

## **ANEXOS**



## ANEXO 1. Aprobación del Comité Ético de Investigación Científica (CEIC) del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol



**Germans Trias i Pujol**  
Hospital



Institut Català  
de la Salut

### Comitè Ètic d'Investigació Clínica

Ctra. De Canyet, s/n  
08916 Badalona  
Tel: 93-497.89.56  
Fax 93-497.89.74  
E-mail: ceic.germanstrias@gencat.net

A/A.: Dra. Yamile Zabana Abdo  
APARELL DIGESTIU  
5ª Planta - Edifici General

CODI GO	No consta	PROMOTOR	Servei Aparell Digestiu (Hospital U. Germans Trias i Pujol)	REF. CEIC	EO-08-038
TÍTULO: Proyecto banco de datos de recurrencia postquirúrgica de la enfermedad de Crohn. (Versión: no consta)					
INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. E. Doménech Morral					

El Dr. Joan Costa Pagès, Vicepresidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

### CERTIFICA

Que en la reunión de fecha 28 de noviembre de 2008 se aprobó el estudio arriba mencionado cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación vigente para que la decisión del citado CEIC sea válida.

Que el CEIC, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y que su composición actual es la siguiente:

#### Presidente

Dr. Jordi Ara del Rey, Director Médico

#### Vicepresidente

Dr. Joan Costa i Pagès, Farmacología Clínica

#### Secretaria

Dra. María Villagrasa Serrano, Aparato Digestivo

#### Secretaria Técnica

Sra. Àngels Fortes Villegas

#### Vocales

Sra. R. Albertí Battle, Enfermería

Dr. S. Altmir Losada, Geriatria

Dra. C. Balañá Quintero, I.C.O.

Dra. P. Giner Boya, Farmacia

Sra. I. Jiménez López, U.A.U.

Dra. A. López Andrés, Farmacología Clínica

Sra. A. Martín Abia, Enfermería

Dra. E. Montané Esteva, Farmacología Clínica

Dr. A. Palomà Nicolau, Psiquiatria, Centres Assistencials Dr. Emili Mira

Dr. J. Peláez de Loño, Inspección Farmacéutica, Àrea 6

Dra. C. Ramo Tello, Neurologia

Dr. R. Romero González, Nefrologia

Dr. J. Román Fontanillas, Medicina Interna

Dr. M. Soler Obradors, Medicina Intensiva

Sr. A. Vitoria Gómez, Jurista

Atentamente,

Dr. Joan Costa Pagès  
Vicepresidente CEIC  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol



Germans Trias i Pujol Hospital  
Institut Català de la Salut  
Comitè Ètic d'Investigació Clínica

Badalona, 8 de enero de 2009  
JCP/afv

**ANEXO 2. Lista de polimorfismos y secuencias estudiadas**

Gen	Nº de secuencia de referencia	Gen	Nº de secuencia de referencia
<b>ATG16L1</b>	rs2241880	JAK2	rs10758669
	rs3792109	MAP3K7IP1	rs2413583
	rs3828309	MMP8	rs12284255
rs1847472	rs11225394		
<b>BACH2</b>	rs4077515	MST1	rs3197999 seq
<b>CARD9</b>	rs7927997	MTMR3	rs713875
<b>C11orf30</b>	rs3764147	MUC19	rs11175593
<b>C13orf31</b>	rs7554511		rs11564258
<b>C1orf106</b>	rs415890	MUC2	rs11825977 (V116M)
	rs2301436	NCF4	rs4821544
<b>CD244</b>	rs4656940	NDVIP1	rs11167764
<b>CDKAL1</b>	rs6908425	NKX2-3	rs4409764
<b>CPEB4</b>	rs359457	NOD2/CARD15	rs2066844 (R702W)
<b>CREM</b>	rs12242110		rs2066845 (G908R)
<b>DEFB1</b>	rs1799946		rs2076756
<b>DENND1B</b>	rs1998598	ORMDL3	rs2872507
<b>DLG5</b>	rs2579176	PLCL1	rs6738825
<b>DNMT3A</b>	rs13428812	PPAR	rs1805192
<b>ERAP2</b>	rs2549794	PRDM1	rs6568421
<b>FADS1</b>	rs102275	PRDX5	rs694739
<b>FASLG</b>	rs7517810	PTGER4	rs4613763
<b>FGFR4</b>	rs1966265	PTPN2	rs1893217
	rs351855	PTPN22	rs2476601
<b>FUT2</b>	rs281379	RTEL1	rs4809330
<b>GALC</b>	rs8005161	SMAD3	rs17293632
<b>GCKR</b>	rs780093	SLC22A4	rs1050152
<b>GPX4</b>	rs740495	STAT3	rs744166
<b>ICOSLG</b>	rs2838519	TAGAP	rs212388
<b>IFNG</b>	rs1558744	TGR5	rs11554825
<b>IGF1R</b>	rs11630259	THADA	rs10495903
	rs1357112	TLR4	rs4986790
<b>IKZF1</b>	rs1456896	TNF	rs1799964
	rs4871611	TNF $\alpha$	rs1800629
<b>IL10</b>	rs3024505	TNFSF1	rs6478108
<b>IL10RA</b>	rs137853580 seq		rs6478109
	rs137853579 seq	TNFSF11	rs2062305
<b>IL10RB</b>	rs121909601 seq	TNFSF15	rs3810936
<b>IL12B</b>	rs10045431	TPH1	rs4537731
	rs6887695		rs684302
<b>IL2RA</b>	rs12722489	TYK2	rs12720356
<b>IL23R</b>	rs11209026	UBE2D1	rs1819658
	rs11465804	VAMP3	rs2797685

<b>IL27</b>	rs151181	XBP1	rs35873774
<b>IL6</b>	rs1800795	ZFP36L1	rs4902642
<b>IRF1</b>	rs12521868	ZNF365	rs10761659
<b>IRGM</b>	rs13361189	ZMIZ1	rs1250550
	rs4958847		
	rs1336119		
	rs10065172		
	rs7714584		

### ANEXO 3. Extracción y análisis de mRNA

Todo el material que se usó (tubos y puntas de pipeta) era libre de RNAsas/DNAsas, al igual que el área de trabajo que se limpió con TermiDNA-Tor®, tanto para impedir la degradación del RNA como la contaminación del material con DNA. Todas las muestras conservadas a -80°C se **fragmentaron** de forma homogénea en el laboratorio de Criobiología mediante la utilización de un mortero con martillo enfriados con nitrógeno líquido. La extracción de los RNA se realizó mediante el kit miRNeasy Mini (QIAgen, Madrid, España) en el sistema de extracción de ácidos nucleicos QIAcube (QIAgen, Madrid, España) de forma manual. El primer paso para la extracción de RNA, que también permite la extracción de DNA y proteínas, comenzó con la **homogenización** de 50mg de tejido intestinal fragmentado y congelado mediante la colocación del tejido en tubos M (Miltenyi Biotech, España) con 700µL de QIAzol, lo que permitió la lisis celular. Estos tubos se trabajaron en la cámara de 4°C colocándolos en el disociador gentleMACS™ (Miltenyi Biotech, España) (programa RNA\_02) para conseguir una homogenización a 2000xg por 1 minuto. El contenido de los tubos M se colocó en tubos eppendorf a temperatura ambiente (RT:15-25°C) por 5 minutos. Posteriormente se añadió 140µL de cloroformo mezclándolo con la muestra de forma vigorosa. Luego de otros 2-3 minutos a RT la muestra se volvió a centrifugar a 12000xg, 15 minutos, 4°C. Después de esta centrifugación la muestra presentó 3 fases líquidas: superior (con RNA), interfase (con DNA) e inferior (con proteínas y demás restos celulares). La fase acuosa superior se depositó en nuevos tubos eppendorf de 2ml para continuar con el protocolo de **purificación de RNA**, añadiendo 1,5 volúmenes de etanol al 100%. Unos 700µL de esta mezcla se colocaron en dos tubos dentro de las columnas RNeasy Mini, centrifugándolos a ≥8000xg, por 15 segundos a RT y descartando el sobrenadante. Se añadieron 700µL de Buffer RWT para volver a centrifugar a ≥8000xg por 15

segundos a RT, descartando el sobrenadante. Se añadieron 500µl de Buffer RPE para volver a centrifugar a  $\geq 8000xg$  por 15 segundos a RT, descartando el sobrenadante. La muestra final de las columnas de RNeasy Mini se colocó en nuevos tubos de 2ml y se centrifugaron a máxima velocidad por 1 minuto, para posteriormente transferirse a nuevo tubo de 1,5ml. Para la elución de RNA, se pipetearon 30-50µl de agua de grado molecular directamente sobre la membrana de las columnas RNeasy, realizando una última centrifugación a  $\geq 8000xg$  por 1 minuto, esta vez a 4°C. Como paso final se colocó 1U/µl (cf) del inhibidor de RNAasas SUPERase-In (Ambion®, España). La **pureza** de la muestra se cuantificó mediante Nanodrop (Thermo Scientific®, Wilmington, EEUU), seleccionando únicamente muestras con un ratio de absorbancia A260/280nm entre 1,8 y 2. La **integridad** se midió mediante el sistema automatizado de electroforesis Experion (BioRad®, Hercules, EEUU) usando chips para RNA con un rango de sensibilidad de 25-500ng/µl (*RNA standard-sensitivity Experion chip*). Para ello se desnaturalizaron 2µl de RNA total y del marcador de peso molecular por muestra, a 70°C durante 2 minutos. Se cargó el gel y las muestras en los pocillos del chip y se montó en la estación Experion. Una vez finalizada la electroforesis el software devolvió una imagen virtual de la fluorescencia captada donde la presencia de las dos bandas de RNA ribosómico (18S/28S) demostró buena integridad (Figura 14). Para este trabajo se usaron las muestras con un valor de integridad de RNA  $\geq 7$  (obtenido mediante un algoritmo que comparó electroforectogramas estándares de RNA de muestras eucariotas, siendo 10 para RNA intacto y 1 para el completamente degradado).

#### **ANEXO 4. Protocolo de retrotranscripción de mRNA a cDNA (kit *Pri PrimeScript™ RT reagent kit (Perfect Real Time)* de Takara (Shiga, Japón))**

Se emplearon 1 µg de RNA total (en 5 µl) por reacción de transcripción reversa. Se preparó la *master mix* (MM) para la reacción para todas las muestras a valorar según las siguientes proporciones de la tabla 1. A continuación se mezcló 5 µl de MM con 5 µl de muestra en un tubo de 0,2 µl RNasa free y se pusieron en el termociclador con las siguientes condiciones: 15 min, 37°C\_5', 85°C\_HOLD 4°C. Se hicieron alícuotas del cDNA resultante y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Tabla 1. *Master mix* (MM) para la retrotranscripción

<b>Reactivo</b>	<b>Volumenes/reacción(µl)</b>
5X Prime Script Buffer	2
Prime Script RT Enzyme Mix	0,5
Oligo dT Primer 50 µM	0,5
Random 6 Mers (100 µM)	2
1 µg RNA total	Hasta llegar a 5

Cada gen a estudio se valoró por triplicado a 20ng de cDNA (Tabla 2) y después de centrifugar la placa, se procedió a la amplificación mediante el LightCycler® (Roche, España) con las condiciones adecuadas (Tabla 3) para la amplificación y valoración de la expresión.

Tabla 2. Composición y concentraciones de la MM para la RT-PCR

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl)</b>
20x TaqMan Gene Expression Assay	0,5
TaqMan Gene Expression Master Mix	5
cDNA template (20 ng)	x (20ng)
Agua libre de RNAasa	x
<b>Total</b>	<b>10</b>



Tabla 3. Condiciones de PCR

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	10 min	95°C	1
<b>Amplificación</b>	15"	95°C	40
	60"	60°C	
<b>Enfriamiento</b>	1"	40°C	1

## ANEXO 5. Técnica de purificación de proteínas

Para la purificación de proteínas se utilizó el remanente de las tres fases de extracción después de retirar la fase de RNA. Esta mezcla de DNA y proteínas se mezcló pipeteando para posteriormente añadir 210µl de etanol frío al 100%. Durante 3 minutos esta muestra se mezcló por inversión a RT para a continuación centrifugarse 2000xg, 4°C, 30 minutos. El sobrenadante (unos 300µl), que contenía las proteínas, se transfirió a un nuevo tubo, añadiéndose 4 volúmenes de acetona fría. Se mezcló y se dejó la muestra durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó la muestra por 10 minutos a máxima velocidad, 4°C. Descartando el sobrenadante se dejó el residuo sólido a secar unos 7 minutos en contacto con aire ambiente. Se añadieron 300µl de la mezcla 10M UREA/5mM DTT para solubilizar las proteínas del residuo sólido de la base y se dejó incubar la muestra 1 hora a RT. Posteriormente 3 minutos a 95°C en un Termobloc, para transportarlas en hielo hasta la sonicación, que se realizó durante 1 minuto. Se centrifugó a 10000xg 10 minutos, RT. En este sobrenadante, que es donde se encuentran las proteínas, se alicuotó y congeló nuevamente a -80°C hasta su utilización.

## **ANEXO 6. Técnica de extracción de proteínas con el buffer de lisado RIPA**

El tejido ileal de pacientes y controles se homogeneizó en tubos M con buffer de lisado RIPA (Tabla 1). Acto seguido se dejó incubar durante 45 minutos en agitación, a 4°C, para finalizar con una centrifugación de 15 minutos a 14000 rpm a 4°C. El sobrenadante resultante con las proteínas se congeló en alícuotas a -80°C.

Tabla 1. Composición del buffer de lisado RIPA.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
TRIS-HCL	25 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
DOC	1%
SDS	0,1%
Na3VO4	1 mM
PMSF	1 mM
NaF	1 mM
Inhibidores de proteasas (Sigma®, España)	10 µl/ml
Agua destilada	

## **ANEXO 7. Técnica de *immunoblotting***

Se utilizó el sobrenadante con el contenido proteínico total. Los cálculos se hicieron para poder cargar 40µg de proteína en cada carril del gel de electroforesis. Al volumen de muestra necesario para ello, se le añadió 1/100 volúmenes de desoxicolato de sodio (DOC) al 2%. La mezcla se dejó incubar 30 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo se añadieron 1/10 volúmenes de ácido tricloro-acético (TCA) al 100% y se dejó otra vez a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 15000xg 15 minutos en frío, y se descartó el sobrenadante por inversión de los eppendorfs sobre un papel

absorbente. El residuo sólido se lavó con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  para retirar cualquier resto de TCA. El lavado se hizo con  $300\mu\text{l}$  de acetona y una centrifugación de 10 minutos a  $10000\text{g}$ . Una vez descartada la acetona, se dejaron secar al aire los residuos sólidos durante 10 minutos. Los  $40\text{mg}$  de proteína precipitada se suspendieron con  $23\text{ ml}$  de LDS  $1\times$  y  $2.5\text{ ml}$  de agente reductor  $10\times$ , para iniciar el protocolo de *immunoblotting*. La suspensión se desnaturalizó durante 10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ , con la ayuda de un baño seco. Luego, las muestras proteicas se separaron según su peso molecular en un gel del 4-12% de poliacrilamida durante aproximadamente 45 minutos  $200\text{V}$  en buffer MOPS. Una vez finalizada la electroforesis se hizo la transferencia húmeda de estas proteínas a una membrana de nitrocelulosa de  $0,4\mu\text{m}$  de poro, en solución de transferencia a  $100\text{V}$  durante 90 minutos.

A continuación se bloqueó la membrana en buffer de bloqueo Odyssey durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Pasado ese tiempo se hicieron tres lavados consecutivos de 15 minutos con PBS-T y se procedió a la incubación *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo primario (TMIGD1  $1/150$ , GAPDH  $1/6000$ , concentraciones definidas previamente mediante la titulación de los anticuerpos) en solución de bloqueo. Posteriormente, la membrana obtenida se incubó 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente (Donkey anti-rabbit IRDye 680 a  $1/20000$  en solución de bloqueo) para detectar la señal emitida mediante el escáner *Odyssey*<sup>®</sup> (LICOR, EEUU).

La cuantificación de las bandas se hizo a través del software *Odyssey*<sup>®</sup> *Infrared Imaging system* (versión 3.0, LICOR, EEUU), expresando los valores en intensidad integrada que corresponde a la suma de intensidad de todos los píxeles de una banda (restándole los valores del fondo) y multiplicado por el área de esta. Los valores de cada condición fueron normalizados por la intensidad de la proteína referencia, en este caso la GAPDH.

### **ANEXO 8. Técnica del estudio de deglicosilación (kit de N-deglicosilación por PNGasa)**

Para ello se usaron 90µl de RNasa B (que actúa como control de glicosilación) o 100µg de la proteína precipitada de las muestras de este estudio resuspendidas en 90µl del *Reaction Buffer 1x* del kit. A cada tubo se añadieron 5µl de *Denaturant solution* y se incubaron a 100°C durante 10 minutos en el baño seco. A continuación se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente añadiendo posteriormente 5µl del *Reaction Buffer 1x*, mezclándolas bien. El producto se dividió en 2 alícuotas de 50µl cada una (T de test y C de control). A la alícuota T se le añadieron 5µl de *PNGase Enzyme solution* (2,5 U y 5 U) y a la alícuota C se le añadieron 5µl de agua ultrapura, mezclando bien ambas alícuotas por separado. Las muestras se incubaron a 37°C durante dos tiempos (1 ó 15 horas) y seguidamente se paró la reacción incubando las muestras 5 minutos a 100°C en el Termobloc. Con 10µl de la reacción se comprobó si la deglicosilación se había producido realizando una electroforesis en un gel de bis-acrilamida al 12% (para ver mejor la diferencia de pesos moleculares similares) y una tinción con Comassie (Simply Blue™ Safe Stai, LifeTechnologies, EEUU) durante 10 minutos para la proteína RNasa B y mediante *western blot* de TMIGD1 para las muestras de estudio.

## **ANEXO 9. Procedimientos para el estudio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Para ambos procedimientos se utilizaron cortes de 5µm de muestras parafinadas que se desparafinaron con los siguientes lavados: tres de xilol (cada uno de 5 segundos), dos de etanol 100% (cada uno de 3 segundos), 2 con etanol 96% (cada uno de 3 segundos) y un lavado final en agua destilada. El protocolo de **inmunofluorescencia** doble comenzó con la recuperación antigénica mediante la utilización de Buffer citrato 0,01 M pH6 en autoclave a 95°C y durante 10 minutos con lavados con PBS x1. Posteriormente se bloquearon las muestras en contacto con el suero *goat/donkey* al 1/10 en PBS unas 2 horas. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 1) depositando 100ml de solución 1%BSA con el anticuerpo sobre las muestras durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS x1 durante 5 minutos. Inmediatamente después se añadieron 200 ml de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos (Tabla 1), que se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Una vez retirada la solución con el anticuerpo secundario, se realizaron lavados con PBS 1x para eliminar los restos de anticuerpo y contra-tinción con Dapi (LifeTechnologies, EEUU; 1/500) durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se montaron con medio Fluoromount (Sigma-Aldrich, España) y se sellaron con un cubreobjetos y laca.

Para la adquisición de las imágenes se utilizó el microscopio AxioObserver Z1 (Carl Zeiss S.A., Alemania) con el *software* AxioVision (versión 4.8.1).

Tabla 1. Anticuerpos para los protocolos de inmunohistoquímica/inmunofluorescencia/inmunobloting

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Ref.</b>
Rabbit-TMIGD1	1/150	Sigma-Aldrich	HPA021946
Mouse-NOD2 (2D9)	1/50	Novus Biologicals	NB100-524
Rabbit-lisozima	1/3500	DAKO	A 0099
Mouse-Ki67 (MIB-1)	1/600	DAKO	M7240
Rabbit-GPR49/LGR5	1/100	LSBio (lifeSpan BioSciences)	LS-A1236/403338
GAPDH	1/6000	Sigma-Aldrich	G9545
Goat-Sucrasa isomaltasa (A17)	1/50	Santa Cruz Biotechnology Inc	Sc-27603
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Ref.</b>
Goat-anti mouse ATTO 488	1/100	ROCKLAND, Inc	610-152-121S
Goat-anti rabbit ATTO 594	1/100	ROCKLAND, Inc	611-155-122S
Donkey-anti rabbit Dylight 594	1/100	ThermoFisher	SA5-10040
Donkey- antigoat Dylighy 488	1/100	ThermoFisher	SA5-10086
Serum normal Goat	1/10	DAKO	X090710
Serum Donkey	1/10	Sigma-Aldrich	D 9663

Para la **inmunohistoquímica** se desparafinaron de las muestras y se procedió a la recuperación antigénica, sumergiendo las muestras en un tampón de citrato sódico a pH = 6,0. El procedimiento fue automatizado con el equipo Ventana® (BenchMark XT, Roche, EEUU) con el kit ultraView Universal DAB (Ventana®, Roche, EEUU). La contra-tinción se llevó a cabo

con el protocolo estándar de hematoxilina. Posteriormente las muestras fueron montadas con medio DPX (Sigma-Aldrich) y se sellaron con un cubreobjetos y laca de uñas.

#### **ANEXO 10. Tinción histológica de azul de Alcian.**

Se realizó utilizando nuevos cortes de 5  $\mu\text{m}$  de muestras parafinadas. Después de la desparafinización, según el protocolo del equipo *Tissue-Tek® DRS Automatic Slide Stainer* (Sakura, Europa), se cubrieron las muestras con solución de azul de Alcian (BDH Chemical Ltd, Poole, Inglaterra) durante 30 minutos y posteriormente se lavaron en agua corriente durante 10 segundos. A continuación las muestras se deshidrataron con alcoholes crecientes y aclararon en 2 cubetas de xileno. Finalmente se montaron las muestras utilizando *Tissue-Tek® coverslipper*. Con esta tinción los mucopolisacáridos se tiñen de azul.

Para la adquisición de las imágenes se utilizó el microscopio AxioKop (Carl Zeiss S.A., Alemania) con el *software* AxioVision (versión 4.8.1).

**ANEXO 11. Lista de genes de expresión diferencial entre pacientes y controles (FDR < 0,005, FC  $\leq$ -2 y  $\geq$  2). ID = identificador**

ID	GEN	FC	FDR	ID	GEN	FC	FDR
GE781695	TMIGD1	-26,10679287	4,05309E-05	GE62045	CAMK2N1	-2,306539501	0,000298797
GE79398	GUCA2B	-21,06062969	5,13097E-06	GE54991	GSR	-2,306315684	0,002712284
GE483076	TMIGD1	-14,77295641	3,61614E-05	GE60432	MPST	-2,297646205	0,001745235
GE80980	CYP4F3	-13,67270385	0,001649419	GE519631	SLC44A3	-2,295629788	0,003272615
GE79099	GSTA1	-11,08843099	0,002447843	GE80526	DSC2	-2,293917225	0,001458757
GE803827	KDM4B	-10,37037865	0,000309047	GE59073	GFER	-2,282181185	0,002064481
GE491196	SLC39A5	-10,1536275	0,000177665	GE55353	MUC13	-2,276619728	0,004550486
GE54166	GSTA3	-9,759541238	0,003931547	GE78964	CCNB2	-2,266490321	0,004363469
GE513315	HNF4G	-9,346783648	0,000420527	GE58135	RASSF7	-2,263753178	0,003406199
GE81576	MEP1B	-9,19083964	0,003579265	GE81002	CLCA1	-2,263690415	0,001282267
GE53852	GDA	-8,536610372	0,000465567	GE58711	HSD17B11	-2,259927776	0,000421977
GE58928	ABP1	-8,213041948	0,000928531	GE80188	SLC35D2	-2,252348392	0,004254458
GE57499	UGT1A6	-8,07530453	0,000251363	GE62053	GALNT12	-2,251588732	0,000458374
GE57667	PLS1	-8,010875934	0,000254973	GE79858	PTRF	-2,239826008	0,000572103
GE83200	AMN	-7,972045808	0,000191279	GE55473	CDHR2	-2,229489389	0,001190536
GE79293	CLDN6	-7,824471631	0,00119126	GE56299	SH3YL1	-2,216264392	0,001390472
GE62004	SCIN	-7,468007277	0,000177665	GE54724	CDC45L	-2,215522021	0,000414504
GE63116	TM4SF5	-7,272324958	0,000606206	GE56460	DHRS7	-2,215301918	0,000606206
GE60498	HSD17B2	-6,847591632	1,09439E-05	GE54458	SRD5A1	-2,203738947	1,50819E-05
GE81191	PRSS3	-6,820732422	0,000187614	GE80189	PTK6	-2,19578987	0,00250235
GE87437	STAP2	-6,524647677	0,000286775	GE852247	JARID2	-2,180773596	0,000414607
GE62605	CYP3A43	-6,325896712	0,000384671	GE546704	SSTR5	-2,140928576	0,001495217
GE569462	UGT2B7	-6,281097511	0,001739706	GE53908	ALPK3	-2,135814967	2,95915E-11
GE655666	APBB2	-6,118268129	0,000907297	GE53948	ARHGAP20	-2,128258413	3,70239E-05
GE53983	CHP2	-6,09848124	0,000134484	GE87662	CAPN13	-2,124441082	0,004363469
GE762301	KRT19P2	-6,042909489	0,000506686	GE53608	PHLPP2	-2,123950289	0,002696441
GE79400	SLC26A3	-6,023950854	0,002058118	GE85330	GSR	-2,118549249	0,000350864
GE616659	KIAA0415	-5,972410517	3,41101E-05	GE58372	IMPA1	-2,092895096	0,00170986
GE57835	ABCB1	-5,914939176	0,00019141	GE62534	CYP2J2	-2,087765969	0,000853056
GE79151	FABP2	-5,900824973	9,11033E-05	GE721358	NCEH1	-2,086642334	0,004836085
GE58010	CYP2C18	-5,896341157	0,001876827	GE79051	SORL1	-2,071774046	0,00055145
GE79288	LGALS2	-5,869157133	0,003758862	GE85522	OGDH	-2,070749921	0,00195344



GE56644	KRT8P12	-5,815016694	0,000769494	GE625872	HNF1B	-2,061684157	0,003985563
GE836271	BCL2L15	-5,814721119	0,000875367	GE83170	BCL2L14	-2,06057932	0,001772221
GE59346	F2RL1	-5,792528885	0,000168433	GE775279	GON4	-2,054432599	0,000462135
GE79395	GUCA2A	-5,768315198	7,95607E-05	GE533429	KLK8	-2,050804545	0,001717317
GE82588	SPINT2	-5,680403185	0,000785605	GE54632	CDT1	-2,036530376	0,002148516
GE53777	MYO5B	-5,672664995	0,000435755	GE772443	CCNL1	-2,036031667	7,05046E-06
GE82735	LRRC19	-5,658096046	0,000459696	GE60435	ACADS	-2,034954682	0,001942065
GE566577	HEPACAM 2	-5,61085255	5,83377E-05	GE56519	TMEM98	-2,023683023	0,001739706
GE58324	CCL14	-5,489126802	0,001085291	GE655456	CHN2	-2,023112668	4,7302E-05
GE83082	MOGAT2	-5,427420417	1,42405E-05	GE479342	CDHR1	-2,010689066	0,000286775
GE86989	AGR3	-5,425840607	8,13355E-05	GE62915	CMAS	-2,008353648	0,00337633
GE751196	C10orf99	-5,411217885	0,000359917	GE87534	ARHGAP28	2,000023105	0,00098525
GE79279	GUCY2C	-5,384914108	0,000976583	GE778233	ZEB2	2,007402615	0,004132208
GE727970	ETV6	-5,33902634	0,000323903	GE85173	LARP6	2,011915899	0,002842239
GE81139	SOX9	-5,326557125	0,004821385	GE81145	LOX	2,023439902	0,000459696
GE62376	RAB17	-5,321968606	0,000193329	GE55928	TMEM100	2,028176678	7,45522E-05
GE54869	SDCBP2	-5,237239811	0,000177665	GE587172	COL14A1	2,033084249	0,001421667
GE79536	PRSS8	-5,15749315	0,003028312	GE54838	NRIP1	2,03535437	0,003207809
GE541008	KRT20	-5,140183987	0,000185388	GE698477	PURG	2,035942288	0,002071019
GE62674	MS4A8B	-5,126662767	0,002576083	GE53440	DOCK4	2,039101137	0,003011581
GE61493	EPB41L4B	-4,908299669	0,000606206	GE88719	TTC39B	2,041321379	0,00228523
GE80330	FXD3	-4,894268783	0,000606206	GE81108	GBP1	2,042977526	0,004550486
GE82911	GRTP1	-4,869015185	8,62384E-05	GE668383	PCDH17	2,052890485	0,000185388
GE526537	FRMD1	-4,861831858	7,51035E-06	GE83806	NSFL1C	2,073181847	0,000185388
GE79815	EDN2	-4,841642869	0,001442068	GE741965	ACTA2	2,073977151	0,002249054
GE79278	DDC	-4,812177973	0,001190536	GE686248	SLC30A8	2,077636599	0,001325302
GE59182	INPP5J	-4,793723398	0,000309047	GE84897	ANXA1	2,085919285	0,003811355
GE62930	PKIB	-4,78198631	0,001734546	GE57829	F13A1	2,086637513	0,001476789
GE55402	GDPD2	-4,674612138	0,000140516	GE87948	CYR1	2,090589779	0,002539086
GE80325	CMBL	-4,659741748	0,000267909	GE62332	ADAMTS8	2,099428517	0,004574385
GE86970	NRXN2	-4,631169841	0,000586414	GE87586	FAM162B	2,10712125	0,00233701
GE79848	CAPN13	-4,560651716	0,002249054	GE59061	FASN	2,10876744	0,003386453
GE79754	DHX38	-4,492546179	0,001064563	GE548275	PCDHB11	2,118544354	0,001123095
GE503821	ANKS4B	-4,462142746	0,003112315	GE86429	PPCS	2,120214165	2,99127E-08
GE57508	MYBL2	-4,425222513	0,002207746	GE728246	SIK2	2,142853667	1,64464E-10
GE798518	KRT8	-4,381191675	6,73047E-05	GE87323	ACSS3	2,146396588	0,000544508
GE516887	RASEF	-4,334953946	7,47891E-05	GE81575	MEOX2	2,159059996	0,001442068

GE62291	CLDN7	-4,311659748	0,001458757	GE81776	RHOQ	2,159204667	0,000888467
GE59707	VIL1	-4,276231626	0,001497461	GE81109	GNAI2	2,159893234	0,003272615
GE81381	ANXA13	-4,257313506	0,001739706	GE81327	MPDZ	2,160097851	0,001041012
GE62478	CYP2S1	-4,255071379	0,00107295	GE61968	IL33	2,162979512	0,001914473
GE519515	PKIB	-4,247988911	0,003784762	GE60531	LOXL1	2,174102562	0,001233191
GE894819	ETV3L	-4,082340916	0,001837466	GE56772	PHLDB2	2,175640218	0,001555364
GE88652	ARL14	-4,047786882	0,000953756	GE54350	CACNA2D2	2,180662749	0,004211593
GE53544	LMO7	-4,036215861	0,001388998	GE58787	IRS1	2,192834098	0,00296585
GE80068	EDN3	-4,024371063	0,000606206	GE81208	RDX	2,198927441	0,002068411
GE57578	ACY1	-4,021563964	0,000947121	GE860844	COL5A2	2,210735868	0,002240648
GE58310	KCNK5	-3,990215506	0,001661574	GE52951	BCL6B	2,214708259	0,001391185
GE87131	GIPC2	-3,936399558	0,001976052	GE56388	COL12A1	2,218539131	0,001421667
GE55407	CDHR5	-3,917527313	0,00250892	GE53467	GPR116	2,222166114	0,000177665
GE59041	FUT6	-3,916314612	0,001787735	GE87782	PLSCR4	2,22692556	0,001723322
GE79225	COL17A1	-3,85246006	9,2259E-05	GE60462	NID2	2,236511226	1,25265E-05
GE57732	IMMT	-3,821281836	0,000960371	GE58791	MYH10	2,237834482	0,000267909
GE505673	KRTCAP3	-3,820248979	0,00107295	GE58722	PRRX2	2,238636052	0,004786116
GE80896	FUT3	-3,811326844	0,002890676	GE739463	ADAMTS9	2,239619014	0,000170742
GE80183	PBLD	-3,797701902	7,45522E-05	GE88844	TWIST2	2,245624434	0,003751623
GE81661	CAPN9	-3,77645693	0,000323903	GE88734	IGDCC4	2,25580652	0,002477165
GE82444	IL17RB	-3,771469259	0,00135603	GE87352	COL24A1	2,280526076	0,00250235
GE54360	BCAS1	-3,740151389	0,004550486	GE57788	CALCRL	2,280557692	0,001734546
GE62217	S100A14	-3,723346805	0,001041516	GE80888	ARHGAP26	2,282761284	6,64012E-05
GE841843	C9orf152	-3,686325162	0,001282267	GE571127	FLRT2	2,28872374	0,000515298
GE57437	SULT1B1	-3,667422977	0,002244658	GE57633	TNK2	2,289913866	6,40187E-14
GE53321	TMEM54	-3,655798785	0,003929091	GE78965	BST2	2,295486584	0,001243483
GE81237	SPINK1	-3,65351889	0,000798344	GE59409	PMS2P3	2,296924336	0,00207943
GE60154	PCK2	-3,640138475	0,001985849	GE59822	IGF1	2,298671011	0,001723322
GE549575	LRRC66	-3,619415328	0,000753746	GE54811	EFEMP2	2,298915332	0,002527001
GE489203	CDX4	-3,61666507	0,001057662	GE56148	MAN1C1	2,300573156	0,001663848
GE55087	PBLD	-3,610511739	0,000606206	GE53507	LY96	2,307344357	0,004508372
GE53346	COBL	-3,606176476	0,001942065	GE81041	TLCD1	2,308250821	0,000359449
GE55212	CLDN9	-3,57933936	0,00233701	GE61391	SNAI2	2,311939	0,002766853
GE85513	NAPE-PLD	-3,579099537	0,000128821	GE56542	NRP1	2,318866878	0,000109358
GE54595	TSPAN1	-3,572679919	0,003804459	GE60319	COL5A2	2,321638475	0,001282288
GE81755	CBLC	-3,54964152	0,000907387	GE87379	RBMS1	2,323425415	0,002365099
GE88450	DSC2	-3,531293335	0,000346819	GE54901	NRN1	2,3270088	0,001113599

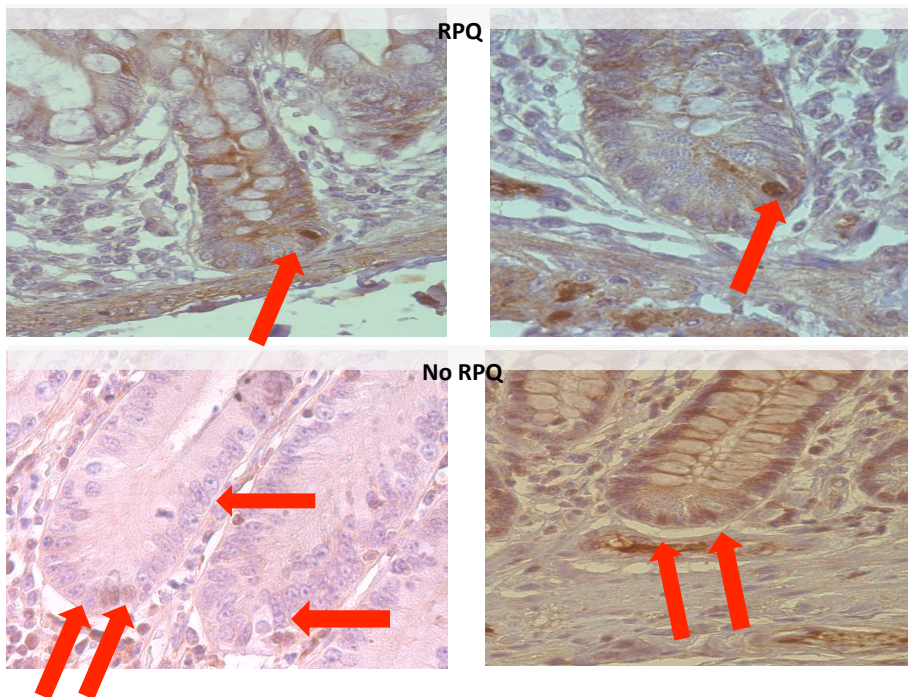
GE56013	ZNF449	-3,507225031	0,000593205	GE901927	ELAVL2	2,334591284	0,001787735
GE57442	NAT2	-3,496585218	0,000414504	GE816650	LDB2	2,343849603	0,004132208
GE61965	C8G	-3,488572138	0,000739733	GE54995	PCDH12	2,364032714	0,000848093
GE82815	FA2H	-3,478704177	0,00107295	GE81331	NRP1	2,364464257	0,000211588
GE569237	SPINT1	-3,467341656	0,002384146	GE690625	FERMT2	2,40942128	0,000546616
GE606599	FCRL1	-3,445706929	0,001102764	GE79985	LUM	2,431118135	0,000432826
GE477081	C19orf21	-3,440846023	3,74145E-05	GE857194	ACAD8	2,433079285	0,001322355
GE640715	FLJ35424	-3,420672535	0,003815859	GE79387	HTRA1	2,4368712	0,001282267
GE79546	C15orf48	-3,369761922	0,00347844	GE54222	PCDH17	2,446218602	0,001693644
GE59065	SLC12A2	-3,366827952	0,000187614	GE86655	PBP	2,44703262	0,000578777
GE55905	SLC9A10	-3,364479506	0,000286775	GE61242	ATP2C1	2,449448004	0,004299713
GE79825	LGALS4	-3,352235103	0,001720326	GE712267	APOL1	2,464554128	9,20968E-05
GE87706	CPEB2	-3,34140147	0,001495217	GE559599	STEAP4	2,474916755	0,001243483
GE523088	CABP2	-3,320544885	0,001739706	GE674173	GPR161	2,500916113	0,001745235
GE54290	PPAP2C	-3,314657946	0,000432826	GE617460	NRP1	2,515258481	0,002249054
GE86732	CALML4	-3,284430717	0,002463883	GE697567	SVEP1	2,51844519	0,001686801
GE62517	RBKS	-3,2769644	0,001081324	GE600812	ZHX2	2,52124561	0,00051058
GE82525	PDXP	-3,237492087	4,05998E-05	GE85491	LOX	2,524311588	0,000578777
GE55443	A1CF	-3,228662559	0,001273644	GE58705	EGFL7	2,53642529	8,13355E-05
GE81963	KBTBD11	-3,149159144	0,000907387	GE61906	SERPING1	2,540137629	0,004744626
GE81021	PRDM10	-3,142305249	4,48596E-07	GE85858	ABCC9	2,545536937	0,00412868
GE79404	SPDEF	-3,133525355	0,001243483	GE54056	LILRB2	2,557894332	0,001146408
GE60091	ACYP2	-3,115175264	0,003675802	GE84815	SLC2A3	2,59273244	0,00187573
GE85682	PRAP1	-3,077630431	0,004254458	GE80208	CTSK	2,625732596	0,000452115
GE61812	NROB2	-3,064425575	0,004653292	GE79710	RARRES2	2,635012855	9,11033E-05
GE60155	DEFB1	-3,015805388	0,002316712	GE890536	DNM3	2,639430479	0,001076392
GE512600	OR11H12	-3,000861358	0,001723322	GE831098	GPC6	2,655064054	0,000988162
GE543384	C11orf52	-2,99678725	0,002617339	GE85664	ESAM	2,655702119	0,000187614
GE730357	USP45	-2,993057511	0,001539071	GE83515	GPR124	2,670969188	0,001495151
GE57495	PYCRL	-2,990071535	0,001282267	GE61778	GLT8D2	2,679121482	0,000740908
GE81271	EZR	-2,977132297	0,000829893	GE595056	BMP5	2,691405928	0,003207809
GE57947	TSPAN8	-2,976265715	0,000862399	GE54304	TPST1	2,696983447	0,000557023
GE88714	C3orf52	-2,973743061	0,001663848	GE476683	RAB3C	2,700706132	0,00018564
GE63157	CLDN8	-2,932369015	0,000298797	GE57653	LOX	2,71336538	0,00018985
GE82149	TDP2	-2,927907549	9,11033E-05	GE553808	NOD2	2,718806229	0,000185388
GE62870	HOOK1	-2,916726274	0,004211593	GE56445	PDE1A	2,718831356	0,00061297
GE54213	PROM1	-2,912254963	0,000976583	GE57062	ANGPT1	2,720276562	0,00228523

GE528842	MGC1305 7	-2,903842757	0,000160899	GE81856	RGCC	2,726184747	0,004330122
GE579836	TMEM92	-2,882205761	0,002256415	GE79019	S100A4	2,733071747	0,003025322
GE712944	ATP1B4	-2,880794333	0,000384671	GE881916	ARID5B	2,736477511	0,002600078
GE58215	SOX9	-2,880002372	0,003922651	GE514839	TPT1	2,738140861	0,00290697
GE82908	ELMO3	-2,877262139	0,001739706	GE60059	CDH5	2,76626621	0,000452115
GE517400	SLC51B	-2,857446856	0,00018564	GE54355	SPRY1	2,769828529	0,00368392
GE60518	EPCAM	-2,8424008	4,0026E-06	GE616687	TGFBR1	2,778449464	0,000459696
GE59398	POLRMT	-2,826806896	0,003136587	GE87558	GRASP	2,786434035	0,000795702
GE88647	RAB25	-2,81915604	0,003112315	GE80543	NFIC	2,789513113	0,004155939
GE61905	PXMP2	-2,810856884	0,003988453	GE61393	SVEP1	2,823875858	0,004211593
GE822540	TPTEP1	-2,785301172	0,000806645	GE875677	JMJD2C	2,829008804	1,06836E-06
GE53186	NEDD4L	-2,765454617	1,25265E-05	GE83553	C13orf33	2,857400641	0,002539086
GE54853	C9orf82	-2,75803991	0,000945475	GE81167	SERPINF1	2,866055738	0,000515298
GE85420	CASC5	-2,749869841	0,002064481	GE57918	PRKAR2B	2,903292646	0,000359917
GE82218	RNF43	-2,723106361	0,000653027	GE80890	COL5A1	2,931799953	0,001993526
GE59161	SEPHS2	-2,708755166	0,001391185	GE604079	EBF1	2,964762763	0,003616015
GE57082	KIAA0101	-2,704546433	0,004211593	GE591600	LDB2	2,967798892	0,000547391
GE59554	SORL1	-2,703628011	0,000185388	GE57381	PXDN	2,978859336	0,00224732
GE80645	MAS1	-2,703340678	1,88138E-05	GE528803	DARS	2,989125216	0,001723322
GE542869	RAB3IP	-2,686355059	0,00454341	GE79421	PTGER1	2,989677774	0,000764424
GE818661	CHDH	-2,668970452	0,001484345	GE481244	ABCC9	3,000729625	0,002538175
GE79295	NEURL	-2,646104431	0,000539073	GE589951	LHFP	3,00703154	0,002576083
GE62762	FMO5	-2,639875698	0,001114749	GE86041	FAM13C	3,016446511	0,000456364
GE59886	ADH6	-2,634361501	0,001649419	GE85541	AEBP1	3,019277444	0,000128821
GE83060	GPR110	-2,623931395	1,09439E-05	GE782559	IGF2	3,027597316	0,001686801
GE797432	SCAMP4	-2,610862837	0,003106067	GE79622	ANGPTL2	3,066422877	0,000350864
GE61497	RPS26	-2,586252856	0,000534241	GE80040	LINC00312	3,102253685	0,00026946
GE79495	TMEM12 5	-2,566235078	0,001336763	GE59766	NAA60	3,105143624	5,8991E-06
GE58034	FGFR3	-2,562833937	0,000143291	GE498686	AZ12	3,152449661	5,09393E-05
GE62363	NAAA	-2,560839201	0,001458757	GE84993	TSHZ2	3,177385198	0,000193329
GE55366	FZD5	-2,551566661	0,002766853	GE80889	COL1A2	3,178170816	0,001458757
GE478597	TJP2	-2,545566344	0,001076392	GE480319	ELAC2	3,191371738	0,002405737
GE87405	CACNA1D	-2,537128634	0,000316356	GE60045	CTGF	3,193872379	0,000147412
GE83377	MGC1305 7	-2,537105186	0,000606206	GE88171	C15orf33	3,202725161	0,000675249
GE58132	GFPT1	-2,5311150574	0,001730525	GE769164	C21orf34	3,222752358	0,000478986
GE87816	FAM110B	-2,527188598	0,000626473	GE59602	EML1	3,245415814	0,001414151

GE80547	ADD3	-2,522346835	0,001282288	GE58699	VGLL3	3,251217336	0,003804459
GE54690	DCAF16	-2,508856579	0,000509139	GE58895	TP73-AS1	3,299223849	0,001081324
GE87002	SLC12A2	-2,505983068	0,00285831	GE83251	CRISPLD1	3,303754916	2,89278E-08
GE594636	NEDD4L	-2,504946863	0,004550486	GE778324	TSHZ2	3,317209203	0,000829893
GE494820	HS3ST4	-2,498444204	0,000809812	GE605822	COL4A1	3,318313058	0,000888467
GE60525	MNX1	-2,496932233	0,000625553	GE785393	CCDC80	3,359135519	0,000432826
GE485154	LOC10028 8208	-2,48987503	0,001263766	GE620624	COL3A1	3,360711423	0,000143291
GE81158	MUC2	-2,487764635	0,00071026	GE79216	MYBPC2	3,373072513	0,001500482
GE87046	POC1B	-2,485070303	0,003150524	GE88806	MMP2	3,440742674	6,35019E-05
GE80022	TMEM45 B	-2,46735163	0,001071767	GE79586	ANGPT2	3,503297078	0,000211942
GE82225	FLVCR2	-2,461355992	0,002426689	GE62064	GNG11	3,533660243	8,13355E-05
GE575063	ABCG2	-2,461151271	0,003106067	GE538358	PTPRN2	3,539281878	0,004447293
GE842830	CDH17	-2,46042351	0,003031098	GE86121	IGFBP5	3,543348419	0,000132789
GE60440	SH3BP1	-2,460287079	1,62781E-05	GE58382	LHFP	3,642224878	0,002857057
GE756437	C3orf21	-2,449210319	8,55211E-05	GE60393	CDO1	3,649233164	0,002833503
GE61583	VAMP5	-2,440945358	0,002595758	GE56370	UQCRFS1	3,699995031	0,00131997
GE527765	AGMAT	-2,436966918	0,000459696	GE87473	RBP7	3,745521664	0,001322405
GE748884	NR3C2	-2,426667873	0,000644892	GE60216	TWIST1	3,802276198	0,004120833
GE602663	MYH15	-2,411303643	0,002697865	GE79835	MMP2	3,873935678	0,00454341
GE60236	PTPRF	-2,409978039	0,00233701	GE79587	COL4A1	3,888687583	7,45522E-05
GE79285	IRF6	-2,404138482	0,001993526	GE86507	STEAP4	3,929448018	0,000572103
GE553892	SNTG2	-2,402006408	0,00207943	GE58613	FCN2	3,972847273	0,000134484
GE85411	CHMP4C	-2,399571275	0,003386453	GE602927	KIF6	4,121577625	0,001085633
GE88524	NEGR1	-2,358260896	0,000452115	GE722090	ELTD1	4,244868907	9,11033E-05
GE88112	PRELID2	-2,358228204	0,004194921	GE62048	ELTD1	4,403864255	2,52413E-05
GE83406	FAM195A	-2,357411046	0,004587117	GE57824	SERPINE1	4,455436151	0,000739733
GE85790	CCDC57	-2,342317534	0,003751623	GE81644	PDPN	4,479910779	0,002409121
GE58822	RND3	-2,339548278	0,001618876	GE81042	CYR61	4,572056821	0,001800567
GE54537	M6PRBP1	-2,331911979	0,004155939	GE651338	IGHG1	4,806866268	0,004572797
GE57789	HPGD	-2,329849341	0,000359449	GE61151	FAP	4,972495274	9,72807E-05
GE882451	C7orf50	-2,327127087	0,001663848	GE83517	RSPO3	5,008377589	7,45522E-05
GE55318	CHDH	-2,324263014	0,004724368	GE746940	INHBA	6,203432304	0,000177665
GE83776	GPLY	-2,322802781	0,000251337	GE79962	GREM1	6,312274742	0,000128821
GE54873	ZDHHC23	-2,319172288	0,00193988	GE62329	CYP1B1	6,345043259	2,58751E-05
GE80256	MB	-2,314600705	0,00164813	GE56421	CHRDL2	7,755536938	0,000193329
GE57985	EFNA1	-2,311255362	0,001570939				

## ANEXO 12. Resultados de las tinciones de células madre y células de Paneth

1. Células madre en las criptas (flechas rojas) entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz. Tinción anti-Lrg5, x400. RPQ = recurrencia post-quirúrgica precoz



2. Células de Paneth en las criptas (flechas azules) entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz. Tinción anti-lisozima, A. x 100; B. x 200.

RPQ = recurrencia post-quirúrgica precoz

