGGGCACG	2	0	0,246305465698242		
GTGGCGGCAC	2	0	0,246305465698242		
CAACAGCCCT	2	0	0,246305465698242		
TTGTGTCCAC	2	0	0,246305465698242		
ATTCTCCCCG	2	0	0,246305465698242		
TCTGGTCTGG	2	0	0,246305465698242		
TTGTAGCAGT	2	0	0,246305465698242		
TTGGTTTGCT	2	0	0,246305465698242		
GTGGGTGTCC	2	0	0,246305465698242		
GTGGGCAGGC	2	0	0,246305465698242		
AAATGCCCAC	2	0	0,246305465698242		
AACCCCCCT	2	0	0,246305465698242		
AGCCCTCCA	2	0	0,246305465698242		
AGAATAGCTT	2	0	0,246305465698242		
TTGGGCAGGC	2	0	0,246305465698242		
AGACGCAGAA	2	0	0,246305465698242		
TTGTGTGATG	2	0	0,246305465698242		
AAAGTGCATC	2	0	0,246305465698242		
GTGGCTGCTG	2	0	0,246305465698242		
AGCCACCACC	2	0	0,246305465698242		
AAGATTGACG	2	0	0,246305465698242		
TCTGCCTGGG	2	0	0,246305465698242		
TTGGCAGGCG	2	0	0,246305465698242		
TTGGTGATGT	2	0	0,246305465698242		
AAAAGAGTGG	2	0	0,246305465698242		

TGAGCTACCC	2	0	0,246305465698242		
GTTAATTGAT	2	0	0,246305465698242		
TTGCCGGTTT	2	0	0,246305465698242		
GTTAGGCTCA	2	0	0,246305465698242		
AGATGCAATT	2	0	0,246305465698242		
TTGCCCCCGT	2	0	0,246305465698242		
AGCAAATTAG	2	0	0,246305465698242		
AAACATTGGG	2	0	0,246305465698242		
AAACCAAAAA	2	0	0,246305465698242		
TTGCCCAGGT	2	0	0,246305465698242		
GTGTTGTTTT	2	0	0,246305465698242		
AAAAAACCCA	2	0	0,246305465698242		
TTTTGAAGCA	2	0	0,246305465698242		
TTTTGTACTT	2	0	0,246305465698242		
TCGTCTTTAT	2	0	0,246305465698242		
AGCCTGGAGA	2	0	0,246305465698242		
AAGAGCGCAC	2	0	0,246305465698242		
TTGAAATGAT	2	0	0,246305465698242		
GTTGCTCTAT	2	0	0,246305465698242		
TTCTTGTTTT	2	0	0,246305465698242		
ATGGCTAACC	2	0	0,246305465698242		
AACTAAAAAA	2	0	0,246305465698242		
TTGGCAGGCC	2	0	0,246305465698242		
TTGGCAACAT	2	0	0,246305465698242		
AACGCTGCCT	2	0	0,246305465698242		
TCTCATCCAT	2	0	0,246305465698242		
TTTCTCCCTC	2	0	0,246305465698242		
GTGGCCTCCG	2	0	0,246305465698242		
AAACTGAGGT	2	0	0,246305465698242		
AACTTGAGAG	2	0	0,246305465698242		
GTGTGTCTCG	2	0	0,246305465698242		
TTTCTAGTTT	2	0	0,246305465698242		
AGAAATACCA	2	0	0,246305465698242		
AACTAATACT	2	0	0,246305465698242		
ATGGGACTGA	2	0	0,246305465698242		
TCTGTTATTG	2	0	0,246305465698242		
GTGTTAACCT	2	0	0,246305465698242		
GTGGCCCTTT	2	0	0,246305465698242		
GTGTTGGTGA	2	0	0,246305465698242		
AACTGTACTA	2	0	0,246305465698242		
CACAAACGGT	19	24	0,253164529800415		
AGCCCTACAA	22	28	0,25445294380188		
AGGAAAGCTG	41	36	0,25445294380188		
TTGGGGTTTC	25	32	0,258397936820984		
CTGCCAAGTT	9	13	0,266666650772095		
CCATTGCACT	26	21	0,267379641532898		

CCTGTAGTCC	8	5	0,268096566200256		
GTGGCAGGCA	6	10	0,270270228385925		
CTAGCCTCAC	4	7	0,275482058525085		
GAGGGCCGGT	4	7	0,275482058525085		
GCAGCTCAGG	4	7	0,275482058525085		
GGAGGCTGAG	4	7	0,275482058525085		
AAACTGTGGT	4	7	0,275482058525085		
TACCATCAAT	24	30	0,277777791023254		
ACTATTTCCA	0	2	0,280112028121948		
AGATGAGATG	0	2	0,280112028121948		
TGCACCACAG	0	2	0,280112028121948		
GGAAGATGAA	0	2	0,280112028121948		
CCTTCGAGAT	0	2	0,280112028121948		
CCTGTGGTCC	0	2	0,280112028121948		
CCTGTCCAGC	0	2	0,280112028121948		
AGAAAGATGT	0	2	0,280112028121948		
TGATGCGCGC	0	2	0,280112028121948		
GCTCCCTACA	0	2	0,280112028121948		
CGTGAACAAT	0	2	0,280112028121948		
CGGCCAGCC	0	2	0,280112028121948		
TGCACTACCC	0	2	0,280112028121948		
ACTCAAATGG	0	2	0,280112028121948		
ACTGATAGAT	0	2	0,280112028121948		
GGAAGAGAAG	0	2	0,280112028121948		
TGGTTGGTGG	0	2	0,280112028121948		
CCTCCCCCGT	0	2	0,280112028121948		
GGAGGCAGGT	0	2	0,280112028121948		
CGCGCCCGGC	0	2	0,280112028121948		
GCTGCATCCC	0	2	0,280112028121948		
CGCCTGTAAT	0	2	0,280112028121948		
TGACGTCAGC	0	2	0,280112028121948		
GGAGCGCCAG	0	2	0,280112028121948		
TGCCCGGGAG	0	2	0,280112028121948		
GCTGCAGCAC	0	2	0,280112028121948		
GGAAATTGTC	0	2	0,280112028121948		
GGACCAGGCT	0	2	0,280112028121948		
TGCCAGAAAT	0	2	0,280112028121948		
GCTCTGCCTC	0	2	0,280112028121948		
GCTGTAATCC	0	2	0,280112028121948		
TGCCACCACG	0	2	0,280112028121948		
CCTGAATGAA	0	2	0,280112028121948		
ACTGGTGGTC	0	2	0,280112028121948		
AGAGCCCTAG	0	2	0,280112028121948		
CCTGCATCCC	0	2	0,280112028121948		
CGAATAAAAT	0	2	0,280112028121948		
CCTTTGGCTA	0	2	0,280112028121948		

TGCCCACCAC	0	2	0,280112028121948		
GGAGCCAGGC	0	2	0,280112028121948		
GCAGCTCAAA	0	2	0,280112028121948		
GATTCAACCA	0	2	0,280112028121948		
GAAATGATGA	0	2	0,280112028121948		
GCAAAACCCT	0	2	0,280112028121948		
GCAACGTGTA	0	2	0,280112028121948		
TTGATGTACA	0	2	0,280112028121948		
TTGATGGGTG	0	2	0,280112028121948		
AAGACCCTCT	0	2	0,280112028121948		
GCACCCAGC	0	2	0,280112028121948		
TTCTGTAGCC	0	2	0,280112028121948		
AATGAATAA	0	2	0,280112028121948		
AAGCCCAGGC	0	2	0,280112028121948		
GAATCAGAAG	0	2	0,280112028121948		
AAGGAATCGG	0	2	0,280112028121948		
TTCACTGTAA	0	2	0,280112028121948		
AAGTTGCTAT	0	2	0,280112028121948		
TTATTGTTCC	0	2	0,280112028121948		
AATAAAGTTG	0	2	0,280112028121948		
TTAGACATTA	0	2	0,280112028121948		
TTACTTCCCC	0	2	0,280112028121948		
AATCCAGGAG	0	2	0,280112028121948		
TTACCTTTTT	0	2	0,280112028121948		
CTCTGTGCTC	0	2	0,280112028121948		
TTCTGCACGT	0	2	0,280112028121948		
GAGTATGGAG	0	2	0,280112028121948		
TTTGCACCTT	0	2	0,280112028121948		
GACCTGACCC	0	2	0,280112028121948		
TTTGAATGA	0	2	0,280112028121948		
GAGATAAACA	0	2	0,280112028121948		
TTTATTTGGC	0	2	0,280112028121948		
GAGCTCCACA	0	2	0,280112028121948		
AAAGGGGGCA	0	2	0,280112028121948		
GACATTCTGC	0	2	0,280112028121948		
AAAGTCAGAA	0	2	0,280112028121948		
GAGGAGAAGA	0	2	0,280112028121948		
TTGGCCCAGA	0	2	0,280112028121948		
TTGTGCATGG	0	2	0,280112028121948		
GATGAGGGTG	0	2	0,280112028121948		
GACAAGATGC	0	2	0,280112028121948		
TTGGTCCCCT	0	2	0,280112028121948		
TTGGGGAAAC	0	2	0,280112028121948		
TTGGGCGAAT	0	2	0,280112028121948		
GATAGTTGTG	0	2	0,280112028121948		
GATCACAGTT	0	2	0,280112028121948		

GAATTTCCCA	0	2	0,280112028121948		
AACCGGCCAA	0	2	0,280112028121948		
GAATGTCCTT	0	2	0,280112028121948		
AATGACTGAA	0	2	0,280112028121948		
TTGTGATTAA	0	2	0,280112028121948		
TGGCCTAATA	0	2	0,280112028121948		
CTCCTGAAGG	0	2	0,280112028121948		
ACAGGGTGAC	0	2	0,280112028121948		
CTCCCTTGCC	0	2	0,280112028121948		
TGGGGGCACC	0	2	0,280112028121948		
GCCTTGCTCA	0	2	0,280112028121948		
TGGGGACTGG	0	2	0,280112028121948		
TGGGCCCGTG	0	2	0,280112028121948		
CTCATCTGCT	0	2	0,280112028121948		
TGGGCAGCTG	0	2	0,280112028121948		
TTACAGAGCT	0	2	0,280112028121948		
TGGCTAAATG	0	2	0,280112028121948		
CTCTGAGGTA	0	2	0,280112028121948		
TGGCCAGCTC	0	2	0,280112028121948		
TGGCCACAAA	0	2	0,280112028121948		
CTATATTAAC	0	2	0,280112028121948		
CTACAAGAAG	0	2	0,280112028121948		
ACCTTGTAAT	0	2	0,280112028121948		
CTAACGGGGC	0	2	0,280112028121948		
GCTAATAATG	0	2	0,280112028121948		
GCTAATAGTA	0	2	0,280112028121948		
GCTACCTTCT	0	2	0,280112028121948		
ACGAGCTGGA	0	2	0,280112028121948		
TGGGCAGCAG	0	2	0,280112028121948		
CTGCAGGGCC	0	2	0,280112028121948		
CTGGCCAGGC	0	2	0,280112028121948		
CTGGATGTGG	0	2	0,280112028121948		
CTGCTTTAGG	0	2	0,280112028121948		
GCCCACATCC	0	2	0,280112028121948		
TTAAAGGCCG	0	2	0,280112028121948		
CTGCTGCAGC	0	2	0,280112028121948		
TGTTGTGCGC	0	2	0,280112028121948		
GCCCATTGGA	0	2	0,280112028121948		
GCCCCGTTCC	0	2	0,280112028121948		
AATTCAATTA	0	2	0,280112028121948		
ACAGGCTACG	0	2	0,280112028121948		
TGTGCTAAAT	20	16	0,280112028121948		
GCCTGTGCCT	0	2	0,280112028121948		
TGTGCCACTA	0	2	0,280112028121948		
TGTGAGCCCT	0	2	0,280112028121948		
TGTCCTGGTT	0	2	0,280112028121948		

TGTAGTTTGA	0	2	0,280112028121948		
CTGAAAGGCT	0	2	0,280112028121948		
ACACCAATGC	0	2	0,280112028121948		
ACAGCCTGTA	0	2	0,280112028121948		
TGGTCTGGAG	0	2	0,280112028121948		
CTCTGATGCA	0	2	0,280112028121948		
CGTGGGTGGG	0	2	0,280112028121948		
CTGCGAGGTC	0	2	0,280112028121948		
TCACCAAAAA	0	2	0,280112028121948		
CCCAAGCTAG	0	2	0,280112028121948		
ATGGCAGCTG	0	2	0,280112028121948		
GTTGTTTATT	0	2	0,280112028121948		
AGGGCTGCAG	0	2	0,280112028121948		
ATGGAGACTT	0	2	0,280112028121948		
AGGGCTTCCT	0	2	0,280112028121948		
AGGTCCCTGG	0	2	0,280112028121948		
GTAGGTTGTC	0	2	0,280112028121948		
GTTGCGGAGG	0	2	0,280112028121948		
GTAGCAGGTG	0	2	0,280112028121948		
GGGCCAACCC	0	2	0,280112028121948		
GTAGCAGGGC	0	2	0,280112028121948		
GTTTGGGTTG	0	2	0,280112028121948		
GTTTGTGGTT	0	2	0,280112028121948		
CAGTGGGTGT	0	2	0,280112028121948		
ATGGTGCACA	0	2	0,280112028121948		
ATGCGGGAGA	0	2	0,280112028121948		
TACCCATAA	0	2	0,280112028121948		
CAGCGCTGCA	0	2	0,280112028121948		
TCATTGTAAT	0	2	0,280112028121948		
ATGGTGATGG	0	2	0,280112028121948		
GTGAAACCAT	0	2	0,280112028121948		
TCAGTTTGGA	0	2	0,280112028121948		
CCCCAGCCCC	0	2	0,280112028121948		
GTCTTTCTTG	0	2	0,280112028121948		
GTCACACCTC	0	2	0,280112028121948		
GTCTGTTGTG	0	2	0,280112028121948		
ATGGCCTCCT	0	2	0,280112028121948		
TCAGATGGCG	0	2	0,280112028121948		
CCCAGGACAC	0	2	0,280112028121948		
GTCTGCACCT	0	2	0,280112028121948		
CAGGACAGTT	0	2	0,280112028121948		
TCAGAGATGA	0	2	0,280112028121948		
TCACTTCCCT	0	2	0,280112028121948		
GTACTIONCAGT	0	2	0,280112028121948		
GGTGAAGACA	0	2	0,280112028121948		
TACTGTATGT	0	2	0,280112028121948		

AGTCAGCTGG	0	2	0,280112028121948		
TACAAAAGTG	0	2	0,280112028121948		
AGTGCCACGG	0	2	0,280112028121948		
ATACTGTCAG	0	2	0,280112028121948		
CCTGGAAGAG	0	2	0,280112028121948		
GGAGGTTGAG	0	2	0,280112028121948		
CAGTGATTC	0	2	0,280112028121948		
GGGGTATGGT	0	2	0,280112028121948		
TAGTTTGTGG	0	2	0,280112028121948		
ATAGTACAGC	0	2	0,280112028121948		
CCAACCTTGG	0	2	0,280112028121948		
CCACGGCACT	0	2	0,280112028121948		
GGGTTTGT	0	2	0,280112028121948		
TACCAGGAAC	0	2	0,280112028121948		
TACCAGTGTA	0	2	0,280112028121948		
ATCCGACCCA	0	2	0,280112028121948		
CCAACCGTGC	0	2	0,280112028121948		
TATCTGTCTA	0	2	0,280112028121948		
ATGCGGAGTC	0	2	0,280112028121948		
GGGCCGTCTT	0	2	0,280112028121948		
ATGCCTCTGC	0	2	0,280112028121948		
ATGATGGGCC	0	2	0,280112028121948		
GTACAGCTCT	0	2	0,280112028121948		
GTAATCCTGC	0	2	0,280112028121948		
TAACACTGAC	0	2	0,280112028121948		
TAAGTCTATA	0	2	0,280112028121948		
ATGACACTCA	0	2	0,280112028121948		
TAAGGCCATT	0	2	0,280112028121948		
GGTTTGTGTG	0	2	0,280112028121948		
CATTAACCAA	0	2	0,280112028121948		
TATAAGGTGG	0	2	0,280112028121948		
CCAGCGCAGC	0	2	0,280112028121948		
TAACTGGAGG	0	2	0,280112028121948		
GGGGATGGGG	0	2	0,280112028121948		
CAGCTGCAGT	0	2	0,280112028121948		
AGGTGCGGGG	0	2	0,280112028121948		
GTGATGGATG	0	2	0,280112028121948		
GTGAGACCTT	0	2	0,280112028121948		
CCCTGGTTCC	0	2	0,280112028121948		
CACCAGCATT	0	2	0,280112028121948		
TCTACTCAGC	0	2	0,280112028121948		
GTGCAACCCT	0	2	0,280112028121948		
GTGGGCCGGT	0	2	0,280112028121948		
CCGCTGTGCT	0	2	0,280112028121948		
AGGCCTGGCT	0	2	0,280112028121948		
GGCAATATGG	0	2	0,280112028121948		

GTGGGGGGGA	0	2	0,280112028121948		
CACCGGACAC	0	2	0,280112028121948		
AGCGCCTTCC	0	2	0,280112028121948		
GTGAGCTGGC	0	2	0,280112028121948		
GTGAGCCCAT	0	2	0,280112028121948		
GAGAAGACTT	0	2	0,280112028121948		
GGCCCGGCTT	0	2	0,280112028121948		
GGCCAAATCT	0	2	0,280112028121948		
AGCCACCACG	0	2	0,280112028121948		
TCTTTACTTG	0	2	0,280112028121948		
GTGGCACGCG	0	2	0,280112028121948		
CCTACTAGGA	0	2	0,280112028121948		
CCGTGGTCGT	0	2	0,280112028121948		
CAAGGGCTTG	0	2	0,280112028121948		
CAAGTGTGGA	0	2	0,280112028121948		
GTGCCAGTCG	0	2	0,280112028121948		
GTGGAATAAA	0	2	0,280112028121948		
AGCGAGAGAG	0	2	0,280112028121948		
GTGGAAGAAT	0	2	0,280112028121948		
CAATAAACTG	0	2	0,280112028121948		
TCTGGCATAG	0	2	0,280112028121948		
CAACTTTAGG	0	2	0,280112028121948		
AGCCATTGTG	0	2	0,280112028121948		
CAACGAAACC	0	2	0,280112028121948		
CAATTAAGT	0	2	0,280112028121948		
GGATGCTTCT	0	2	0,280112028121948		
AGGAACTGTA	0	2	0,280112028121948		
GTGTGATGCT	0	2	0,280112028121948		
AGCTGAGCTA	0	2	0,280112028121948		
AGGAGCAAAG	0	2	0,280112028121948		
CACTGCATAT	0	2	0,280112028121948		
ATTAATGAAT	0	2	0,280112028121948		
GTGAAATCCC	0	2	0,280112028121948		
CACCTGTAGT	0	2	0,280112028121948		
AGCTCCCAGA	0	2	0,280112028121948		
ATGTAGAGTG	0	2	0,280112028121948		
AGCGTGTGAT	0	2	0,280112028121948		
ATTCACCCCC	0	2	0,280112028121948		
AGCTGTCGTA	0	2	0,280112028121948		
AGGACAATGC	0	2	0,280112028121948		
TCCTGCTGGC	0	2	0,280112028121948		
ATTCAGACAG	0	2	0,280112028121948		
GTGAACCCAC	0	2	0,280112028121948		
CCGTCCAAGG	2	5	0,280898928642273		
AGGGTGTTTT	2	5	0,280898928642273		
CAGGAGACCC	2	5	0,280898928642273		

TGTTCTGGAG	2	5	0,280898928642273		
GGCTTTACCC	2	5	0,280898928642273		
ATCGGGCCCG	2	5	0,280898928642273		
GCTGGCTGGC	2	5	0,280898928642273		
TCGAAGCCCC	2	5	0,280898928642273		
GTGGTGCACG	2	5	0,280898928642273		
TTGCTGACTT	2	5	0,280898928642273		
GGAGGTGGGG	2	5	0,280898928642273		
ATCAAGGGTG	2	5	0,280898928642273		
CTCCCCTGCC	2	5	0,280898928642273		
CGGTTACTGT	7	4	0,283286094665527		
GGAAGGGGA	7	4	0,283286094665527		
TGGTTTTTGG	3	1	0,286532998085022		
GTGTGTA AAA	3	1	0,286532998085022		
TTTTGGGGGC	3	1	0,286532998085022		
CCACAGGAGA	3	1	0,286532998085022		
GAAGATGTGT	3	1	0,286532998085022		
CAGCTATTTTC	3	1	0,286532998085022		
ACACAGCAAAA	3	1	0,286532998085022		
GATGCTGCCA	3	1	0,286532998085022		
GGTGAAGAGG	3	1	0,286532998085022		
CCAAAGCTAT	3	1	0,286532998085022		
ATTGCGCCAC	3	1	0,286532998085022		
GCAGGCGGCT	3	1	0,286532998085022		
GCAGTGCCAC	3	1	0,286532998085022		
GTGGGTTGGC	3	1	0,286532998085022		
GATATCAGTC	3	1	0,286532998085022		
TTGTCTGCCT	3	1	0,286532998085022		
GTGACTGCCA	3	1	0,286532998085022		
CTGGGCGTGT	3	1	0,286532998085022		
ATGAGCTGAC	3	1	0,286532998085022		
TTGACCAGGC	3	1	0,286532998085022		
ATCGTGGCGG	3	1	0,286532998085022		
GAGGATGGTG	3	1	0,286532998085022		
TACATCCGAA	3	1	0,286532998085022		
GTCTCCGGGA	3	1	0,286532998085022		
GTGCTATTAT	3	1	0,286532998085022		
GTTCACTGCA	3	1	0,286532998085022		
CAGAGATGAA	3	1	0,286532998085022		
GTGATGGGGC	3	1	0,286532998085022		
ATGGTGCCAC	3	1	0,286532998085022		
ACA ACTCAAT	3	1	0,286532998085022		
GGTGAGACCT	3	1	0,286532998085022		
TTGCCAGAC	3	1	0,286532998085022		
GTGGTGGCGG	3	1	0,286532998085022		
TGGGGCCGCA	3	1	0,286532998085022		

GGCCCGAGTT	3	1	0,286532998085022		
GCGAGACCCC	3	1	0,286532998085022		
TGAATGGCCT	3	1	0,286532998085022		
GCTAAGGAGA	3	1	0,286532998085022		
GGAGCTCTGT	3	1	0,286532998085022		
AGGAGCTGCT	3	1	0,286532998085022		
CGCACCATTG	3	1	0,286532998085022		
AGCCTGGGCC	3	1	0,286532998085022		
GGGGGTGGAT	3	1	0,286532998085022		
TGCAATATGG	3	1	0,286532998085022		
TAGACTAGCA	3	1	0,286532998085022		
GGGCAGGGCA	3	1	0,286532998085022		
GGCCTGCTGC	3	1	0,286532998085022		
CCAGGCACGC	3	1	0,286532998085022		
ACTTTTTCAC	3	1	0,286532998085022		
GGGCCCAAAA	3	1	0,286532998085022		
CCCCTCCCTC	3	1	0,286532998085022		
TGGAGGCCAG	3	1	0,286532998085022		
CGGAGGTGGG	3	1	0,286532998085022		
TGGAGCAGTT	3	1	0,286532998085022		
CCGGCCCTAC	3	1	0,286532998085022		
CGACCGTGGC	3	1	0,286532998085022		
CGCTGTTCC	19	16	0,289855122566223		
TAAGGAGCTG	33	28	0,292397618293762		
TGGAGTGGAG	1	3	0,301204800605774		
TCACAGCTGT	1	3	0,301204800605774		
ATGTGTAACG	1	3	0,301204800605774		
GAGGGAGTTT	59	55	0,301204800605774		
GAGCGGGATC	1	3	0,301204800605774		
ACCTTGTGCC	1	3	0,301204800605774		
AGGATGTGGG	1	3	0,301204800605774		
TCAGTGAACG	1	3	0,301204800605774		
TGCCTGTAGT	1	3	0,301204800605774		
TTGCCGGTTA	1	3	0,301204800605774		
GCAACTGTGA	1	3	0,301204800605774		
GCAACGGGCC	1	3	0,301204800605774		
CGGACTCACT	1	3	0,301204800605774		
AAAGTGGCTA	1	3	0,301204800605774		
GGGAGCCCGG	1	3	0,301204800605774		
CGGATAACCA	1	3	0,301204800605774		
CGCCGACGAT	1	3	0,301204800605774		
CGGCCCAACG	1	3	0,301204800605774		
CAGCACAGAC	1	3	0,301204800605774		
GCTCTCCCCC	1	3	0,301204800605774		
GTCCAACAAC	1	3	0,301204800605774		
CCCCCGTGAA	1	3	0,301204800605774		

GTGGCGGTTG	1	3	0,301204800605774		
CCTGGTCCCA	1	3	0,301204800605774		
GGGCAAGCCA	1	3	0,301204800605774		
ATGACTGTAC	1	3	0,301204800605774		
GATTTTGTAG	1	3	0,301204800605774		
GACCACCTTT	1	3	0,301204800605774		
TTGTGATGTA	1	3	0,301204800605774		
AATGATGGGG	1	3	0,301204800605774		
GGGCTGGGCC	1	3	0,301204800605774		
AGCCACTGTG	1	3	0,301204800605774		
TAATAAATGT	1	3	0,301204800605774		
AGCGCTGATG	1	3	0,301204800605774		
AGAATTGCTT	1	3	0,301204800605774		
TCCTCCCTCC	1	3	0,301204800605774		
GTGCTGGTGC	1	3	0,301204800605774		
AGTGACAGAG	1	3	0,301204800605774		
GCTTTATTTG	1	3	0,301204800605774		
CTGGGACTGA	1	3	0,301204800605774		
GACACCTCCT	1	3	0,301204800605774		
TAATGGTAAC	1	3	0,301204800605774		
TTGTCCAGAG	1	3	0,301204800605774		
CATCCTGCTG	1	3	0,301204800605774		
GTAAAACCCC	1	3	0,301204800605774		
GTGGCCAGAG	1	3	0,301204800605774		
ACTTTCACAA	1	3	0,301204800605774		
TGTATGAATT	1	3	0,301204800605774		
CTGGCAGATT	1	3	0,301204800605774		
ATCAAGTTCG	1	3	0,301204800605774		
AACCCGGGAG	17	13	0,301204800605774		
GGTAGCCTGG	1	3	0,301204800605774		
GTGAAGGCAG	27	24	0,303030252456665		
AAGGGCAGTG	3	6	0,303951382637024		
TTCTTGTGGC	3	6	0,303951382637024		
TGTGATCAGA	3	6	0,303951382637024		
GTAGGGGTAA	3	6	0,303951382637024		
TACTCTTGGC	3	6	0,303951382637024		
GTCTGGGGCT	6	9	0,307692289352417		
TTGGCAGCCC	6	9	0,307692289352417		
TTACCATATC	5	8	0,310559034347534		
GGTTCAAGGC	4	2	0,315457463264465		
TGCCTGCACC	4	2	0,315457463264465		
TACCTCTGAT	4	2	0,315457463264465		
AACCCAGGAG	17	14	0,315457463264465		
GGGCAGCTGG	4	2	0,315457463264465		
CGACCCACCG	4	2	0,315457463264465		
GAGCCTTGGT	4	2	0,315457463264465		

ATTATTTTTTC	4	2	0,315457463264465		
CTGGAGGCTG	4	2	0,315457463264465		
CCTGTAGTCT	4	2	0,315457463264465		
CCACTGCTCT	4	2	0,315457463264465		
TGCTGTGCAT	4	2	0,315457463264465		
CGGCTGGTGA	4	2	0,315457463264465		
ATCGCACCAC	4	2	0,315457463264465		
GTGGCACGCA	4	2	0,315457463264465		
GTGGTACAGG	4	2	0,315457463264465		
ACAGTGCTTG	4	2	0,315457463264465		
ACTTGAGGCC	4	2	0,315457463264465		
CCACTGTACT	4	2	0,315457463264465		
GCTGCTGCGC	2	4	0,320512771606445		
GTGTGGTGGT	2	4	0,320512771606445		
GGCCCACACC	2	4	0,320512771606445		
GGCCCCGGAC	2	4	0,320512771606445		
CGATGGTCCC	2	4	0,320512771606445		
TGCAGCACGA	2	4	0,320512771606445		
AGCTGTTCTG	2	4	0,320512771606445		
TCACTGCACT	2	4	0,320512771606445		
TGAGGCCTCT	2	4	0,320512771606445		
GAGCGGGATG	2	4	0,320512771606445		
GCGCAGAGGT	15	19	0,320512771606445		
TGCTGAATCA	2	4	0,320512771606445		
GGGCCGTGGG	2	4	0,320512771606445		
TGTGTGCCAC	2	4	0,320512771606445		
CCAGGAGGAA	2	4	0,320512771606445		
TCTCTGATGC	2	4	0,320512771606445		
CCACTGCACA	2	4	0,320512771606445		
CTTGAGCAAT	2	4	0,320512771606445		
TGGTTTTGGC	2	4	0,320512771606445		
TGGTTTGCCT	2	4	0,320512771606445		
TCTTGTGCAT	2	4	0,320512771606445		
GTTTGGCAGT	2	4	0,320512771606445		
GCCCAGGTCA	11	15	0,323624610900879		
TGCCCTCAGG	6	4	0,326797366142273		
TGTCATCACA	6	4	0,326797366142273		
GTGACCTCCT	6	4	0,326797366142273		
GATGACCCCC	6	4	0,326797366142273		
TGAGGCCAGG	6	4	0,326797366142273		
TTGGCCAGGA	6	4	0,326797366142273		
TGGGCAAAGC	25	22	0,33003294467926		
GTGCTGAATG	25	21	0,331125855445862		
GTGCACTGAG	31	28	0,332225918769836		
GCCGAGGAAG	7	5	0,336700320243835		
ACCTGTATCC	7	5	0,336700320243835		

GGGCATCTCT	7	5	0,336700320243835		
GTGGCGTGCA	5	3	0,340136051177979		
GCACTCCAGC	5	3	0,340136051177979		
TGGCCCCACC	5	3	0,340136051177979		
GAGGCCATCC	5	3	0,340136051177979		
GAAACCGAGG	5	3	0,340136051177979		
CCTATTTACT	5	3	0,340136051177979		
CCACCCCGAA	5	3	0,340136051177979		
CTGGGTTAAT	28	33	0,340136051177979		
GGTTTGGCTT	5	3	0,340136051177979		
TGCATCTGGT	13	16	0,350877165794373		
ATTTGAGAAG	13	17	0,354609966278076		
AAGGTGGAGG	19	23	0,359712243080139		
AGCAGGGCTC	3	5	0,371747255325317		
GTGGGGGGAG	3	5	0,371747255325317		
AGTAGGTGGC	3	5	0,371747255325317		
GGGCCAGGGG	3	5	0,371747255325317		
GGTTGGCAGG	3	5	0,371747255325317		
GCCAGCCAGT	3	5	0,371747255325317		
ACCTCAGGAA	3	5	0,371747255325317		
CTCATAGCAG	4	6	0,383141756057739		
GGGGACTGAA	4	6	0,383141756057739		
CCCCCTGCAG	4	6	0,383141756057739		
CCCTGGGTTC	4	6	0,383141756057739		
TGGAATGCTG	14	12	0,383141756057739		
TGTGTTGAGA	14	12	0,383141756057739		
CCACCGCACT	5	7	0,392156839370728		
GCCCTCGGCC	5	7	0,392156839370728		
TTGCCAGGC	5	7	0,392156839370728		
CCAGGGGAGA	5	7	0,392156839370728		
CTGCTATACG	5	7	0,392156839370728		
TTGGTGAAGG	30	28	0,393700838088989		
GCCTGCTGGG	9	12	0,396825432777405		
GTGGCGGGCA	9	12	0,396825432777405		
CAGGCCCCAC	6	8	0,40816330909729		
GCCAGCCCAG	6	8	0,40816330909729		
GTGGCACGTG	8	6	0,418410062789917		
CTGTTGGTGA	8	6	0,418410062789917		
GCCTGTATGA	11	9	0,436681270599365		
GCCGTGTCCG	12	11	0,442477822303772		
TGGCCCCAGG	10	12	0,442477822303772		
CACCTAATTG	24	27	0,454545497894287		
TCAGATCTTT	15	17	0,458715558052063		
GTGGCAGGTG	11	10	0,473933696746826		
AATGCAGGCA	2	3	0,478468894958496		
CATTGCCTTC	2	3	0,478468894958496		

CCACTACACT	2	3	0,478468894958496		
CAAGCAGGAC	2	3	0,478468894958496		
CCGTGCTCAT	2	3	0,478468894958496		
CTGCACTTAC	2	3	0,478468894958496		
CCGCTTCTGC	4	3	0,478468894958496		
CCACTGCACC	4	3	0,478468894958496		
AGGCCAAGGG	2	3	0,478468894958496		
AGCTGTCCCC	2	3	0,478468894958496		
AACGCGGCCA	10	9	0,478468894958496		
CGCCACCACG	2	3	0,478468894958496		
GACAGTGACG	4	3	0,478468894958496		
AGGAGGGAGG	2	3	0,478468894958496		
GACATATGTA	2	3	0,478468894958496		
CTCAACAGCA	4	3	0,478468894958496		
AGCCTGGACT	4	3	0,478468894958496		
AATCTGCGCC	2	3	0,478468894958496		
AACTCTTGAA	2	3	0,478468894958496		
AGCCCTCCCT	4	3	0,478468894958496		
CAAGGATCTA	2	3	0,478468894958496		
ATGGCGATCT	2	3	0,478468894958496		
CTTCCAGCTA	2	3	0,478468894958496		
CTGTGCCCAG	2	3	0,478468894958496		
AAGAAGATAG	2	3	0,478468894958496		
AACTAACAAA	4	3	0,478468894958496		
GCCTGTACAA	2	3	0,478468894958496		
GTGCTGATTC	2	3	0,478468894958496		
GTGGCACACA	2	3	0,478468894958496		
GCGGGGTACC	2	3	0,478468894958496		
GTGGGCCGCT	2	3	0,478468894958496		
GGCCCACTAG	2	3	0,478468894958496		
GTGTCCCTGT	4	3	0,478468894958496		
GCGACCGTCA	2	3	0,478468894958496		
GTGTGTGGTG	2	3	0,478468894958496		
GTGTTAACCA	4	3	0,478468894958496		
GTGTTGGGGG	4	3	0,478468894958496		
TGGCTGTGTG	2	3	0,478468894958496		
GGAGGCCGAG	2	3	0,478468894958496		
TTCAATAAAA	4	3	0,478468894958496		
GCAAGACCCC	2	3	0,478468894958496		
TGGGGATTAC	2	3	0,478468894958496		
GCACAAGAAG	2	3	0,478468894958496		
TGATTTCACT	2	3	0,478468894958496		
GGGGCAGGGC	2	3	0,478468894958496		
TACAGAGGGA	2	3	0,478468894958496		
TACCCTAGAA	2	3	0,478468894958496		
TACTGCTCGG	2	3	0,478468894958496		

GCAGACCCAC	2	3	0,478468894958496		
TCTGTCAAGA	2	3	0,478468894958496		
TCTCCAGGAA	4	3	0,478468894958496		
TCGTAACGAG	2	3	0,478468894958496		
GCATTTAAAT	2	3	0,478468894958496		
GGGATGGCAG	4	3	0,478468894958496		
TCCCGTACAT	4	3	0,478468894958496		
TGGAAGGGCT	2	3	0,478468894958496		
GCTGTAGGGG	2	3	0,478468894958496		
GCTTCCATCT	2	3	0,478468894958496		
GCTTAACCTG	4	3	0,478468894958496		
GTGAGACCCC	2	3	0,478468894958496		
GCTCAGCTGG	4	3	0,478468894958496		
GTCTTAACTC	2	3	0,478468894958496		
AGCTCTCCCT	18	20	0,485436916351318		
AGGTGGCAAG	5	6	0,490196108818054		
CAAACGTGT	5	6	0,490196108818054		
GCTGCGGCCG	5	6	0,490196108818054		
ACTGGTACGT	5	6	0,490196108818054		
CACTTGCCCT	5	6	0,490196108818054		
TTCACTGTGA	16	18	0,490196108818054		
GCCTTCCAAT	6	5	0,492610812187195		
CTGAGCTGTA	1	2	0,495049476623535		
GCTGGGAGGG	1	2	0,495049476623535		
ATCACACCAC	1	2	0,495049476623535		
GTCAAGGAGT	1	2	0,495049476623535		
TAGACCCCTT	1	2	0,495049476623535		
GCCGCCATCT	1	2	0,495049476623535		
GTCTCACGTG	1	2	0,495049476623535		
ATAGACATAA	1	2	0,495049476623535		
GTCTGAGCTC	1	2	0,495049476623535		
ATCGTTGTAA	1	2	0,495049476623535		
CTGAGACACC	1	2	0,495049476623535		
ATGATGAGGC	1	2	0,495049476623535		
GTCTGACCCC	1	2	0,495049476623535		
AGGTCCACCA	1	2	0,495049476623535		
TCCCTGGCAT	1	2	0,495049476623535		
GTAACAAGC	1	2	0,495049476623535		
AGGAGCCTCA	1	2	0,495049476623535		
CAGGGCTCGC	1	2	0,495049476623535		
TAAACCGGAA	1	2	0,495049476623535		
AGGATGGCGG	1	2	0,495049476623535		
GTAGTCCAAA	1	2	0,495049476623535		
TCAGCTGGCC	1	2	0,495049476623535		
GCCCGCCTTG	5	4	0,495049476623535		
GGGCCTGGGG	1	2	0,495049476623535		

TAGATAAGAC	1	2	0,495049476623535		
CTGCTGCAGG	1	2	0,495049476623535		
GGGGATTGG	1	2	0,495049476623535		
AGGTTTTGTT	1	2	0,495049476623535		
CAGGCTGCTG	1	2	0,495049476623535		
GTGAAACCCA	1	2	0,495049476623535		
GCCCCGAGCC	1	2	0,495049476623535		
GTGACGTGCA	1	2	0,495049476623535		
GGGGCAGCCC	1	2	0,495049476623535		
AGGGCCCTCA	1	2	0,495049476623535		
GCTTTTAAGG	1	2	0,495049476623535		
GTTGGTCTGT	1	2	0,495049476623535		
GTGGTGCCAG	1	2	0,495049476623535		
CTCACCGCCC	1	2	0,495049476623535		
GTGAGTCTCC	1	2	0,495049476623535		
ATTGATCTTG	1	2	0,495049476623535		
GGGTTGACTT	1	2	0,495049476623535		
GCGGCGGCTC	1	2	0,495049476623535		
GGGGCTTAGG	1	2	0,495049476623535		
ATGTGGCACA	1	2	0,495049476623535		
CAAACCTAACC	1	2	0,495049476623535		
GCCAACTTG	1	2	0,495049476623535		
CAATGCTGCC	5	4	0,495049476623535		
CCACGAGGTG	1	2	0,495049476623535		
CCAATGCACT	1	2	0,495049476623535		
CCACACCGGT	1	2	0,495049476623535		
GCTAGGTTTA	1	2	0,495049476623535		
CGTGGGGTGG	5	4	0,495049476623535		
CGTGCCGCCT	1	2	0,495049476623535		
GCTATGCTCC	1	2	0,495049476623535		
ATTTGTCCCA	1	2	0,495049476623535		
GGGGCTGGAG	1	2	0,495049476623535		
ATGGATGCAC	1	2	0,495049476623535		
GCCTTGATCT	1	2	0,495049476623535		
GTTGGATAGG	1	2	0,495049476623535		
GCTCACACCA	1	2	0,495049476623535		
CAGCCCCAAA	1	2	0,495049476623535		
GGAACAGTTG	1	2	0,495049476623535		
CTCTAAGAAG	1	2	0,495049476623535		
GCCTGTGCTG	1	2	0,495049476623535		
ATTATCCAGG	1	2	0,495049476623535		
ATGGCGGGTG	1	2	0,495049476623535		
GGAAGGGAGG	1	2	0,495049476623535		
GCCTTCCAAC	1	2	0,495049476623535		
CAGAGGAACG	1	2	0,495049476623535		
CTCCCCGCGA	1	2	0,495049476623535		

CTGGGAGAGG	1	2	0,495049476623535		
AGGAGCGGGG	1	2	0,495049476623535		
CACTGTGTTG	1	2	0,495049476623535		
GCGACACCAG	1	2	0,495049476623535		
CCTTTGAACA	1	2	0,495049476623535		
GTGAAACTGT	1	2	0,495049476623535		
AAGGCACAGA	1	2	0,495049476623535		
GGAGCCAGCT	1	2	0,495049476623535		
GCAAGAATTT	1	2	0,495049476623535		
AAGTTGGGCT	1	2	0,495049476623535		
TTATGGGATC	1	2	0,495049476623535		
TTCACAGTGG	1	2	0,495049476623535		
GAAACAAGAT	1	2	0,495049476623535		
TTGATGCCCG	1	2	0,495049476623535		
GAGCTGCTTA	1	2	0,495049476623535		
GGCTGGGCCT	1	2	0,495049476623535		
GGCCAGGAAG	1	2	0,495049476623535		
ACTCAGAAGA	1	2	0,495049476623535		
ACTCTAGACA	1	2	0,495049476623535		
ACTGAGGTGC	1	2	0,495049476623535		
AAGATGCACA	1	2	0,495049476623535		
CCCTCACTCC	1	2	0,495049476623535		
AAGGTAACAG	1	2	0,495049476623535		
GATGAGTCTC	1	2	0,495049476623535		
TGGTTTGAGC	1	2	0,495049476623535		
GGCCCTGGTG	1	2	0,495049476623535		
AATCCCCTC	1	2	0,495049476623535		
AATGGCATTG	1	2	0,495049476623535		
AGCTGTTTCT	1	2	0,495049476623535		
GATGAGGAGA	1	2	0,495049476623535		
GCAACTTAGA	1	2	0,495049476623535		
GAGTCAGCAT	1	2	0,495049476623535		
AAGTTTGCCT	1	2	0,495049476623535		
GGCTGCCCTG	1	2	0,495049476623535		
GATGCGCTTG	1	2	0,495049476623535		
ACCCAATTTG	1	2	0,495049476623535		
TTAGATCGTT	1	2	0,495049476623535		
GGAGGCAGAG	1	2	0,495049476623535		
TGGCAGTCTG	1	2	0,495049476623535		
CCCTGGTGGG	1	2	0,495049476623535		
TTACCGTCCC	1	2	0,495049476623535		
AAACCCCAAT	1	2	0,495049476623535		
CCGTGACTCT	1	2	0,495049476623535		
AAAGTGAAGA	1	2	0,495049476623535		
GACTCTGGGA	1	2	0,495049476623535		
TCTGCAATGA	1	2	0,495049476623535		

GAGACAGCAC	1	2	0,495049476623535		
CTGGTCCTCC	1	2	0,495049476623535		
CCGCCCCAG	1	2	0,495049476623535		
TTTAATAAGT	1	2	0,495049476623535		
AGCCACCGTG	1	2	0,495049476623535		
GACTTGGAGG	1	2	0,495049476623535		
AGCCGGGATG	1	2	0,495049476623535		
TTTCTGCTCC	1	2	0,495049476623535		
GGGATCGCCC	1	2	0,495049476623535		
TTTGAATCAG	1	2	0,495049476623535		
TTTGTGACTG	1	2	0,495049476623535		
CCATTCTCCT	1	2	0,495049476623535		
TCTGACCACC	1	2	0,495049476623535		
TGAAGGATGC	1	2	0,495049476623535		
CCCCCACAG	1	2	0,495049476623535		
AACTCTCAAT	1	2	0,495049476623535		
TGATCTCCAA	1	2	0,495049476623535		
TGACCTCCAG	1	2	0,495049476623535		
TTGGTGTATG	1	2	0,495049476623535		
TCTGGTTTGT	1	2	0,495049476623535		
AGAGCCAAGT	1	2	0,495049476623535		
ACAGACAGCA	1	2	0,495049476623535		
AGAGGTGGTG	1	2	0,495049476623535		
GGAGCACTGT	1	2	0,495049476623535		
AACAGTCAAA	1	2	0,495049476623535		
AGCAGTCCAA	1	2	0,495049476623535		
GAGAGCCCCT	1	2	0,495049476623535		
TCTGTGCTCA	1	2	0,495049476623535		
CCCATCGCCC	1	2	0,495049476623535		
GCTCCCAGAC	9	8	0,502512574195862		
GAGACTCCTG	6	7	0,502512574195862		
GTGTGGGGGG	6	7	0,502512574195862		
GGGGAAATCG	6	7	0,502512574195862		
TTGTAATCGT	7	8	0,510204076766968		
CTAAGACTTC	7	8	0,510204076766968		
TTCCACTAAC	3	2	0,520833373069763		
ATGACTCAAG	3	2	0,520833373069763		
GTGGTGGGTG	3	2	0,520833373069763		
CCTCCCTGAT	3	2	0,520833373069763		
GCGAGCAGCG	3	2	0,520833373069763		
GCTCCGAGCG	3	2	0,520833373069763		
TGCAGATATT	3	2	0,520833373069763		
GGGACGAGTG	3	2	0,520833373069763		
GGCAAGAAGA	3	2	0,520833373069763		
TAGGCCCAAG	3	2	0,520833373069763		
ATGAAACCCC	3	2	0,520833373069763		

TTGTGGTTAA	3	2	0,520833373069763		
AGCCACTGCG	3	2	0,520833373069763		
GCTGCTCCCT	3	2	0,520833373069763		
TCACAGTGCC	3	2	0,520833373069763		
TTTGGGCCTA	3	2	0,520833373069763		
TCCGTGGTTG	3	2	0,520833373069763		
GTAAGTGAC	3	2	0,520833373069763		
TTTGTGTCAC	3	2	0,520833373069763		
AGTTTCTTGT	3	2	0,520833373069763		
CTCTCACCT	3	2	0,520833373069763		
ACAGCGGCAA	3	2	0,520833373069763		
GGAGTGTGCT	3	2	0,520833373069763		
TGCTTCATCT	3	2	0,520833373069763		
GATCAGGCCA	3	2	0,520833373069763		
GGCCATCTCT	3	2	0,520833373069763		
GCAAGACCT	3	2	0,520833373069763		
GGAGTCATTG	3	2	0,520833373069763		
TGGAAGTGT	3	2	0,520833373069763		
GAGGCTGAGG	3	2	0,520833373069763		
GCGGTGAGGT	3	2	0,520833373069763		
CCACTGCAGT	3	2	0,520833373069763		
CCCGCCTCTT	2	1	0,52910053730011		
GGGCCGAAAA	2	1	0,52910053730011		
GGGAGGGAAG	2	1	0,52910053730011		
GTACCCGGAC	2	1	0,52910053730011		
CCCACACTAC	2	1	0,52910053730011		
GGGGTTCGGG	2	1	0,52910053730011		
CCGGAATGTG	2	1	0,52910053730011		
GGCTGCCTGC	2	1	0,52910053730011		
GGGCCAATAA	2	1	0,52910053730011		
GGCCCATATG	2	1	0,52910053730011		
CCAGTACAGC	2	1	0,52910053730011		
CCCAGCCACA	2	1	0,52910053730011		
GGGGCCCCCT	2	1	0,52910053730011		
GGGGTCCCTC	2	1	0,52910053730011		
CCACTGCGCT	2	1	0,52910053730011		
GGTGGCAGAG	2	1	0,52910053730011		
CCGAGGCTTG	2	1	0,52910053730011		
GGGAGAGATT	2	1	0,52910053730011		
GGGAAACCTT	2	1	0,52910053730011		
GGTCTGGCTA	2	1	0,52910053730011		
GGGTGTGGTG	2	1	0,52910053730011		
GGCCAACTAA	2	1	0,52910053730011		
GGCCACGTAG	2	1	0,52910053730011		
GGGGCGGGGT	2	1	0,52910053730011		
GGTTGGTGGT	2	1	0,52910053730011		

AGACCCACAA	2	1	0,52910053730011		
TGGCTAGTGT	2	1	0,52910053730011		
TGGCGTGGCC	2	1	0,52910053730011		
TGGATCCTCG	2	1	0,52910053730011		
ACGCAGGGAG	2	1	0,52910053730011		
TGCTGTGACC	2	1	0,52910053730011		
ACTTTGAATG	2	1	0,52910053730011		
TCCTCCAAGG	2	1	0,52910053730011		
AGACCAAAGT	2	1	0,52910053730011		
ACAGCCTGCA	2	1	0,52910053730011		
TGAACCCAGG	2	1	0,52910053730011		
TGAAAGTGTG	2	1	0,52910053730011		
AGCCCAGGAG	2	1	0,52910053730011		
AGCCCGGGAG	2	1	0,52910053730011		
AGCCTGTTGC	2	1	0,52910053730011		
GTTTTTGCTT	2	1	0,52910053730011		
TGATGGGCAT	2	1	0,52910053730011		
AAGGTAATGC	2	1	0,52910053730011		
TTTGCTGCC	2	1	0,52910053730011		
AAAGTTTAAT	2	1	0,52910053730011		
AACAGATATT	2	1	0,52910053730011		
TTGCGTGCTG	2	1	0,52910053730011		
AAGAGCCAAG	2	1	0,52910053730011		
AAGCACTGTT	2	1	0,52910053730011		
TGGCTGGGAA	2	1	0,52910053730011		
AAGGAGAAGG	2	1	0,52910053730011		
TGGGGAGCTC	2	1	0,52910053730011		
TTACGAGGAA	2	1	0,52910053730011		
TAAATGCTC	2	1	0,52910053730011		
ACAATATCGA	2	1	0,52910053730011		
TGTCCCAGCC	2	1	0,52910053730011		
ACACTGCACT	2	1	0,52910053730011		
TGGTGGGGTG	2	1	0,52910053730011		
TCCGAGCCCC	2	1	0,52910053730011		
TTCTCAGGCC	2	1	0,52910053730011		
GTGACAACAC	2	1	0,52910053730011		
GTGGAGCACG	2	1	0,52910053730011		
GTGCTGGTCA	2	1	0,52910053730011		
CACAGAGTCC	2	1	0,52910053730011		
CACCACCACA	2	1	0,52910053730011		
CACCACGGTG	2	1	0,52910053730011		
GTGCCATATT	2	1	0,52910053730011		
AGCCTTTGTT	2	1	0,52910053730011		
CACCTGTCAT	2	1	0,52910053730011		
ATTGGACACA	2	1	0,52910053730011		
CAGATCTTTG	2	1	0,52910053730011		

GTGAACCCTT	2	1	0,52910053730011		
CAGCCTTGGA	2	1	0,52910053730011		
CAGTCTCTCA	2	1	0,52910053730011		
GTAGACACCT	2	1	0,52910053730011		
GTA CTGTATG	2	1	0,52910053730011		
GTGCCAGCCC	2	1	0,52910053730011		
ATGAAACCCT	2	1	0,52910053730011		
TCCCCGTAAT	2	1	0,52910053730011		
AGGCATTTTA	2	1	0,52910053730011		
AGGCTCCTGG	2	1	0,52910053730011		
TCACCTGAAA	2	1	0,52910053730011		
TCAAGTTCAC	2	1	0,52910053730011		
TATAGCTGAG	2	1	0,52910053730011		
CAACGTCCTG	2	1	0,52910053730011		
TACACGTGAG	2	1	0,52910053730011		
GTGGCTCAGG	2	1	0,52910053730011		
TAAACTGTTT	2	1	0,52910053730011		
ATGCTAGAAA	2	1	0,52910053730011		
ATGGAAGGTG	2	1	0,52910053730011		
ATGGCCATAG	2	1	0,52910053730011		
GTTCTCAGC	2	1	0,52910053730011		
ATGGCTGGGC	2	1	0,52910053730011		
GTACCGAGGG	2	1	0,52910053730011		
AGTTTGTTAG	2	1	0,52910053730011		
GAGTGGGGGC	2	1	0,52910053730011		
GGAGCAGGCT	2	1	0,52910053730011		
GAGCAGGAGC	2	1	0,52910053730011		
CCTGCTGCAG	2	1	0,52910053730011		
CTGGGCCAGC	2	1	0,52910053730011		
GCCCGTGCCA	2	1	0,52910053730011		
GCCCTGGGGC	2	1	0,52910053730011		
CCTGTCCAGT	2	1	0,52910053730011		
CCTGTCCTGC	2	1	0,52910053730011		
GCTTTGATGA	2	1	0,52910053730011		
GACAGGCTGG	2	1	0,52910053730011		
CCTCTTCAGG	2	1	0,52910053730011		
GCTGTGCCTG	2	1	0,52910053730011		
GCAGTGGCCT	2	1	0,52910053730011		
GCCGGGTGGG	2	1	0,52910053730011		
GAATCCA ACT	2	1	0,52910053730011		
GCTGAACGCG	2	1	0,52910053730011		
GCTCTGCCAG	2	1	0,52910053730011		
GCACCTCCTA	2	1	0,52910053730011		
GCAAAACCAG	2	1	0,52910053730011		
GCCTTAACAA	2	1	0,52910053730011		
GCCTTCGGCG	2	1	0,52910053730011		

GCGGTGGGTT	2	1	0,52910053730011		
GCACCTATTG	2	1	0,52910053730011		
GCAAGGTCAG	2	1	0,52910053730011		
GCAGTGC ACT	2	1	0,52910053730011		
GGATACAACA	2	1	0,52910053730011		
GGACCACTGA	23	25	0,534759402275085		
CCTGTAATCC	23	24	0,537634372711182		
TTGGTCAGGC	9	10	0,537634372711182		
GCTGCACCGG	3	4	0,546448111534119		
GGCAGAGGAC	3	4	0,546448111534119		
GCTGGGACAG	3	4	0,546448111534119		
GGGAGCCCCT	3	4	0,546448111534119		
CCCATCATCC	3	4	0,546448111534119		
TTAACCCCTC	3	4	0,546448111534119		
GTGACAGAAG	3	4	0,546448111534119		
TAACCAATCA	3	4	0,546448111534119		
TGTGGGTGCT	3	4	0,546448111534119		
CAGCAGAAGC	3	4	0,546448111534119		
GAGAAACCCT	3	4	0,546448111534119		
CGCCTGTAGT	3	4	0,546448111534119		
TAACTTGTGA	3	4	0,546448111534119		
GGCTCCCACT	3	4	0,546448111534119		
GACCGCAGGA	3	4	0,546448111534119		
CAAACCATCC	7	6	0,549450516700745		
GACATCAAGT	4	5	0,555555582046509		
GAGAACCGTA	4	5	0,555555582046509		
GTGAAACCTC	4	5	0,555555582046509		
GCGAAACCCT	8	8	0,555555582046509		
TGGTACACGT	4	5	0,555555582046509		
AGGGCTTCCA	29	30	0,558659195899963		
GCTGCCCTTG	7	7	0,564971804618835		
GGAATGTACG	10	10	0,568181872367859		
GTGGATGGAC	5	5	0,578034639358521		
GGAAAACAGA	5	5	0,578034639358521		
TCAGACGCAG	5	5	0,578034639358521		
GTGGCGGGCG	5	5	0,578034639358521		
CCTGGGAAGT	5	5	0,578034639358521		
TGGGGAGAGG	5	5	0,578034639358521		
GCCAGGGCGG	5	5	0,578034639358521		
ACTTACCTGC	5	5	0,578034639358521		
GGGGGTCACC	5	5	0,578034639358521		
TCGCCGCGAC	5	5	0,578034639358521		
GTTCTGTCCA	11	11	0,595238089561462		
CGATTCTGGA	4	4	0,649350643157959		
CTGCCAACTT	4	4	0,649350643157959		
TTTCCTCTCA	4	4	0,649350643157959		

CAATGTGTTA	4	4	0,649350643157959		
TGTGCTCGGG	4	4	0,649350643157959		
CTGTTAGTGT	4	4	0,649350643157959		
GACGCGGCGC	4	4	0,649350643157959		
GCAAAACCCC	6	6	0,649350643157959		
AGTGCAAGAC	4	4	0,649350643157959		
TGATGTCTGG	4	4	0,649350643157959		
AATATGTGGG	6	6	0,649350643157959		
GGGATCAAGG	4	4	0,649350643157959		
TTGGCCAGGC	23	23	0,666666626930237		
GTGGCGTGTG	3	3	0,671140909194946		
GTGGCATCAC	3	3	0,671140909194946		
GGGGGACGGC	3	3	0,671140909194946		
GTATTGGCCT	3	3	0,671140909194946		
GTGGTGGGCG	3	3	0,671140909194946		
TTGGACCTGG	3	3	0,671140909194946		
GGCTGATGTG	3	3	0,671140909194946		
ATTGTGCCAC	3	3	0,671140909194946		
CTCCACCCGA	15	15	0,671140909194946		
AGCCACCACA	3	3	0,671140909194946		
TGCTGGGTGG	3	3	0,671140909194946		
AGCCACTGCA	3	3	0,671140909194946		
GGGTGCTTGG	3	3	0,671140909194946		
TGTGGAAACC	3	3	0,671140909194946		
TAGGACAAC	3	3	0,671140909194946		
CCTCAGGATA	3	3	0,671140909194946		
GGTGACAGAG	3	3	0,671140909194946		
GTGCCTAGGA	3	3	0,671140909194946		
ACTCCAAAAA	3	3	0,671140909194946		
ATGGGCTTGA	3	3	0,671140909194946		
TGAAATAAAA	3	3	0,671140909194946		
ATGGGGGTGA	3	3	0,671140909194946		
ATCCACATCG	3	3	0,671140909194946		
AGTAGCCGTG	3	3	0,671140909194946		
TTTAACGGCC	9	9	0,671140909194946		
ACACTTGGAG	3	3	0,671140909194946		
AGCTGGTTTC	3	3	0,671140909194946		
GACTCACTTT	2	2	0,675675630569458		
GAGTCTGAGG	2	2	0,675675630569458		
AGGCGAGATC	2	2	0,675675630569458		
GATCCCAACT	2	2	0,675675630569458		
CAGCTTGCAA	2	2	0,675675630569458		
GCTGCTGGTG	2	2	0,675675630569458		
GAATGAGGAC	2	2	0,675675630569458		
CTGTCAGCGG	2	2	0,675675630569458		
TGTGGCCTCC	2	2	0,675675630569458		

TAACCCAGCA	2	2	0,675675630569458		
GCTGGGTCCA	2	2	0,675675630569458		
GCCATCCCCT	2	2	0,675675630569458		
GTGGTGGACA	2	2	0,675675630569458		
GTGGTGCGCA	2	2	0,675675630569458		
ATTAGCAGAG	2	2	0,675675630569458		
CTCAGGAAAT	2	2	0,675675630569458		
TGCTCCTACC	2	2	0,675675630569458		
GTGGTGTGTA	2	2	0,675675630569458		
TGCTGTGTGC	2	2	0,675675630569458		
GTGGTGTGTG	2	2	0,675675630569458		
GTGGCGCGCG	2	2	0,675675630569458		
GGCAAGGGGG	2	2	0,675675630569458		
TACGTTGCAG	2	2	0,675675630569458		
GTGGCAGCGC	2	2	0,675675630569458		
ACAGCGTCTG	2	2	0,675675630569458		
TGGAAGTGA	2	2	0,675675630569458		
GGCACTGCAG	2	2	0,675675630569458		
GCGTGCTCTC	2	2	0,675675630569458		
GCTAAACTGC	2	2	0,675675630569458		
GTTGCTGGGG	2	2	0,675675630569458		
TCACTGAGTT	2	2	0,675675630569458		
AGGGCCACCT	2	2	0,675675630569458		
CTGGATGCCG	2	2	0,675675630569458		
ACAGTGGGGA	2	2	0,675675630569458		
GTGAAGCCCC	2	2	0,675675630569458		
ACAGTCTTGC	2	2	0,675675630569458		
TGAGCCTCGT	2	2	0,675675630569458		
CCACTGAACT	2	2	0,675675630569458		
GGGTCTGCGG	2	2	0,675675630569458		
GGAGCGTGGG	2	2	0,675675630569458		
CCTGCACACT	2	2	0,675675630569458		
TTGGCTAGGC	2	2	0,675675630569458		
TTGCAATGCA	2	2	0,675675630569458		
CCATTGCATT	2	2	0,675675630569458		
CCCCACCTA	2	2	0,675675630569458		
AGGGGATTCC	2	2	0,675675630569458		
TTCAGTGCCT	2	2	0,675675630569458		
CCCCCTCGTG	2	2	0,675675630569458		
TTGACACTTT	2	2	0,675675630569458		
GGAAATGTCA	2	2	0,675675630569458		
GGCAACGTGG	2	2	0,675675630569458		
CCTATAATCC	2	2	0,675675630569458		
GAGCGGCCTC	2	2	0,675675630569458		
GAATAAATT	2	2	0,675675630569458		
CTGCTGAGTG	2	2	0,675675630569458		

CCTGCAATCC	2	2	0,675675630569458		
TCATCATCAG	2	2	0,675675630569458		
CCTTTGCCCT	2	2	0,675675630569458		
GAGTCAGGAG	2	2	0,675675630569458		
GGAGGCGGAG	2	2	0,675675630569458		
TGTGTGTGTG	2	2	0,675675630569458		
GAGCCAACCC	2	2	0,675675630569458		
AGCTGATCAG	2	2	0,675675630569458		
AAGCCAGCCC	2	2	0,675675630569458		
AGCCCCGGAG	2	2	0,675675630569458		
CCTTGGTGCC	2	2	0,675675630569458		
GAGAGCTCCC	2	2	0,675675630569458		
AACCCTTGGG	2	2	0,675675630569458		
ATCAGTGTGC	2	2	0,675675630569458		
AGCCTGCAGA	2	2	0,675675630569458		
GGCTGAGAAT	2	2	0,675675630569458		
TCATCTACAA	1	1	0,704225301742554		
AGAATCTCTG	1	1	0,704225301742554		
CTGGCTGCAA	1	1	0,704225301742554		
TGACTAGCAA	1	1	0,704225301742554		
AGAATCGCTT	1	1	0,704225301742554		
TCCCTGGGGG	1	1	0,704225301742554		
GCACCTCAGC	1	1	0,704225301742554		
AGGCAAGATA	1	1	0,704225301742554		
AGAATCACTT	1	1	0,704225301742554		
GCCACAAGTC	1	1	0,704225301742554		
CTGGGAGGGA	1	1	0,704225301742554		
TCCCTGGCTG	1	1	0,704225301742554		
TCCCATTAAG	1	1	0,704225301742554		
CTGGCTGCCT	1	1	0,704225301742554		
AGGCTGCCCA	1	1	0,704225301742554		
CTGGCCGACT	1	1	0,704225301742554		
AGGATCGCTT	1	1	0,704225301742554		
TCATCTGTGA	1	1	0,704225301742554		
TGATTGACCT	1	1	0,704225301742554		
TCCAAGTGTG	1	1	0,704225301742554		
TGATGTTTGC	1	1	0,704225301742554		
TGATGTTCCA	1	1	0,704225301742554		
CTTCTGGGGA	1	1	0,704225301742554		
TGATGTGATC	1	1	0,704225301742554		
TGATCCTTGT	1	1	0,704225301742554		
GCACCGTGGA	1	1	0,704225301742554		
TGAGACGAGG	1	1	0,704225301742554		
GCCAGACCCC	1	1	0,704225301742554		
GCCACCGTCG	1	1	0,704225301742554		
TCCAGAATAA	1	1	0,704225301742554		

TGAAGTAACA	1	1	0,704225301742554		
AGAAAGGGGG	1	1	0,704225301742554		
AGGACAGGAG	1	1	0,704225301742554		
TGAGTTTGTA	1	1	0,704225301742554		
AGGACACCGC	1	1	0,704225301742554		
AGGATGGTCC	1	1	0,704225301742554		
TCCACCGAGG	1	1	0,704225301742554		
CTGTCTGTGG	1	1	0,704225301742554		
CTGTGTGACT	1	1	0,704225301742554		
TCTGTGCTCC	1	1	0,704225301742554		
GCAGACTCAG	1	1	0,704225301742554		
TTTTGTTTTT	1	1	0,704225301742554		
GCATATGAGC	1	1	0,704225301742554		
GCAGCCTCCA	1	1	0,704225301742554		
TCTGTACACC	1	1	0,704225301742554		
GCAGCGCCAC	1	1	0,704225301742554		
TCGGTCAGGC	1	1	0,704225301742554		
GCATAATAAG	1	1	0,704225301742554		
TGACTACTGGG	1	1	0,704225301742554		
AGCCTCGGCC	1	1	0,704225301742554		
TCCTTAACCT	1	1	0,704225301742554		
CTGGGGAGTG	1	1	0,704225301742554		
GCAGTTGGAT	1	1	0,704225301742554		
AGCCCTGCAA	1	1	0,704225301742554		
TCTCCTCCTT	1	1	0,704225301742554		
TCTCTGTGTA	1	1	0,704225301742554		
GATTCCACAG	1	1	0,704225301742554		
TCAGCACCTG	1	1	0,704225301742554		
TCAGCAATGT	1	1	0,704225301742554		
CTGGTGATGG	1	1	0,704225301742554		
AGCCAGGGAA	1	1	0,704225301742554		
TCTGCTTACA	1	1	0,704225301742554		
TCTACCTCCC	1	1	0,704225301742554		
AGCTCCTTGA	1	1	0,704225301742554		
TGACCGGCGA	1	1	0,704225301742554		
TCCGCCGCGG	1	1	0,704225301742554		
CTTAAGGATT	1	1	0,704225301742554		
GCCAAGATGC	1	1	0,704225301742554		
AGACCTCCTT	1	1	0,704225301742554		
TCCTAGCCTG	1	1	0,704225301742554		
GCAGGTCAGC	1	1	0,704225301742554		
GCACTTGCAT	1	1	0,704225301742554		
CTGTTGGCAT	1	1	0,704225301742554		
AGAGGCCGAG	1	1	0,704225301742554		
GCCAGGCTGG	1	1	0,704225301742554		
TCGGGAGCTG	1	1	0,704225301742554		

CTGTTACTGT	1	1	0,704225301742554		
TCTGTGCTGT	1	1	0,704225301742554		
AGCAAACCTGA	1	1	0,704225301742554		
TGAAATCTTC	1	1	0,704225301742554		
TCCTATTAAG	1	1	0,704225301742554		
AGCAAGGACT	1	1	0,704225301742554		
AGCACAGGGA	1	1	0,704225301742554		
AGCACATTTG	1	1	0,704225301742554		
CTGGGCCCCAG	1	1	0,704225301742554		
CTGTTACCAG	1	1	0,704225301742554		
AGCAGCGTGG	1	1	0,704225301742554		
TCCTGCCCCA	1	1	0,704225301742554		
CTGGGATGTC	1	1	0,704225301742554		
TGAAGAGAAG	1	1	0,704225301742554		
TTCTCTACAA	1	1	0,704225301742554		
TTGAGTGCAG	1	1	0,704225301742554		
AAGGAGTTAC	1	1	0,704225301742554		
TTCATTATAG	1	1	0,704225301742554		
GACCAGCAGA	1	1	0,704225301742554		
TTCCAGACCT	1	1	0,704225301742554		
TTCCATCACC	1	1	0,704225301742554		
TTCATAGCTG	1	1	0,704225301742554		
GACCAGCTGG	1	1	0,704225301742554		
AAGGCGTTTC	1	1	0,704225301742554		
AAGCCAGGAC	1	1	0,704225301742554		
GACCAGGGCC	1	1	0,704225301742554		
TTCTGAGCGG	1	1	0,704225301742554		
TTCTTGCTTA	1	1	0,704225301742554		
GACCAGGGGC	1	1	0,704225301742554		
AAGAGGCAGC	1	1	0,704225301742554		
GAGTAGTAAT	1	1	0,704225301742554		
TTCGGGTGTG	1	1	0,704225301742554		
AAGTTTATAG	1	1	0,704225301742554		
TGGCCATCTT	1	1	0,704225301742554		
GAGGGTGGCG	1	1	0,704225301742554		
TTAGCAGTTG	1	1	0,704225301742554		
TTAGTTAAGC	1	1	0,704225301742554		
AATAAAGGTG	1	1	0,704225301742554		
TTATCGTCCT	1	1	0,704225301742554		
GACCACACCG	1	1	0,704225301742554		
AAGTTTCCAA	1	1	0,704225301742554		
AAGACAGCTG	1	1	0,704225301742554		
AAGTTGGAGG	1	1	0,704225301742554		
GACAGTGTGG	1	1	0,704225301742554		
GAGGCCTCAG	1	1	0,704225301742554		
GAGGACGAAG	1	1	0,704225301742554		

GAGGACCCAA	1	1	0,704225301742554		
TTCACCAGGG	1	1	0,704225301742554		
GAGCTCTCCA	1	1	0,704225301742554		
GAGGGTCTTG	1	1	0,704225301742554		
GACTGTGCCA	1	1	0,704225301742554		
TTGAGCCAGC	1	1	0,704225301742554		
GACTCCCCCA	1	1	0,704225301742554		
GACTGAGCTT	1	1	0,704225301742554		
TTTACCTGCC	1	1	0,704225301742554		
TTTCCACACC	1	1	0,704225301742554		
TTTCCCATCC	1	1	0,704225301742554		
AAATAAAGAA	1	1	0,704225301742554		
TTTCTGCACT	1	1	0,704225301742554		
TTGTCCAGGC	1	1	0,704225301742554		
GACTTGGCCC	1	1	0,704225301742554		
GAGAATCATT	1	1	0,704225301742554		
AAACATTA AAA	1	1	0,704225301742554		
AAACAAGATG	1	1	0,704225301742554		
GAGAAAGGGA	1	1	0,704225301742554		
AAAAACCCCA	1	1	0,704225301742554		
GAGAAGGGCT	1	1	0,704225301742554		
AAAGAAAGTG	1	1	0,704225301742554		
AACTAACATT	1	1	0,704225301742554		
GACCCCTGTC	1	1	0,704225301742554		
AACTTGCCCA	1	1	0,704225301742554		
TTGCCTTTTT	1	1	0,704225301742554		
TTGCGGAGCC	1	1	0,704225301742554		
AACTGCGGCA	1	1	0,704225301742554		
AACTCTCCTA	1	1	0,704225301742554		
TTGTTATATT	1	1	0,704225301742554		
TTGCTCACAA	1	1	0,704225301742554		
TTACAGTTAA	1	1	0,704225301742554		
TTGCTGTGTG	1	1	0,704225301742554		
TTGGACTGAG	1	1	0,704225301742554		
TTGGCCAGAA	1	1	0,704225301742554		
TTGGCGCGCA	1	1	0,704225301742554		
TTGGGAGCAG	1	1	0,704225301742554		
GAGATGTAAG	1	1	0,704225301742554		
GAGAGTTGA	1	1	0,704225301742554		
GACCCTAGCT	1	1	0,704225301742554		
TGGACCCTAG	1	1	0,704225301742554		
GATTGAACCT	1	1	0,704225301742554		
GCAAGATCAT	1	1	0,704225301742554		
ACTATCGTGA	1	1	0,704225301742554		
TGCTTGACAA	1	1	0,704225301742554		
TGGAACCTTG	1	1	0,704225301742554		

GAAACTGTGA	1	1	0,704225301742554		
GCAAGCCCCT	1	1	0,704225301742554		
TGGAAGCTAG	1	1	0,704225301742554		
ACTCCCTCCT	1	1	0,704225301742554		
ACCTTGATTG	1	1	0,704225301742554		
ACCTGTGACC	1	1	0,704225301742554		
TGGACCTCGT	1	1	0,704225301742554		
TGGATCCTAG	1	1	0,704225301742554		
ACCTCCCACC	1	1	0,704225301742554		
TGGATGGGGT	1	1	0,704225301742554		
AATATGGCTC	1	1	0,704225301742554		
GAAATAAAGT	1	1	0,704225301742554		
ACTGCCCTCA	1	1	0,704225301742554		
TGCAGAGACA	1	1	0,704225301742554		
CTTGCAAACC	1	1	0,704225301742554		
TGCATTGACT	1	1	0,704225301742554		
GCAATTCCCA	1	1	0,704225301742554		
TGCCCAGCAA	1	1	0,704225301742554		
TGCTAGGAAG	1	1	0,704225301742554		
TGCTTATGCC	1	1	0,704225301742554		
TGCTGAGGAA	1	1	0,704225301742554		
TGGCCCTCTA	1	1	0,704225301742554		
ACTGCCCGCT	1	1	0,704225301742554		
TGCTGCCTCA	1	1	0,704225301742554		
ACTGATAACA	1	1	0,704225301742554		
CTTTGCTGTG	1	1	0,704225301742554		
CTTTTCCTTC	1	1	0,704225301742554		
ACTCGCTCTG	1	1	0,704225301742554		
ACTCGAATAT	1	1	0,704225301742554		
ACTGGAGTTT	1	1	0,704225301742554		
GATCTCATCT	1	1	0,704225301742554		
TGGCACATAA	1	1	0,704225301742554		
GAAGGTGACG	1	1	0,704225301742554		
ACAGAGGAGG	1	1	0,704225301742554		
ACAGACTTCA	1	1	0,704225301742554		
GAAGTTATGA	1	1	0,704225301742554		
GATGACGACT	1	1	0,704225301742554		
GAAGGGTGAC	1	1	0,704225301742554		
GAATGTACGT	1	1	0,704225301742554		
TGGTAGTTAC	1	1	0,704225301742554		
ACAAAGCCCC	1	1	0,704225301742554		
TGTGGTGGCG	1	1	0,704225301742554		
TGTTCCACTC	1	1	0,704225301742554		
TGTTCTCCAT	1	1	0,704225301742554		
AATGAGCAAC	1	1	0,704225301742554		
TTAAGAGGGA	1	1	0,704225301742554		

TTAATAGTGG	1	1	0,704225301742554		
TGGTGTGAT	1	1	0,704225301742554		
TGGGCAGGGA	1	1	0,704225301742554		
GAACAGTGTG	1	1	0,704225301742554		
TGGCTCCTCC	1	1	0,704225301742554		
GATTAAGTGA	1	1	0,704225301742554		
GAACGTCTCT	1	1	0,704225301742554		
GATGGCTGCC	1	1	0,704225301742554		
TGGGAAGTGA	1	1	0,704225301742554		
TGGTGCAGCA	1	1	0,704225301742554		
TGGGAGAAGT	1	1	0,704225301742554		
GCACAAGTTC	1	1	0,704225301742554		
ACATCTGCCT	1	1	0,704225301742554		
ACATCTCAAT	1	1	0,704225301742554		
ACATCGTAGG	1	1	0,704225301742554		
GATGCCTGCA	1	1	0,704225301742554		
GAAGGCATCC	1	1	0,704225301742554		
TGGGGTCCCC	1	1	0,704225301742554		
ACAGTAAGCG	1	1	0,704225301742554		
ACCACACCAC	1	1	0,704225301742554		
CAGGGGTGAC	1	1	0,704225301742554		
GTCATAAAGA	1	1	0,704225301742554		
CATAGTTAA	1	1	0,704225301742554		
CATACATTGG	1	1	0,704225301742554		
CGAGGAGAGT	1	1	0,704225301742554		
GTACGTCCCA	1	1	0,704225301742554		
GTACTIONTAC	1	1	0,704225301742554		
CGAGGGGCCA	1	1	0,704225301742554		
GTACAGAGTT	1	1	0,704225301742554		
CAGGTCAGAA	1	1	0,704225301742554		
GCTTAATGTG	1	1	0,704225301742554		
GTAGACCCCA	1	1	0,704225301742554		
GCTGTAGGTG	1	1	0,704225301742554		
CGCAGTCACT	1	1	0,704225301742554		
CAGGCGTGCA	1	1	0,704225301742554		
GCTGGGGGAC	1	1	0,704225301742554		
CAGGCCTCTG	1	1	0,704225301742554		
CTGCCAAGA	1	1	0,704225301742554		
GCTGCATCA	1	1	0,704225301742554		
GGTCTTTTGC	1	1	0,704225301742554		
CCTGTGTGCA	1	1	0,704225301742554		
GGGTCCTCTC	1	1	0,704225301742554		
GGGTGTGGCA	1	1	0,704225301742554		
CCTTCTGGTG	1	1	0,704225301742554		
GCTTGCTTTT	1	1	0,704225301742554		
CCTTGGGCCT	1	1	0,704225301742554		

GGTCACTGAG	1	1	0,704225301742554		
GTACCATCAA	1	1	0,704225301742554		
GGTCTATGTC	1	1	0,704225301742554		
GCTGGATGCG	1	1	0,704225301742554		
GGTGATGAGG	1	1	0,704225301742554		
GCTTAGAAGT	1	1	0,704225301742554		
GGTGGTACAC	1	1	0,704225301742554		
GGTTGAAAAA	1	1	0,704225301742554		
CATCTGTGAG	1	1	0,704225301742554		
CGAACCGTTA	1	1	0,704225301742554		
GCTTACTGCA	1	1	0,704225301742554		
CCAAGATGGA	1	1	0,704225301742554		
GTGAGATCCT	1	1	0,704225301742554		
GTCACGTGCC	1	1	0,704225301742554		
CGGAGACCCT	1	1	0,704225301742554		
CGGAGCCGGC	1	1	0,704225301742554		
CACTCTATCC	1	1	0,704225301742554		
CACTCCCCAC	1	1	0,704225301742554		
CACTCACACA	1	1	0,704225301742554		
GAGAAGGGCA	1	1	0,704225301742554		
CAGAAATGAA	1	1	0,704225301742554		
GCTCCCCTGT	1	1	0,704225301742554		
CAGAGACGTG	1	1	0,704225301742554		
GTGAGATTGC	1	1	0,704225301742554		
GTGAGGGCGT	1	1	0,704225301742554		
CGGGCAGGGA	1	1	0,704225301742554		
GTGATAGCCT	1	1	0,704225301742554		
GTGATGTAGT	1	1	0,704225301742554		
GTGCAATTC	1	1	0,704225301742554		
CGGGGGAGCC	1	1	0,704225301742554		
GCTCTCTCTC	1	1	0,704225301742554		
GCTGCCTGCC	1	1	0,704225301742554		
GTCTGGAATG	1	1	0,704225301742554		
GTCTGGGGGA	1	1	0,704225301742554		
CAGCTTCACC	1	1	0,704225301742554		
GCTGCGCAGA	1	1	0,704225301742554		
GTCTTCTCTG	1	1	0,704225301742554		
GTCTTTAGGA	1	1	0,704225301742554		
GTGAAAACCTG	1	1	0,704225301742554		
GTGAAGCCCT	1	1	0,704225301742554		
CAGCGCCACC	1	1	0,704225301742554		
CCACTAACGA	1	1	0,704225301742554		
GTGAAACCTT	1	1	0,704225301742554		
CAGCCGAGGC	1	1	0,704225301742554		
CGCGCGGGCA	1	1	0,704225301742554		
CAGCCCAACC	1	1	0,704225301742554		

CAGATGGTAG	1	1	0,704225301742554		
GCTGATTGGC	1	1	0,704225301742554		
GCTGAGGGCT	1	1	0,704225301742554		
GTGAAACCTG	1	1	0,704225301742554		
CCCCGTATGG	1	1	0,704225301742554		
GGGTAGGACT	1	1	0,704225301742554		
GGCCCTGAGT	1	1	0,704225301742554		
CCCGGCTCCT	1	1	0,704225301742554		
CCCGGCCTGT	1	1	0,704225301742554		
GGCCGGAAGC	1	1	0,704225301742554		
CCTCCACACT	1	1	0,704225301742554		
CCCGCCAGTG	1	1	0,704225301742554		
CCCGTTTTGG	1	1	0,704225301742554		
GGCCTGTAAT	1	1	0,704225301742554		
CCCTAGCTGG	1	1	0,704225301742554		
CCCCGCCAAG	1	1	0,704225301742554		
GGAGGGGAGG	1	1	0,704225301742554		
CCCCCGAAGC	1	1	0,704225301742554		
CCCCCCTTCT	1	1	0,704225301742554		
CCTCGCTCAG	1	1	0,704225301742554		
CCCCCAGATG	1	1	0,704225301742554		
GGCTGTACCC	1	1	0,704225301742554		
CCCGAGGGCC	1	1	0,704225301742554		
GGATGGCACA	1	1	0,704225301742554		
CCGGAAACAC	1	1	0,704225301742554		
GGCAAGTGCA	1	1	0,704225301742554		
GGCAGAGACC	1	1	0,704225301742554		
CCGCGGCCGC	1	1	0,704225301742554		
CCGCCTTGCC	1	1	0,704225301742554		
CCGCCTCCGG	1	1	0,704225301742554		
GGCAACGGTA	1	1	0,704225301742554		
GGCCCCCTCC	1	1	0,704225301742554		
GGCAGGCCCT	1	1	0,704225301742554		
GGGAAATCGC	1	1	0,704225301742554		
GGATGATGTC	1	1	0,704225301742554		
CCGTGGTCAC	1	1	0,704225301742554		
GGCCAGCCTA	1	1	0,704225301742554		
GGATATGTGG	1	1	0,704225301742554		
GGAGGTGCTC	1	1	0,704225301742554		
CCTCACTTTC	1	1	0,704225301742554		
GGCCCCGTGT	1	1	0,704225301742554		
GGATTCCAGT	1	1	0,704225301742554		
CCACTGGACG	1	1	0,704225301742554		
GGACCACCCA	1	1	0,704225301742554		
GGGCTGACAA	1	1	0,704225301742554		
GGGCTGATGT	1	1	0,704225301742554		

GGGGACAGGG	1	1	0,704225301742554		
GGAATATGCA	1	1	0,704225301742554		
CCAGCAGTGG	1	1	0,704225301742554		
CCACTTCTGG	1	1	0,704225301742554		
GGCTTTAGGG	1	1	0,704225301742554		
GGGGCAGCCG	1	1	0,704225301742554		
CCTGGATAAA	1	1	0,704225301742554		
GGAACTTAAC	1	1	0,704225301742554		
GGAACCAGGT	1	1	0,704225301742554		
CCACTGCATT	1	1	0,704225301742554		
GGGGCTAGTG	1	1	0,704225301742554		
GGAAACCCCA	1	1	0,704225301742554		
CCACTAATGG	1	1	0,704225301742554		
CGTCCCGGAG	1	1	0,704225301742554		
CCACTTCACT	1	1	0,704225301742554		
GGGCAAGCCC	1	1	0,704225301742554		
GGGGTAAGAA	1	1	0,704225301742554		
CCCATTCAAA	1	1	0,704225301742554		
GGGACGGGGT	1	1	0,704225301742554		
CCCATCCGAA	1	1	0,704225301742554		
CCTGCAGTCC	1	1	0,704225301742554		
CCCACGGTTA	1	1	0,704225301742554		
GGAGACTTCC	1	1	0,704225301742554		
GGGCCGCTCA	1	1	0,704225301742554		
CCATTTTTAC	1	1	0,704225301742554		
CCAGGCTGCG	1	1	0,704225301742554		
GGACTGGCCC	1	1	0,704225301742554		
CCATACAGAC	1	1	0,704225301742554		
GGGCACCTGG	1	1	0,704225301742554		
GGGCAGAATT	1	1	0,704225301742554		
GGGCAGGACC	1	1	0,704225301742554		
GGGCAGGGGA	1	1	0,704225301742554		
CCTGGAGCAA	1	1	0,704225301742554		
CCTCGAAAAA	1	1	0,704225301742554		
GGAGACAAAG	1	1	0,704225301742554		
TACCTCCACC	1	1	0,704225301742554		
ATGCGCAAGG	1	1	0,704225301742554		
GCCGGCGCTC	1	1	0,704225301742554		
CTGATGGTTG	1	1	0,704225301742554		
ATCCGGCGCC	1	1	0,704225301742554		
TACCAGCACA	1	1	0,704225301742554		
GCCGGCCCGG	1	1	0,704225301742554		
ATCCCTCATC	1	1	0,704225301742554		
TAAGCAGATG	1	1	0,704225301742554		
TACCGCCCGT	1	1	0,704225301742554		
GCCGGGAGCC	1	1	0,704225301742554		

TACCTGCAGT	1	1	0,704225301742554		
TACGTACTGC	1	1	0,704225301742554		
ATCAAGAATC	1	1	0,704225301742554		
TACGTCCACG	1	1	0,704225301742554		
ATATAGAGAG	1	1	0,704225301742554		
ATATAATCTG	1	1	0,704225301742554		
GCCGCAGTCA	1	1	0,704225301742554		
ATCCAGGATG	1	1	0,704225301742554		
TAAATAATTT	1	1	0,704225301742554		
CGGGTGAGCC	1	1	0,704225301742554		
CTCTTTTTTC	1	1	0,704225301742554		
ATGCCAACAG	1	1	0,704225301742554		
ATGCACTGGT	1	1	0,704225301742554		
ATGATTCAGA	1	1	0,704225301742554		
CTGAAACCTT	1	1	0,704225301742554		
TAAAGCAGTA	1	1	0,704225301742554		
TAAGCCCTTC	1	1	0,704225301742554		
GCCTCTTGAA	1	1	0,704225301742554		
TAGACTTATT	1	1	0,704225301742554		
ATGAGACCCT	1	1	0,704225301742554		
TAACCAACTG	1	1	0,704225301742554		
GCCTAAGTAA	1	1	0,704225301742554		
TAACCTGCTA	1	1	0,704225301742554		
GCCGGGCACG	1	1	0,704225301742554		
ATCTCTGCTC	1	1	0,704225301742554		
ATCTCGGCTC	1	1	0,704225301742554		
ATGATGATGA	1	1	0,704225301742554		
AGGGTGGGGA	1	1	0,704225301742554		
TATTGACAAC	1	1	0,704225301742554		
TCAACGGTGT	1	1	0,704225301742554		
TCAAGAGCCG	1	1	0,704225301742554		
CTGCTTCCAC	1	1	0,704225301742554		
TCAATGGCAG	1	1	0,704225301742554		
GCCCAAATGA	1	1	0,704225301742554		
TCACAAACTT	1	1	0,704225301742554		
CACGCAATGC	1	1	0,704225301742554		
TCACCGCGCT	1	1	0,704225301742554		
GCCCAGCTGG	1	1	0,704225301742554		
AGGGTCTGGG	1	1	0,704225301742554		
AGGGGTCACC	1	1	0,704225301742554		
TCACCGGTCA	1	1	0,704225301742554		
GCCCAAAGAC	1	1	0,704225301742554		
AGGGCCGACT	1	1	0,704225301742554		
TCACGCGCTC	1	1	0,704225301742554		
AGGGCAAGGC	1	1	0,704225301742554		
CTGGAGGCAC	1	1	0,704225301742554		

TAGCGCAGGC	1	1	0,704225301742554		
CTCTTGACCC	1	1	0,704225301742554		
TAGACTTCCT	1	1	0,704225301742554		
ATACCAGTGA	1	1	0,704225301742554		
TAGATACTGT	1	1	0,704225301742554		
CTGCGGTGGC	1	1	0,704225301742554		
CTGCTAGGAA	1	1	0,704225301742554		
TAGCAGAGGC	1	1	0,704225301742554		
TATTCTCAAT	1	1	0,704225301742554		
TAGCCGCTGA	1	1	0,704225301742554		
AGGTGGACAG	1	1	0,704225301742554		
AGTGCAGGGC	1	1	0,704225301742554		
AGTGAGGGGA	1	1	0,704225301742554		
GCCCCCCCGT	1	1	0,704225301742554		
TAGGTGGCGT	1	1	0,704225301742554		
TAGGTTGCCT	1	1	0,704225301742554		
TAGTGCCAG	1	1	0,704225301742554		
GCCCAGTGAT	1	1	0,704225301742554		
ATAGCCACAG	1	1	0,704225301742554		
AGTGTGGAAT	1	1	0,704225301742554		
GCGGTGCAAG	1	1	0,704225301742554		
TAAAAGCCTT	1	1	0,704225301742554		
GTGGCGCACG	1	1	0,704225301742554		
CAACTTAGTT	1	1	0,704225301742554		
CTACTGTACT	1	1	0,704225301742554		
CAACGGCTCC	1	1	0,704225301742554		
GTGGCGGGAG	1	1	0,704225301742554		
GTGGCGGGCT	1	1	0,704225301742554		
CAAGACGGGG	1	1	0,704225301742554		
CTACTTTGGA	1	1	0,704225301742554		
CAAGAGGCAA	1	1	0,704225301742554		
CTAGCAGAGC	1	1	0,704225301742554		
GTGGCTTG TG	1	1	0,704225301742554		
ATTGTGAGGG	1	1	0,704225301742554		
ATTGGCTTAA	1	1	0,704225301742554		
GCGGGTGTGG	1	1	0,704225301742554		
GTGGGCAAAG	1	1	0,704225301742554		
GCGGCCACCA	1	1	0,704225301742554		
CAACACCTGA	1	1	0,704225301742554		
GTGCTTG TAC	1	1	0,704225301742554		
AGGGAATATA	1	1	0,704225301742554		
GCTACGCAGA	1	1	0,704225301742554		
GTGCCCTGTT	1	1	0,704225301742554		
CACAACCTCC	1	1	0,704225301742554		
GTGCTCTGTA	1	1	0,704225301742554		
GTGCTGCGTG	1	1	0,704225301742554		

CAATGTGCTG	1	1	0,704225301742554		
CAAGAAGTTC	1	1	0,704225301742554		
CAATCATTCC	1	1	0,704225301742554		
GTGGGGCCAA	1	1	0,704225301742554		
GTGGAAACCC	1	1	0,704225301742554		
CTACACCAGT	1	1	0,704225301742554		
CAAGTGCCAA	1	1	0,704225301742554		
CAAGGTGCTA	1	1	0,704225301742554		
GTGGCACCAC	1	1	0,704225301742554		
GTGGCAGATG	1	1	0,704225301742554		
GTGGCAGTGG	1	1	0,704225301742554		
GCGTCTGGGG	1	1	0,704225301742554		
CTCTGTAAGT	1	1	0,704225301742554		
ATGGCGGGCA	1	1	0,704225301742554		
CTCGCGGCGG	1	1	0,704225301742554		
GTTCTGGTTT	1	1	0,704225301742554		
CTCTACAGTG	1	1	0,704225301742554		
GCCTGTAATG	1	1	0,704225301742554		
GCCTGGCCAT	1	1	0,704225301742554		
GTTGTAAAT	1	1	0,704225301742554		
GCGGAGAGAG	1	1	0,704225301742554		
ATGGATGTGG	1	1	0,704225301742554		
ATGGGCACTG	1	1	0,704225301742554		
GTTTCCAGGT	1	1	0,704225301742554		
GTTTGAAGGG	1	1	0,704225301742554		
GCCTGAGCCT	1	1	0,704225301742554		
ATGCTTGCTT	1	1	0,704225301742554		
CTCTTCTCTC	1	1	0,704225301742554		
ATGCGGGGAG	1	1	0,704225301742554		
GTTTGCCTGA	1	1	0,704225301742554		
GTTGTGATGT	1	1	0,704225301742554		
ATGTGATTGT	1	1	0,704225301742554		
GCTCACTGCA	1	1	0,704225301742554		
GTGGGTAAAT	1	1	0,704225301742554		
GCGGAGACTG	1	1	0,704225301742554		
CTCAGATCTT	1	1	0,704225301742554		
ATTACACCAC	1	1	0,704225301742554		
ATTAAGTGC	1	1	0,704225301742554		
GTGGTGTATG	1	1	0,704225301742554		
GCCTGTGGCT	1	1	0,704225301742554		
ATGTGCGTGG	1	1	0,704225301742554		
GTTCAATCTT	1	1	0,704225301742554		
ATGTAGTAGT	1	1	0,704225301742554		
GTGTAATAAG	1	1	0,704225301742554		
CTCAGTGTGC	1	1	0,704225301742554		
GCGATGGAGG	1	1	0,704225301742554		

GTGTGTTTGT	1	1	0,704225301742554		
ATGGGTTTGC	1	1	0,704225301742554		
ATGGGGAGAG	1	1	0,704225301742554		
ATTCTTGTAC	1	1	0,704225301742554		
CTCAGGAGAG	1	1	0,704225301742554		

Claves de las abreviaturas

Claves de las abreviaturas

- 17-AAG: 17-Alilamino-17-demetoxigeldanamicina
- AAP: Amputación abdomino-perineal
- ABC: Sitio de unión del ATP (*ATP-Binding cassette*)
- ACF: Focos de criptas aberrantes
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- Ag: Antígeno
- AIF: Factor inductor de apoptosis (*Apoptosis-inducing Factor*)
- AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
- ANG-2: Angiopoyetina 2
- ANGPTL4: Similar a *Angiopoyetina-4 (Angiopoyetina-like 4)*
- AP-1: Proteína activadora 1 (*Activator Protein 1*)
- APAF 1: Factor activador de proteasas apoptóticas (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*)
- APC: Gen de la poliposis adenomatosa del colon (*Adenomatosis Poliposis Coli*)
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- ARNt: ARN transferente o de transferencia
- ARNT: Traslocador Nuclear Receptor de Ariles hidrocarbonatos, también conocido como HIF- β
- ASK1: Quinasa 1 reguladora de la señalización de apoptosis (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*)
- BAT1: Tránsito 1 asociado a HLA-B (*HLA-B Associated Transcript 1*)
- BER: Mecanismo de reparación del DNA por excisión de bases (*Base excision repair*)
- B2M: Beta-2 Microglobulina
- CAD: ADNasa activadora de caspasa (*Caspase-activated DNase*)
- CCNB1IP1: Proteína 1 que interactúa con ciclina B1 (*Cyclin B1 interacting protein 1*)
- CCR: Cáncer colorrectal
- CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas
- ADNc: Copia de DNA
- CEA: Antígeno carcinoembrionario
- CHC1: Regulador de la condensación cromosómica (*Chromosome condensation 1*). También denominado RCC1 (*Regulador of Chromosome Condensation 1*)
- CIN: Inestabilidad cromosómica
- CKB: Creatina quinasa cerebral (*Creatin Kinase brain*)
- COL1A1: Colágeno tipo I, alfa (*Collagen, type I, alpha*)
- CPT-11: Siglas con las que también se conoce a Irinotecán
- CR: Cáncer de recto

Claves de las abreviaturas

- CRLA: Cáncer de recto localmente avanzado
- DCC: Deleciónado en cáncer de colon (*Deleted in colon cancer*)
- DIABLO: Proteína de unión directa a IAP con bajo pI (*direct IAP-binding protein with low pI*)
- DISC: Complejo de señalización inductor de muerte (*Death Induced signalling complex*)
- DPD: Dihidropirimidín deshidrogenasa
- DSB: Mecanismo de reparación por recombinación homóloga (*Double Strand Break Repair*)
- dTMP: Desoxi-5'-timidina monofosfato
- dUMP: Desoxi-5'-uridina monofosfato
- eEF2: Factor 2 de elongación de la síntesis de proteínas en eucariotas (*Eukariotic elongation factor 2*)
- eEF2K: Quinasa del factor 2 de elongación de la síntesis de proteínas en eucariotas (*Eukariotic elongation factor 2 Kinase*)
- EGFR: Receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- ERCC-1: Gen del grupo 1 de reparación por excisión de complementación cruzada (*excision repair cross-complementing group 1 gene*)
- ERCC-2: Gen del grupo 2 de reparación por excisión de complementación cruzada (*excision repair cross-complementing group 2 gene*)
- ESTs: Secuencias *tag* expresadas (*Expressed Sequence Tag*)
- ETM: Excisión total del mesorrecto
- FAP: Poliposis adenomatosa familiar
- 5-FdUMP: 5-Flúor-2'-desoxi-uridín monofosfato
- FOLFIRI: Siglas del esquema quimioterápico que combina Irinotecán, 5-FU en infusión continua y Leucovorín
- FOLFOX: Siglas del esquema quimioterápico que combina Oxaliplatino, 5-FU en infusión continua y Leucovorín
- FR: Ferredoxin reductasa
- 5-FU: 5-Fluorouracilo
- FXD3: Regulador 3 del transportador de iones contenido en el dominio FXD (*FXD Domain containing ion transport regulator 3*)
- GAP: Proteína activadora de GTP-asa (*GTPase Activating Protein*)
- GDS: Potenciador de disociación de GDP (*GDP Dissociation Stimulator*)
- GPX2: Glutathion peroxidasa 2 (gastrointestinal) [*Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)*]

Claves de las abreviaturas

- GSTP1: Glutathione S-transferasa pi (*Glutathione S-transferase pi*)
- HEI10: *Human Enhance of Invasion 10*
- HIF-1: Factor de transcripción inducible por hipoxia 1
- HIG2: Proteína 2 inducible por hipoxia (*Hipoxia-inducible protein 2*)
- HLA-C: Clase I, C del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex, class I, C*)
- HNPCC: Cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis
- IAP: Proteína inhibidora de la apoptosis
- IFL: Siglas del esquema quimioterápico que combina Irinotecán, 5-FU en bolo y Leucovorín
- IHQ: Inmunohistoquímica
- ITGB4: Integrina alfa 6/beta4 (*Integrin alpha-6/beta-4*)
- JNK: Quinasa N-terminal de Jun
- K-ALPHA-1: *Tubulin, alpha ubiquitous*
- LOI: Pérdida del patrón de silenciamiento (*loss of imprinting*)
- LOH: Pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*)
- LV: Leucovorín
- MAD: Genes de *D. melanogaster* homólogos de las proteínas Smad en vertebrados (*Mothers Against Decapentaplegic*)
- MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen Activated protein kinase*)
- MDR: Resistencia múltiple a drogas
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
- MMP-14: Metaloproteinasa de matriz 14 [*Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)*], también conocida como MMP de membrana tipo 1 ó MT1-MMP
- MMPs: Metaloproteinasas de matriz
- MMR: Mecanismo de reparación mal-apareamiento en el ADN (*Mismatch-repair*)
- MSI: Inestabilidad de microsatélites
- MSI-H: Inestabilidad de microsatélites alta
- MSI-L: Inestabilidad de microsatélites baja
- MSS: Inestabilidad de microsatélites ausente o estable
- m-TOR: Diana de Rapamicina en mamíferos (*Mammalian Target Of Rapamicina*)
- MT1-MMP: Ver MMP14
- MYO5B: Miosina VB (*Myosin VB*)
- NCI: Instituto Nacional del cáncer (*National Cancer Institute*)
- NER: Mecanismo de reparación del DNA por excisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*)
- NOS: Óxido nítrico sintasa

- OPRT-asa: Orotato-fosforibosil-transferasa
- pb: Pares de bases
- PCNA: Antígeno nuclear de células proliferantes (*Proliferating Cells Nuclear Antigen*)
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PCYT2: Fosfatidil transferasa 2 etanolamina (*Phosphate cytiltransferase 2 ethanolamine*)
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
- PDGF-like: Factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas like
- PET: Tomografía por emisión de positrones
- PH4: 4 Prolil hidroxilasa del factor inducido por hipoxia (*Hypoxia inducible factor prolyl 4 hydroxylase*)
- PI3P: Fosfatidil-inositol-3-fosfato
- PKC: Proteína quinasa C
- PPAR: Receptor activado por el factor proliferante de peroxisomas. Contiene diversas formas: alfa (α), beta (β), delta (δ)y épsilon (γ)
- PPAR- γ : Forma γ del receptor activado por el factor proliferante de peroxisomas (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*)
- pRb: Proteína del gen retinoblastoma
- p70S6K: Quinasa S6 de la proteína ribosómica 40S (*40S ribosomal protein S6 kinase*)
- PSMB4: Subunidad beta, tipo 4, del proteasoma [*Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4*]
- QT: Quimioterapia
- QRT: Quimiorradioterapia
- RAB: Resección anterior baja
- RCC1: Regulador de la condensación cromosómica (*Regulator of Chromosome Condensation 1*). Ver CHC1
- RER: Error de replicación (*Replication Error*)
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- RPc: Respuesta patológica completa
- RR: Ribonucleótido Reductasa
- RT: Radioterapia
- RTs: Resistencias terapéuticas
- S100A10: *S100 calcium binding protein A10* [*annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11)*]
- SAGE: Análisis Seriado de la Expresión Génica

Claves de las abreviaturas

- SELENBP1: Proteína 1 de unión al Selenio (*Selenium binding protein 1*)
- SG: Supervivencia global
- SH2: Dominio de homología Src tipo 2 (*Src-Homology 2*)
- SH3: Dominio de homología Src tipo 3 (*Src-Homology 3*)
- SLE: Supervivencia libre de enfermedad
- SLP: Supervivencia libre de progresión
- SMA: Genes de *C. elegans* cuya mutación resulta en un tamaño menor (*small body*)
- SMAC: Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria (*second mitochondria-derived activator of caspase*)
- SMAD: Contracción de *sma* y *mad*. Ver *sma* y *mad*.
- SMAD2: *SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)*
- SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
- SP: Población marginal o colateral, del inglés *Side Population*
- TAC Tomografía axial computarizada
- TCR: Receptor para el antígeno del linfocito
- TGF α : Factor de crecimiento transformante α
- TGF β : Factor de crecimiento transformante β
- TGF β RII (ó T β RII): Receptor II del factor de crecimiento transformante β
- TFF3: *Trefoil factor 3 (intestinal)*
- TILs: Linfocitos infiltrantes de tumor
- TK: Timidín quinasa
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TP: Timidín fosforilasa
- TS: Timidilato sintetasa
- Ub: Ubicuitina
- UDP: Uridina-5'-difosfato
- UICC: Unión internacional contra el cáncer
- UGT: Intermediario usado en reacciones de transferencia del grupo glucuronosil (UDP glucuronosil transferasa)
- UMP: Uridina-5'-monofosfato
- UMPK: Uridina-5'-monofosfato quinasa
- UP: Uridín fosforilasa
- VEGF: Factor del Crecimiento del Endotelio Vascular
- VHL: Von Hippel-Lindau
- WARS: ARN transferente encargado de la síntesis del triptófano (*Tryptophanyl-tRNA synthetase*)
- WHO: Organización mundial de la salud (del inglés, *World Health Organization*)

Claves de las abreviaturas

- XELOX: Esquema quimioterápico que combina Capecitabina y Oxaliplatino
- XELIRI: Esquema quimioterápico que combina Capecitabina e Irinotecán
- XPD: Gen del grupo D de la enfermedad Xeroderma pigmentario (*Xeroderma pigmentosum group D gene*)
- XRCC-1: *X-ray cross-complementing group 1 gene*
- XIST: Tránsito específico de la inactivación del cromosoma X [*X (inactive)-specific transcript*]
- ZYX: *Zyxin*