



00550

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Caracterización del efecto antitumoral,  
en un modelo de cáncer cervicouterino *in vitro*,  
del extracto vegetal L3”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. LEAFAR ALFONSO PÉREZ ROMANO**



TUTOR: DR ANDRÉS GUTIÉRREZ LÓPEZ.

MÉXICO, D.F.

2005

0350927



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios,

por la luz que me entregas día a día permitiendo que el camino sea menos azaroso.

A Karla,

el único y verdadero amor de mi vida, por toda tu paciencia y tanto amor con el que me has acompañado a lo largo del camino.

A mi Madre,

por los sabios consejos con los que siempre me orientas en los momentos difíciles.

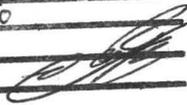
A mi Padre,

por tu apoyo incondicional en todo momento.

A Diana y Andrés,

por creer en mi, apoyarme y, principalmente, por brindarme su amistad.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Leafar Alfonso  
Pérez Romano  
FECHA: 25/11/05  
FIRMA: 

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>..... 1</b>
<b>1. Cáncer</b>	<b>..... 1</b>
<b>2. Virus del Papiloma Humano (VPH)</b>	<b>..... 4</b>
<b>3. Displasias</b>	<b>..... 7</b>
<b>4. Vacunas contra el VPH</b>	<b>..... 10</b>
<b>5. Lignina</b>	<b>..... 11</b>
<b>6. L3</b>	<b>..... 14</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>..... 15</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>..... 16</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>..... 17</b>
<b>MATERIAL</b>	<b>..... 18</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>..... 19</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>..... 26</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>..... 43</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>..... 51</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>..... 51</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>..... 52</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>..... 56</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>..... 63</b>

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino es un grave problema de salud en México y en el mundo, la presencia del virus del papiloma humano (VPH) esta asociada en mas del 95% de los casos y los tratamientos contra dicha enfermedad son insuficientes, por ello se tiene la necesidad de contar con fármacos que sean cada vez mas específicos y que además sean capaces de actuar en las etapas tempranas de este mal (displasias). El extracto vegetal L3, propiedad de la empresa Oculus Innovative Sciences, es un derivado de la lignina, componente principal de la pared celular de diversas plantas superiores, que es sabido tienen una variedad de efectos biológicos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la caracterización del efecto biológico del extracto L3 en un modelo de cáncer cervicouterino, *in vitro*. El extracto vegetal L3 mostró tener un efecto citotóxico en 4 líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino (HeLa, SiHa, Ca Ski, y C33a) en una forma dependiente de dosis, con una  $IC_{50}$  promedio de 12.5% (v/v). El extracto L3 fue capaz de arrestar el ciclo celular de células HeLa (G2/M) y este efecto esta relacionado con una acumulación de ciclina B1. La muerte celular que se presentó por la exposición de las células al extracto L3 fue asociada con necrosis, ya que no se presentó marcaje con Anexina-V, ni fragmentación internucleosomal del DNA; sin embargo, se observó un incremento en la liberación de LDH al medio de cultivo. Los resultados del análisis por microscopia electrónica apoyaron la propuesta de un proceso necrótico ya que no se observó la condensación de la cromatina, ni la formación de cuerpos apoptóticos, características de dicho proceso y, en cambio, si se observó un daño importante en el citoplasma de las células, siendo el retículo endoplásmico y las mitocondrias dos de los organelos mayormente afectados. El extracto vegetal L3 indujo cambios en la expresión genética de mas de 500 genes de células HeLa y debido a su arresto en la fase G2/M aumentó la sensibilidad de las células a la radiación ultravioleta. Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo es posible proponer al extracto vegetal L3 como un nuevo antineoplásico que pudiera ser utilizado en displasias cervicales, siendo capaz de detener el crecimiento maligno a través del arresto y la muerte celular.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Cáncer

El cáncer se puede definir como una enfermedad originada por un conjunto de células que no obedecen a los controles regulatorios de proliferación, diferenciación y/o muerte celular, es decir, aquellas células que se reproducen sin control de manera indiferenciada y que no responden a los mecanismos naturales de muerte programada (apoptosis), y por tanto son capaces de formar colonias de células cancerígenas llamadas tumores. En el caso de los tumores malignos, las células cancerígenas son capaces de atravesar la lámina basal del tejido donde se encuentran y por ende invadir otros tejidos (cáncer invasor, Figura 1), e inclusive atravesar capilares sanguíneos produciendo lo que se conoce como metástasis, que es la implantación de células cancerígenas en diferentes tejidos u órganos.

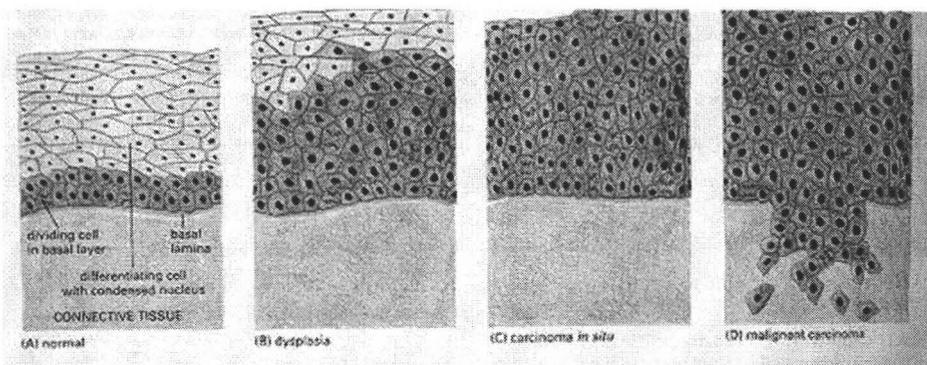


Figura 1. Representación de la diferenciación celular encontrada en A) un epitelio normal, B) una displasia, C) un carcinoma *in situ* y D) un cáncer invasor.

Los mecanismos de transformación de una célula normal a una célula tumoral están en su mayoría bien definidos y se pueden clasificar en tres motivos: 1) mutaciones espontáneas o hereditarias en el material genético de la célula 2) factores físicos y/o químicos que son capaces de generar mutaciones y 3) la incapacidad de la célula para revertir el daño o en su defecto programar su muerte.

### a. Epidemiología del cáncer

En el mundo se reportan alrededor de 10 millones de casos nuevos de cáncer y 6 millones de pacientes fallecen por este padecimiento cada año. Se tiene reportado que actualmente el cáncer es responsable de aproximadamente del 13 al 15% de todas las muertes, superado únicamente por las enfermedades infecciosas (25.9%) y cardiovasculares (30%). Para el año 2020 se calcula que el número de

muerdes será de 10 millones por año y el 47% de éstas corresponderá a países desarrollados, mientras que el 53% a países en vías de desarrollo. <sup>(1)</sup>

### b. Cáncer Cérvico Uterino (CaCU)

Este tipo de cáncer tiene una repercusión muy alta en el población mundial, ya que al año se reportan cerca de 500 mil casos nuevos y 230 mil mujeres mueren anualmente, esto significa que, aproximadamente cada minuto surge un caso nuevo de CaCU, mientras que cada dos minutos muere una mujer por este mal. A diferencia de otros tipos de neoplasias, cerca del 80% de los casos corresponden a países en vías de desarrollo (Figura 2), ya que en estos no se cuenta con programas de detección oportunos y otras veces se presentan barreras culturales o económicas que impiden la detección temprana de este cáncer. Por ejemplo, en los países desarrollados el 40% de las mujeres se han sometido a un tamizaje para determinar la presencia de neoplasias cervicouterinas, mientras que en los países en vías de desarrollo únicamente el 5% de las mujeres la ha hecho. <sup>(1)</sup>

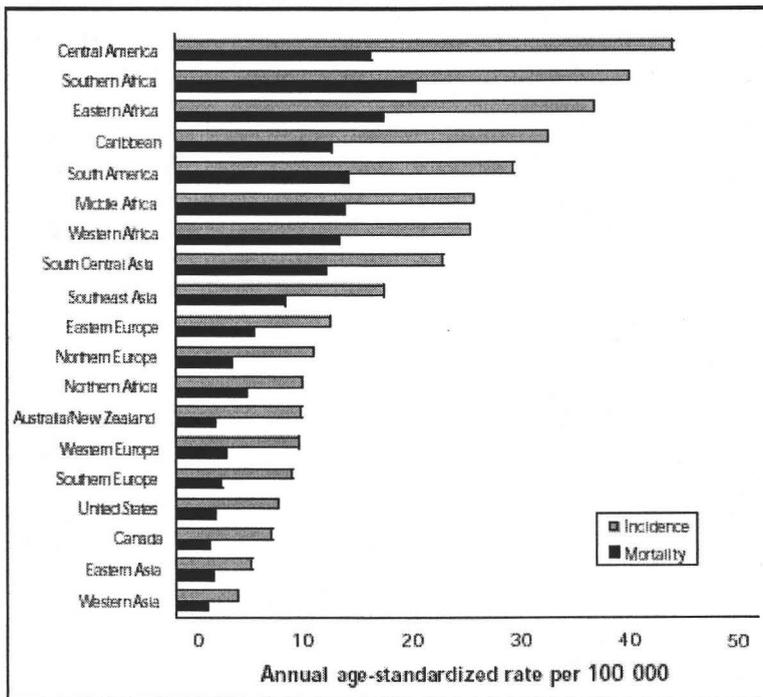


Figura 2. Rangos de incidencia y mortalidad anuales (por cada 100 000 mujeres) del cáncer cervicouterino en el mundo. <sup>(2)</sup>

En nuestro país es la principal causa de muerte por cáncer, ya que 1 de cada 1000 mujeres de 35 a 55 años de edad padece CaCU y cada dos horas muere una paciente por este mal. <sup>(3,4)</sup>

### **c. Factores de riesgo CaCU**

Es un hecho que esta patología está matizada por múltiples factores, que a falta de la posibilidad de comprobar su relación causal con el desarrollo del cáncer, sí han probado su asociación significativa y su influencia determinante para que el riesgo de padecer la enfermedad aumente cuando estos factores están presentes.

Los factores de riesgo principalmente asociados al CaCU, ya sea en su estado premaligno (displasias) o como neoplasia francamente invasora, son:

- Edad entre los 25 – 64 años.
- Edad al primer coito antes de los 18 años.
- Ausencia de detección citológica (Ej, Papanicolau).
- Cuadros frecuentes de infecciones de transmisión sexual que involucren principalmente al virus del papiloma humano (VPH) y al herpes virus tipo II.
- Paridad mayor a cinco partos.
- Edad al primer embarazo menor a 15 años.
- Inflamación cervical crónica resistente al tratamiento médico convencional.
- Antecedentes de manipulación cervical (legrado uterino instrumentado o cerclaje).
- Estatus socioeconómico bajo.
- Tener más de 5 o 6 parejas sexuales.
- Tabaquismo crónico.

Al analizar los factores de riesgo propuestos se puede observar que además de existir los factores biológicos inherentes al sexo y a la edad, el resto de ellos están relacionados al comportamiento sexual y reproductivo de la mujer, el cual está a su vez asociado con su entorno socioeconómico y cultural.

Aunque muchos de los factores capaces de iniciar un CaCU son bien conocidos, poco se ha estudiado de los factores no biológicos que contribuyen a la progresión de éste a los estadios en los que su curación es imposible. Por el contrario, se sabe que la edad, el estado del sistema inmune de cada mujer, la coexistencia de otras patologías, la estirpe histológica de la neoplasia y principalmente la presencia de tipos de VPH altamente oncogénicos son factores biológicos que pueden hacer progresar un CaCU hasta la muerte de la paciente.

En Noviembre de 1991, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer y la Organización Mundial de la Salud concluyeron oficialmente, en base a los datos epidemiológicos y de laboratorio, y a la asociación mostrada entre la infección por VPH con la presencia de cáncer cervicouterino, que la infección por el virus del

papiloma humano debe ser considerada como una causa del desarrollo del cáncer cervical. <sup>(5)</sup> Por ello, es un hecho que la detección temprana y por ende el tratamiento de las lesiones premalignas o displasias son la clave en la lucha contra la progresión del cáncer cervicouterino.

## 2. Virus del Papiloma Humano (VPH)

El VPH pertenece a la familia Papovaviridae, del cual han reconocido más de 130 genomas diferentes, los cuales han sido divididos en cutáneos y los que infectan la mucosa. Estos últimos han sido subdivididos en VPH's de alto riesgo y VPH's de bajo riesgo, dependiendo de la lesión con la cual han sido asociados. Los de alto riesgo están predominantemente asociados con cáncer cervicouterino, mientras que los de bajo riesgo se han detectado comúnmente en verrugas genitales. <sup>(6)</sup>

### a. Estructura

El VPH es un virus de DNA de doble cadena de 7900 pb en forma de un complejo parecido a cromatina con histonas celulares. Las partículas virales son proteináceas, no encapsuladas con un diámetro de 55-60 nm y una estructura icosaédrica de 72 capsómeros. Las secuencias codificantes están localizadas solo en una de las hebras del DNA y los marcos de lectura se clasifican en tempranos (E1 a E7, del inglés "Early genes") ó tardíos (L1 y L2, de "Late genes"), dependiendo de su expresión en el ciclo de vida del virus, y en la región reguladora no codificante (LCR, long control region ó URR, upstream regulatory region). La función de cada una de las proteínas codificadas por estos genes se describe a continuación: <sup>(6, 7)</sup>

- E1 Actividad de helicasa de DNA, ATPasa. Juega un papel importante en la replicación y en el control de la replicación.
- E2 Regula la transcripción y la replicación viral, controla la expresión de los genes tempranos, en compañía de E1 determinan la eficiencia de la replicación del DNA.
- E3 La función de esta proteína es desconocida, solo se ha encontrado en algunos tipos de VPH.
- E4 Expresado como un gen tardío sobre todo en la diferenciación del epitelio, participa en la infección productiva, asociado con el citoesqueleto de queratina de las células epiteliales en cultivo, participa en la salida del virus.
- E5 Actividad transformante en VPH-16 *in vitro*. Probablemente estimula la proliferación celular benigna *in vivo*, pero podría participar en la iniciación de la carcinogénesis.
- E6 Participa en el proceso de transformación junto con E7. Tiene propiedades de activación transcripcional. La proteína E6 de los VPH's de alto riesgo inactiva p53 por inducción de su degradación.

- Junto con E7 provee de un ambiente celular idóneo para la replicación viral. (Figura 3)  
 E7 Propiedades transactivantes similares al adenovirus del promotor E2, induce la síntesis de DNA en células quiescentes. E7 se une a la forma hipofosforilada de la proteína Retinoblastoma (pRb) dando como resultado una inactivación funcional permitiendo la proliferación celular hacia la fase S del ciclo celular. (Figura 3)  
 E8 Función desconocida, solo está presente en algunos tipos de VPH.  
 L1 Proteínas de la cápside mayor.  
 L2 Proteínas de la cápside menor.

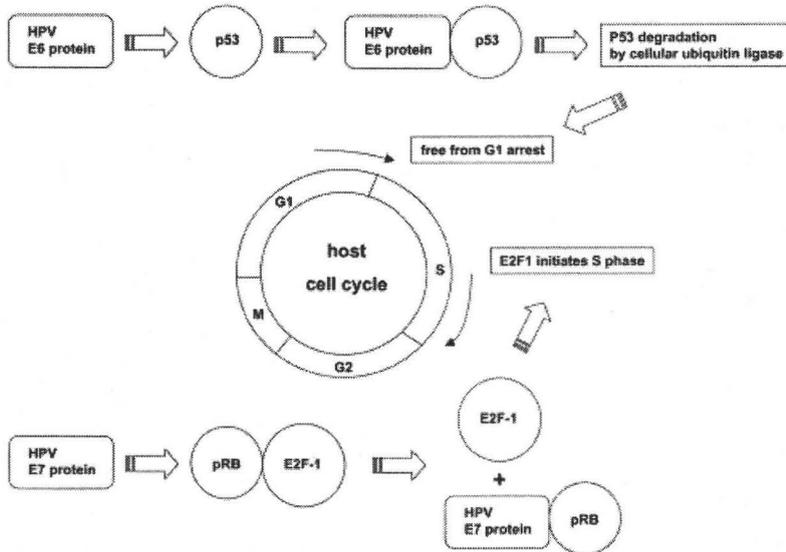


Figura 3. Mecanismo de acción de las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo asociado a la promoción de la proliferación celular.

### b. Ciclo de Vida del VPH

El VPH logra entrar a las células a través de su unión con ligandos de la superficie celular. El receptor específico aún no ha sido identificado, sin embargo, se sugiere que la familia de  $\alpha_6$ -integrinas pudiera estar involucrada. <sup>(8)</sup>

El ciclo de vida del VPH está ligado a la diferenciación de los queratinocitos y presenta, tanto un ciclo no productivo, como uno productivo. La etapa no productiva involucra el establecimiento del genoma viral en forma de plásmido nuclear, con un bajo número de copias de DNA. Esto sucede en la proliferación de la capa basal del epitelio donde, una vez que ha infectado, el VPH replica su DNA al mismo tiempo que las células para establecer un estado estacionario de la

expresión de su genoma. Debido a que las células infectadas continúan con su ciclo de vida normal, un subconjunto de células hijas dejan la membrana basal para estratificarse y diferenciarse. Esto conduce a la etapa productiva del VPH, la cual ocurre en la capa terminal del epitelio ya diferenciada; durante ésta etapa el VPH amplifica su genoma a un gran número de copias y expresa sus genes tardíos, dando lugar a la producción de su progenie viral.<sup>(9)</sup>

### **c. Transformación Celular**

Cuando los tipos de VPH están asociados a lesiones benignas de la piel, el genoma viral se replica de forma extracromosomal, es decir, como episomas independientes del DNA de la célula huésped. En contraste, en la mayoría de las lesiones malignas, el DNA viral se encuentra insertado en los cromosomas de la célula huésped. Cuando esta integración ocurre, un rompimiento en el genoma viral obliga a la pérdida de la región que codifica para las proteínas E1/E2 y como consecuencia se produce una desregulación de las proteínas E6/E7, induciendo así, la transformación celular, en la cual, de acuerdo al ya mencionado mecanismo de acción de las proteínas E6 y E7 del VPH, la célula es capaz de escapar de los controles que regulan su crecimiento celular, su proliferación y la adecuada replicación de su genoma.<sup>(6)</sup>

### **d. Teoría de la carcinogénesis inducida por VPH**

El conocimiento que se tiene actualmente sobre la transformación celular generada por la infección por VPH no es suficiente para explicar como una célula fenotípicamente tumoral es capaz de llegar, inevitablemente, hasta un carcinoma cervical, ya que se ha visto la frecuente regresión espontánea de la infección por VPH y un gran retraso entre la infección persistente y la aparición de la malignidad. Por ello, se ha tratado de proponer la presencia de cofactores innatos a la célula infectada por VPH que hagan progresar irreversiblemente a la célula huésped hasta un carcinoma, sin embargo no se sabe ni como ni cuando actúan estos factores o cofactores. Algunos autores han propuesto una teoría para la carcinogénesis inducida por VPH, en ella se propone que la asociación de E7 con pRb provoca que ésta se disocie de su unión con la histona desacetilasa 1 (HDAC1) y como consecuencia la aberrante sobreexpresión de la proteína Notch-1, la cual induce al carcinoma escamoso del cervix.<sup>(7)</sup>

HDAC1 es una proteína que en unión a pRb mantiene la estabilidad entre el DNA y el nucleosoma funcionando como barrera para la expresión de genes relacionados con la proliferación celular; al desestabilizarse esta unión, la sobreexpresión del gen Notch-1 es inevitable, dando lugar a una proteína transmembranal cuya función es determinar la progresión de células inmaduras a estados más diferenciados. Los niveles de la proteína Notch-1 en células cervicales están altamente relacionados con la evolución de las displasias (NIC I a NIC III) y en el cáncer invasor su presencia es mucho mayor.<sup>(10)</sup>

### 3. Displasias

#### a. Clasificación de las lesiones preinvasoras del CaCU

La detección del CaCU se realiza principalmente a través de la citología cervical, la cual consiste en un análisis histológico de las características de las células del epitelio del cervix y del canal endocervical, utilizando una técnica de tinción conocida como técnica de Papanicolaou. Este método permite realizar un diagnóstico citológico, el cual puede ser desde la ausencia de lesión hasta el cáncer invasor de acuerdo a la siguiente clasificación:

- Clase I: Negativo a anomalías celulares.
- Clase II: Negativo a cambios celulares sugestivos de neoplasia, con cambios sugestivos de inflamación inespecífica.
- Clase III: Sospechoso por la presencia de cambios celulares atípicos no concluyentes de neoplasia.
- Clase IV: Altamente sospechoso de carcinoma cervical.
- Clase V: Carcinoma invasor del cervix.

Sin embargo, esta clasificación es muy antigua y no detalla las lesiones preinvasoras (displasias) ni el cáncer *in situ*, por lo que fue necesario la realización de otras clasificaciones. (Tabla 1)

La clasificación de Reagan utiliza el término “displasia” para referirse a las lesiones histológicas que constituyen la etapa preinvasora del CaCU. El término displasia significa maduración anormal de las células y este tipo de daño incluye cuatro características principales:

1. Inmadurez celular
2. Desorganización celular
3. Anormalidades del núcleo de la célula.
4. Aumento de la actividad mitótica de las células (división celular).

Papanicolaou	Clase I Negativo	Clase II Inflamatorio	Clase III Sospechoso		Clase IV Altamente Sospechoso	Clase V Cáncer Invasor
Reagan	Normal		Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia severa y cáncer <i>in situ</i>	
Richart	Normal		Coilocitosis	NIC I	NIC II	NIC III
Bethesda	Normal		Lesiones intraepiteliales de bajo grado	Lesiones intraepiteliales de alto grado		

Tabla 1. Clasificación de las lesiones preinvasoras.

La clasificación de Richart utiliza el término “neoplasia intraepitelial cervical” (NIC) para resumir el concepto de daño epitelial de las mismas lesiones preinvasoras del

cervix. Estas lesiones se caracterizan por cambios morfológicos celulares que incluyen núcleos hiper cromáticos, aumento de la relación entre el tamaño del núcleo y el citoplasma y mayor índice mitótico. Este tipo de lesiones se encuentran únicamente en el epitelio escamoso, es decir, que no llegan a la membrana basal. Por ello, la gravedad de la displasia se determina por la localización o profundidad a la que se encuentran este tipo de células desdiferenciadas: <sup>(1)</sup>

- NIC I (Displasia Leve): cambios epiteliales limitados y confinados a un tercio del grosor del epitelio cervical.
- NIC II (Displasia moderada): cambios epiteliales más intensos, sin evidencia de malignidad que involucran a la mitad del espesor del epitelio.
- NIC III (Displasia severa): cambios epiteliales que exhiben todas las variedades de daño celular, sin evidencia de malignidad y ocupan la totalidad del grosor epitelial.
- Cáncer *in situ*: está definido como el grado máximo de lesión celular intraepitelial, e incluye a todos los daños celulares con características de malignidad, pero todavía se encuentra confinado al epitelio y no ha penetrado el estroma cervical que se encuentra por debajo de la membrana basal, y por tanto no está en contacto con vasos sanguíneos o linfáticos.

Existen casos en los que se presenta de forma aislada daño celular inflamatorio severo con la presencia de células denominadas “coilocitos” que sugieren la presencia intracelular del VPH en el epitelio cervical. El genoma del VPH tipos 16, 18, 45, y 31 se ha encontrado integrado a las células de los tejidos intraepiteliales con lesiones de alto grado y cáncer invasor en más del 95% de los casos y se ha visto que la infección por VPH puede coexistir con cualquiera de los tres grados de gravedad de la displasia y con el cáncer *in situ*.

Por último, el sistema de clasificación desarrollado por los especialistas del Hospital de Bethesda en Maryland, EUA, utiliza los términos “Lesiones intraepiteliales de bajo grado” y “Lesiones intraepiteliales de alto grado” para clasificar a las lesiones precursoras del CaCU, su fundamento radica en que, si bien todas las lesiones preinvasoras del cervix tienen la capacidad de convertirse en lesiones malignas e invasoras que causan la muerte, la infección por VPH y la displasia leve se consideran lesiones de bajo grado de severidad con menos posibilidades de evolucionar a una lesión invasora, mientras que la displasia moderada y la grave se consideran lesiones de alto grado de severidad y con mayores posibilidades de evolucionar a lesiones francamente invasoras.

## **b. Evolución de las lesiones preinvasoras del CaCU**

Una vez que se han iniciado los cambios patológicos celulares y tisulares del cervix, éstos evolucionan paulatinamente, pasando por todos los grados de severidad de la displasia hasta convertirse en neoplasia invasora. (Figura 4)

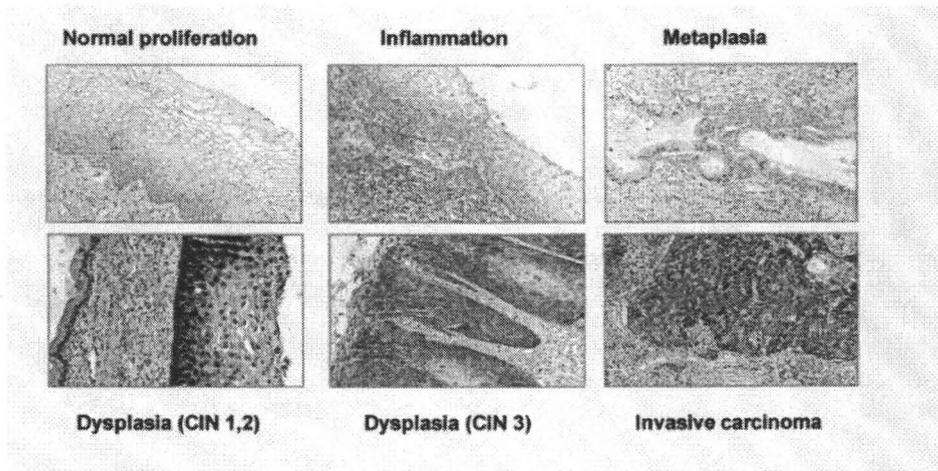


Figura 4. Evolución de las displasias hasta cáncer invasor. Tinción Hematoxilina-Eosina.

Este proceso evolutivo de las lesiones cervicales preinvasoras a cáncer invasor toma un tiempo de entre 2 y 10 años. (Tabla 2)<sup>(11)</sup>

	<b>2 años</b>	<b>5 años</b>	<b>10 años</b>
<b>NIC I – NIC II</b>	11.1%	20.4%	28.8%
<b>NIC I – NIC III</b>	2.1%	5.5%	9.9%
<b>NIC II – NIC III</b>	16.3%	25.1%	32.0%

Tabla 2. Evolución de las displasias a los 2, 5 y 10 años de haber sido detectadas.

A medida que se aumenta la gravedad de la displasia, disminuye la capacidad del epitelio de autorrestaurarse y regresar a la normalidad, es por ello que se ha notado que el 44% de las displasias leves sanan espontáneamente, mientras que para las displasias moderadas solo el 33% muestra regresión espontánea y, únicamente el 5% de las displasias severas muestran cambios hacia la benignidad.<sup>(11)</sup>

En la medida que sea posible interferir o inclusive impedir la evolución de las displasias, se obtendrá un profundo efecto benéfico en el tratamiento del CaCU, por lo que hay muchos grupos trabajando en ello.

### c. Tratamiento de displasias

El procedimiento y los tipos de tratamiento para el cáncer cervical son determinados por varios factores complejos, incluyendo el tamaño, la etapa, o las características histológicas del tumor, así como la preferencia de las pacientes con respecto a la cirugía o a la quimio/radioterapia. En general, una vez que se ha

detectado una progresión moderada de células malignas defectuosas en lesiones intraepiteliales no invasoras, la crioterapia es el tratamiento de elección, ya que estas pacientes generalmente conservan su fertilidad.

La crioterapia usualmente se lleva a cabo con una sonda a temperaturas extremadamente bajas, la cual es capaz de inducir necrosis alrededor del tejido anormal, en otros casos se puede utilizar también un rayo láser de dióxido de carbono ya que con éste se logra que el tejido se recupere más rápido y con menos distorsión; sin embargo, este procedimiento es más caro.

Al paso del tiempo se han buscado otros tipos de tratamientos como son los agentes antivirales o los inmunomoduladores; por ejemplo, el cidofovir es un derivado acíclico de un nucleósido fosfonato y se ha visto que tiene actividad contra los virus de DNA pues es capaz de inhibir la proliferación anormal de la célula. <sup>(12)</sup> Otros compuestos que se han probado para el tratamiento de pacientes con cáncer cervicouterino son la podofilina, un agente citotóxico que arresta a las células durante la metafase y el vidarabin, que es un inhibidor de la DNA polimerasa. <sup>(13)</sup> Por último, recientemente se está considerando el posible uso de algunas citocinas en el tratamiento de las displasias, ya que el IFN  $-\alpha$ , el IFN  $-\beta$ , y el IFN  $-\gamma$ , han mostrado ser capaces de suprimir la transcripción de las proteínas E6 y E7 del VPH. <sup>(14)</sup>

Sin embargo, muy a pesar de los esfuerzos, ninguno de los procedimientos antes mencionados ha sido realmente eficiente ni para el tratamiento, ni la prevención del desarrollo de las displasias ni para el control del VPH. Simplemente no existe un método de control efectivo para la infección por VPH y, como consecuencia, las recurrencias de las displasias después de tratamiento oscilan entre el 15 y 25% en nuestro país. Por ello es determinante el encontrar nuevos compuestos cuyos blancos terapéuticos sean más específicos y, por ende, más eficientes en el tratamiento de las displasias del cervix.

#### **4. Vacunas contra el VPH**

Actualmente se están desarrollando dos tipos de vacunas contra el virus del papiloma humano: 1) las vacunas profilácticas cuyo fin es la prevención de la infección y las enfermedades asociadas y 2) las vacunas terapéuticas, donde lo que se busca es inducir la regresión de las displasias o la remisión de un CaCU avanzado. Para lograr una vacuna contra el VPH se utilizan principalmente partículas parecidas a virus (VLP, virus-like particles), las cuales contienen las regiones inmunogénicas correspondientes a las proteínas de la cáspide (L1 y L2) y carecen del DNA viral, éstas se producen en diversas especies para luego ser purificadas y poder utilizarlas para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes. Debido a la alta especificidad antigénica de la cáspide de cada uno de los diferentes VPH's, no ha sido posible obtener anticuerpos que den algún tipo de reacción cruzada con otro VPH, por lo que en la fabricación de este tipo de

vacunas, el inmunógeno que se utilice determinará la protección contra ese VPH. El mayor éxito lo han obtenido las compañías Merck y GlaxoSmithKline, ya que ambas han producido una vacuna del tipo profiláctico con muy buenos resultados<sup>(15)</sup>. En la tabla 3 se comparan las dos vacunas.

Vacuna	Merck(*)	GlaxoSmithKline (*)
Tipo	Monovalente (contra VPH 16)	Bivalente (contra VPH 16 y 18)
Concentración	80 µg/mL VPH 16	40 µg/mL VPH 16 40 µg/mL VPH 18
Dosis y vía de administración	0.5 mL, intramuscular	0.5 mL, intramuscular
Esquema de Inmunización	0, 2 y 6 meses	0, 1 y 6 meses
Eficacia en la prevención de la infección	91%	92%
Eficacia en la prevención de anomalías citológicas	No se analizó.	93%
Eficacia en la prevención de lesiones preinvasoras	100%	100%
Reacciones adversas de seriedad	No	No
Población analizada y edad	768 mujeres de 16-23 años	560 mujeres de 15-25 años

Tabla 3. Comparación entre las dos vacunas más desarrolladas para prevenir la infección por VPH.

El problema con la creación y aplicación de vacunas contra el VPH es que actualmente, solo están dirigidas contra 2 de los tipos de VPH, que si bien es cierto son los mas abundantes (VPH 16 y 18), no se esta tomando en cuenta el resto de los tipos de VPH de alto riesgo (VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), dejando expuesta a la población a la infección por estos agentes.

Por otro lado, también es muy importante considerar a la extensa población que actualmente se encuentra infectada (por cualquier tipo de VPH) y que a la fecha no tiene ningún sistema eficiente de tratamiento, es por ello que la creación de vacunas contra el VPH ayudarán mucho, pero no son la solución para este grave problema.

## 5. Lignina

### a. Generalidades

La lignina proviene del latín "lignum" que significa leño y es, después de la celulosa, el principal componente de la madera. Se encuentra íntimamente

asociada a la celulosa en el tejido leñoso y es probable que esté combinada químicamente con ella, así como con carbohidratos u otros componentes.

La lignina es un polímero compuesto por unidades de fenilpropanoides derivadas de 3 alcoholes cinnámicos principales (monolignoles): el alcohol p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Figura 5).

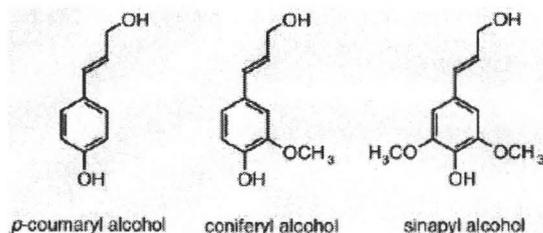


Figura 5. Principales monolignoles encontrados en la lignina de las plantas.

La principal función de la lignina en las plantas es reforzar la pared celular, facilitar el transporte de agua e impedir la degradación de los polisacáridos de esta estructura, actuando así como la principal línea de defensa contra patógenos, insectos y otros herbívoros.<sup>(16)</sup>

En otros estudios se ha visto que los polifenoles como la lignina, poseen una estructura química ideal para la protección contra radicales libres y se ha notado que son antioxidantes más efectivos, inclusive, que los tocoferoles y el ascorbato. Las propiedades antioxidantes de los polifenoles radican en su alta reactividad como donadores de hidrógeno o de electrones y de su habilidad para estabilizar y deslocalizar los electrones desapareados (rompiendo la cadena de reacción de los radicales libres). Por otro lado, también se ha demostrado que los flavonoides son capaces de alterar la cinética de peroxidación por modificación del orden de empaquetamiento lipídico y disminuyendo la fluidez de las membranas.<sup>(17)</sup>

### b. Derivados de lignina.

Existen muchos tipos de ligninas, con propiedades y composiciones variables según el origen de la lignina y el tratamiento al que se la ha sometido. Actualmente, se utiliza solo una pequeña parte de los millones de toneladas de lignina que se extraen cada año de los desperdicios de la madera. Los líquidos residuales de la industria de la pulpa de madera son la fuente principal de la pequeña porción de ligninas que se están usando. De esta fuente se obtienen ligninas, lignato de sodio y sulfonatos de lignina en forma de líquidos pardos o polvos de pureza muy variable.

Desde hace más de 20 años se han estudiado los efectos biológicos de diferentes derivados de lignina y se ha visto que la adición de acetil-lignina o sulfonil-lignina al medio de cultivo inhibe el crecimiento de fibroblastos (obtenidos a partir de embriones de pollo) y de hepatocitos de rata (cultivo primario) de una forma dependiente de dosis, notándose las diferencias en la sensibilidad celular, ya que el efecto inhibitorio sobre los hepatocitos fue mucho menor en comparación con el de los fibroblastos. <sup>(18)</sup> En otros estudios se encontró que el lignosulfonato, inhibe completamente el efecto citopático inducido por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como también la expresión antígeno específica del virus y, en un sistema libre de células, inhibe también la actividad de transcriptasa reversa. <sup>(19)</sup>

Otra propiedad que se le ha demostrado a los derivados de la lignina es la de reducir los efectos genotóxicos inducidos por diversos agentes carcinogénicos en células de mamífero cultivadas *in vitro*. <sup>(20)</sup>

Dentro de la gran variedad de derivados que se pueden obtener a partir de la lignina, los complejos lignina-carbohidratos (CLC) han sido también ampliamente estudiados con fines terapéuticos; sin embargo, debido a la complejidad molecular de estos derivados ha sido muy difícil poder asignar las actividades biológicas encontradas a estructuras específicas presentes en los CLC. Es por ello que se han realizado tratamientos con distintos compuestos para obtener componentes menos complejos. Por ejemplo, el tratamiento de los CLC con ácido elimina los azúcares, y el tratamiento con  $\text{NaClO}_2$  elimina los polímeros de fenilpropanoides, o bien éstos pueden ser deshidrogenados. <sup>(21)</sup> De esta forma se ha podido demostrar que la combinación de azúcar con los polímeros de fenilpropanoides no reducidos son los responsables de la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antitumoral que se les ha demostrado a algunos de los derivados de lignina, y se han propuesto dos principales mecanismos de acción para esta mezcla particular: 1) a través de la acumulación de macrófagos que inducen la producción de oxígeno activo, el cual es altamente tóxico para las células tumorales y para las bacterias <sup>(22)</sup> y 2) a través de la producción endógena de citocinas, como el  $\text{TNF-}\alpha$ , el cual se ha visto que, en presencia de CLC, disminuye durante el envejecimiento de ratones y se incrementa con la implementación de tumores. <sup>(23)</sup> Además, se ha observado que los CLC tienen una actividad citotóxica mayor contra líneas celulares tumorales, que contra fibroblastos, sugiriendo cierta citotoxicidad tumor-específica. <sup>(24)</sup>

También se ha encontrado que este tipo de derivados tienen actividad antimutagénica y se propone que ésta sea debida a la inhibición del citocromo p450 <sup>(25)</sup>, ya que como es sabido esta enzima es responsable de la bioactivación de promutágenos. Actualmente no se han identificado ni los factores transcripcionales, ni los citocromos p450 de la familia CYP cuya expresión es modificada por la lignina, por lo que no sabemos si la disminución de la actividad enzimática es selectiva o completamente al azar.

La actividad antiviral de los CLC también se ha descrito, y se ha propuesto que el efecto anti-VIH pudiera deberse a la inhibición de la adsorción del virus sobre la superficie celular <sup>(26)</sup> ó a la inhibición de la transcriptasa reversa. <sup>(27)</sup> También se ha propuesto que la actividad anti-influenza en los CLC *in vitro*, se deba a la inhibición de la RNA polimerasa del virus <sup>(28)</sup> ó a la inactivación del virus por su unión directa con los derivados de lignina. <sup>(29)</sup> En este caso se demostró que la parte polifenólica es la responsable de la actividad y no la porción de los carbohidratos. <sup>(30)</sup> En otros estudios se demostró que los CLC inhiben también rotavirus y enterovirus debido a la interferencia con la adsorción viral, más que con la inhibición de su replicación después de adsorbidos. <sup>(31)</sup>

Todos los estudios antes mencionados muestran claramente que los derivados de lignina actúan diferente dependiendo de su composición y que la sensibilidad de las diversas líneas celulares a la presencia de estos compuestos también es diferente, dejando abierto todo un campo de estudio para los derivados de la lignina.

## **6. L3: un agente de quimioprevención efectiva en displasias**

### **Características del Extracto L3**

El extracto L3 es un desarrollo de la empresa Oculus Innovative Sciences. (Petaluma, California, E.U.A.) y se encuentra en proceso de patente. Es por esto, que la información acerca de la especie vegetal de la cual se obtuvo, así como su composición, no es de nuestro conocimiento y la información que se puede difundir al respecto es muy limitada.

La única información disponible del extracto vegetal L3 es que es un derivado de la lignina, que al final de la extracción y procesamiento del mismo es liofilizado. Éste se disuelve en solución salina isotónica de tal forma que se obtiene una solución al 25% (p/v), después es esterilizado y envasado en viales color ámbar de 1.5 mL.

Es un compuesto altamente polar, con un pH ácido, no contiene restos proteicos y presenta un punto de fusión superior a los 180 °C . Tiene una gran afinidad por proteínas y iones, sugiriendo una alta reactividad. En estudios de permeabilidad con membranas porcinas en celdas de Frank mostraron una absorción de solo 6%.

Estudios previos demostraron que este extracto vegetal, a bajas dosis, detiene el desarrollo de embriones murinos en un estadio de 4 a 8 células (mórula) sin inducir su muerte; sin embargo, si se incrementa la dosis y el tiempo de exposición a este compuesto, sí se induce la muerte de los embriones. <sup>(32)</sup>

## JUSTIFICACIÓN

Debido a las características fisicoquímicas del extracto vegetal L3, éste solo pueden ser aplicado a nivel tópico, esta condición aunada a la incidencia tan alta de cáncer cervicouterino en nuestro país, crean la necesidad de determinar si el extracto vegetal L3 presenta algún efecto biológico favorable *“in vitro”* en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino, con la finalidad de utilizar, en un futuro no muy lejano, dicho extracto vegetal en el tratamiento de displasias cervicales, ya que desafortunadamente, todavía no existe un tratamiento no invasivo eficaz para este problema.

Actualmente, existe la necesidad de tener en el mercado más compuestos con actividad biológica que pudieran erradicar el problema del cáncer cervicouterino, o por lo menos, que sirvieran como terapia adyuvante, para lograr la inhibición del desarrollo maligno, desde las etapas iniciales o displasias, hasta el cáncer invasor, logrando así disminuir considerablemente la incidencia de este tipo de cáncer.

## **HIPÓTESIS**

Si el extracto vegetal L3 presenta un efecto antineoplásico "*in vitro*" en diversas líneas celulares de cáncer de cérvix, entonces es posible caracterizar su efecto biológico para utilizarlo en el tratamiento de displasias cervicales.

## OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el efecto antineoplásico del extracto vegetal L3 en un modelo de cáncer cervicouterino "*in vitro*".

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto citotóxico del extracto vegetal L3 en 5 líneas celulares diferentes (células HeLa, SiHa, Ca Ski, C33A y células fibroblásticas obtenidas de prepucio humano), a través de su capacidad mitocondrial para convertir sales de tetrazolio en formazan.
- Evaluar el efecto del extracto vegetal L3 en el ciclo celular de células HeLa y de células fibroblásticas obtenidas de prepucio humano, utilizando la incorporación del yoduro de propidio al DNA y citometría de flujo
- Determinar si el efecto en el ciclo celular de células HeLa está asociado con ciclinas a través de inmunohistoquímica y microscopía confocal.
- Determinar si la muerte celular, en caso de presentarse, se lleva a cabo a través de un proceso apoptótico, evaluando los marcadores clásicos como son el intercambio de fosfolípidos de la membrana plasmática y la fragmentación del DNA, ó si está asociado a un proceso necrótico evaluando la permeabilidad de la membrana plasmática a través de la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo.
- Determinar si en células HeLa tratadas con L3 existen cambios ultraestructurales, mismos que pudieran ser relacionados con el tipo de muerte celular que se encuentre, utilizando microscopía electrónica.
- Determinar si el tratamiento de células HeLa con L3 induce cambios en la expresión genética, a través del análisis de un microarreglo de DNA.
- Evaluar el potencial del extracto vegetal L3 como terapia adyuvante a través de la radiosensibilización de células HeLa.

## MATERIAL

### 1. Líneas Celulares

**Células HeLa.** Línea celular humana proveniente de un adenocarcinoma. Poseen un cromosoma telocéntrico pequeño en el 98% de las células. Presentan 100% de aneuploidia. Se tienen reportados 4 cromosomas como marcadores típicos (M1-M4). Una copia del M1, una copia del M2, de 4-5 copias del M3, y dos copias del M4. M1 es un brazo largo y un centrómero cambiados del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 3. El M2 es una combinación del brazo corto del cromosoma 3 y del brazo largo del cromosoma 5. M3 es un isocromosoma del brazo corto del cromosoma 5. M4 consiste en el brazo largo del cromosoma 11 y un brazo del cromosoma 19. HeLa contiene secuencias del virus de papiloma humano 18 (VPH-18). La expresión de p53 es baja, y se han reportado niveles normales de pRb.<sup>(33)</sup>

**Células SiHa.** Línea celular humana proveniente de un carcinoma de células escamosas. Se ha reportado que un 24% de estas células son hipertriploides, con un número de cromosomas entre los 69 y los 72. También contiene entre un 7.6% de células poliploides. Se ha reportado que esta línea contiene integrado de 1 a 2 copias por célula del virus de papiloma humano 16 (VPH-16). Los niveles de p53 y pRb están reportados como normales.<sup>(33)</sup>

**Células Ca Ski.** Línea celular humana proveniente de un carcinoma epidermoide de cervix derivado de una metástasis de intestino delgado. Las células contienen secuencias integradas del virus del papiloma humano 16 (VPH-16) y 18 (VPH-18). Se han reportado alrededor de 600 copias de VPH-16 por cada célula.<sup>(33)</sup>

**Células C33-A.** Línea celular humana proveniente de un carcinoma de cervix, se reportó inicialmente que exhibía un cariotipo hipodiploide y en ocasiones pseudodiploide, con una morfología epitelial. Las células son negativas para VPH. Se ha descrito que la proteína pRb está presente pero de tamaño anormal y que la expresión de p53 se encuentra elevada.<sup>(33)</sup>

**Fibroblastos Humanos.** Línea celular obtenida a partir de un cultivo primario de fibroblastos provenientes de prepucio humano. Las células utilizadas fueron 100% diploides.

### 2. Medios de cultivo.

Para el cultivo de las células HeLa, SiHa y C33A se utilizó medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, penicilina G (100 U/mL) / estreptomycin (100 µg/mL), aminoácidos no esenciales (1X), L-glutamina (2 mM) y Earle's BSS ajustado para contener 1.5 g/L de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>.

Para el cultivo de células CaSki se utilizó medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, penicilina G (100 U/mL) / estreptomicina (100 µg/mL), aminoácidos no esenciales (1X), L-glutamina (2 mM) y piruvato de sodio (1 mM), ajustado para contener bicarbonato de sodio a 1.5 g/L, glucosa a 4.5 g/L y HEPES a 10 mM.

Para obtener la línea de fibroblastos humanos se estableció un cultivo primario de prepucio humano, el cual fue extraído, desinfectado y mantenido DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina G (100 U/mL) / estreptomicina (100 µg/mL) / amfotericina (0.25 µg/mL), aminoácidos no esenciales (1X), piruvato de sodio (1 mM) y Earle's BSS ajustado para contener 1.5 g/L de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>. Posteriormente, el tejido fue disgregado con navaja de bisturí en condiciones estériles e incubado durante 2 h con colagenasa al 0.3%. Por último, se filtró por malla y se cultivó en caja T75 a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%.

## METODOLOGÍA

### 1. Citotoxicidad

*Cultivo de Células:* Se cultivaron las líneas celulares HeLa, SiHa, CaSki, C33A y fibroblastos humanos (5x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 3x10<sup>3</sup>, 6x10<sup>3</sup> y 5x10<sup>3</sup> células / pozo, respectivamente), cada una en placa de 96 pozos por sextoduplicados con la siguiente distribución:

- Control Negativo.
- Control Positivo.
- Control del vehículo.
- L3 al 1.25%.
- L3 al 6.25%.
- L3 al 12.5%.
- L3 al 18.75%.
- L3 al 25%.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Cada una de las placas con los cultivos de células se lavaron con 50 µL de PBS. Posteriormente, las placas se expusieron con 30 µL de las diluciones de L3 antes descritas durante 5 min. Como control negativo se utilizó medio de cultivo, como control positivo células tratadas con etopósido 25 µM y como control del vehículo solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiró el excedente de cada una de las soluciones, excepto etopósido, y se adicionaron 200 µL del medio de cultivo correspondiente, incubándose durante 72 h bajo condiciones de cultivo. Se corrieron triplicados para cada uno de los blancos de reactivo.

*Evaluación de la citotoxicidad:* Al término de la incubación de 72 h se adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivo MTS-1 / PMS, provistas en el "kit" Cell Titer 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), a cada pozo y se incubaron durante 4 h bajo condiciones de cultivo. Finalizado el tiempo de incubación se determinó la absorbencia de las placas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Este método colorimétrico evalúa el metabolismo celular a través de la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales para reducir la sal de tetrazolio MTS en formazan, el cual absorbe a 490 nm de longitud de onda.

## 2. Ciclo celular

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células HeLa y  $5 \times 10^5$  fibroblastos humanos en cajas T25 por triplicados para cada una de las siguientes variables:

- Control Negativo.
- Control Positivo.
- Control del vehículo.
- L3 al 1.25%.
- L3 al 6.25%.
- L3 al 12.5%.
- L3 al 18.75%.
- L3 al 25%.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y 100% de humedad relativa).

*Exposición de L3:* Las cajas con el cultivo de células se lavaron con 1 mL de PBS. Posteriormente, las cajas se incubaron con 3 mL de las diluciones de L3 antes descritas durante 5 min. Como control negativo se utilizó medio de cultivo, como control positivo células tratadas con etopósido 25  $\mu\text{M}$  y como control del vehículo solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiró el excedente de cada una de las soluciones, excepto etopósido, y se adicionaron 4 mL de medio de cultivo, incubándose durante 72 h bajo condiciones de cultivo.

*Evaluación del ciclo celular.* Al término de la incubación se recolectaron los sobrenadantes de cada una de las cajas de cultivo por separado y se cosecharon las células que quedaron adheridas a las cajas con 1 mL de tripsina al 0.25%. Se juntó cada sobrenadante con su respectivo botón celular y se lavaron las células con 1 mL de PBS y después con 1 mL de la solución amortiguadora del "kit" Cycle Test™ Plus DNA Reagent (Becton Dickinson). Posteriormente, se decantó la solución amortiguadora y se les adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de solución "A" (tripsina) con incubación de 10 min a temperatura ambiente (TA); después, se les adicionó 200  $\mu\text{L}$  de solución "B" (inhibidor de tripsina y RNAasa), también durante 10 min a TA. Por último, se les adicionó 200  $\mu\text{L}$  de la solución "C" (Ioduro de Propidio) con una

incubación de 10 min en frío (4–8 °C) para con ello lograr evaluar las fases del ciclo celular de los núcleos teñidos por citometría de flujo.

### 3. Inmunohistoquímica de Ciclina B1

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $3 \times 10^4$  células HeLa en laminillas de vidrio para cultivo celular con las siguientes variables:

- Control del vehículo.
- L3 al 12.5%.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Las laminillas con el cultivo de células se lavaron con 200 µL de PBS. Posteriormente, se expusieron con 500 µL de las diluciones antes descritas durante 5 min. Como control del vehículo se utilizó solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiró el excedente de cada una de las soluciones y se adicionó 1 mL de medio de cultivo, incubándose durante 72 h bajo condiciones de cultivo.

*Inmunohistoquímica contra Ciclina B1:* AL término de la incubación las células se lavaron 2 veces con PBS, se fijaron con acetona fría, después se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.12 M a pH 7.2 con 0.1 % de Triton 100. Se incubaron con suero bovino por 1 h (dilución 1:150) antes de adicionar el anticuerpo primario  $\alpha$ -CycB1 (SantaCruz) diluido 1:200, el cual se incubó durante 2 h. Se lavaron 2 veces y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (1:200) durante 1.5 h. Al término de la incubación se lavaron con la solución de lavado pero sin triton y se incubaron con yoduro de propidio durante 1 min. Por último, se lavaron con agua, se montaron con medio vectashiel como vector, se sellaron con barniz y se observaron al microscopio confocal. Todas las fotografías fueron tomadas con el mismo aumento (40 X).

### 4. Determinación del tipo de muerte celular.

#### a. Anexina V-FITC / IP

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células HeLa en cajas T25 por sextoduplicados como se indica a continuación:

- Control del vehículo.
- Control Positivo.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5%.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Cada una de las cajas con los cultivos de células se lavaron con 3 mL de PBS. Posteriormente, se expusieron con 1 mL de L3 al 12.5% durante 5 min. Como control positivo se utilizó etopósido 25 µM y como control del vehículo solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiró cada una de las soluciones, excepto el etopósido, y se adicionaron 4 mL de medio de cultivo incubándose durante 72 h bajo condiciones de cultivo.

*Marcaje con Anexina y Yoduro de Propidio (IP):* Transcurrido el tiempo de incubación de 72 h, las células se lavaron con 2 mL PBS, y se desprendieron con tripsina al 0.25%. Se lavaron con 1 mL de PBS y se resuspendieron en 100 µL de solución amortiguadora de unión del "kit" Annexin V-FITC Apoptosis Detection (BD Biosciences). Se marcaron con 5 µL de Anexina V y 5 µL de IP, se agitaron en vortex y se dejaron incubando 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Por último se les adicionó 400 µL de solución amortiguadora de unión y se leyeron por citometría de flujo.

## **b. Fragmentación del DNA**

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células HeLa en cajas T25 por duplicado como se indica a continuación:

- Control Negativo.
- Control Positivo.
- Control del vehículo.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 0.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 24 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 48 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 72 h.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Cada una de las cajas con los cultivos de células se lavaron con 3 mL de PBS. Posteriormente, se expusieron a 1 mL de L3 al 12.5% durante 5 min. Como control negativo se utilizó medio de cultivo, como control positivo etopósido 25 µM y como control del vehículo solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiró cada una de las soluciones, excepto el etopósido, y se adicionaron 4 mL de medio de cultivo incubándose durante el tiempo indicado para cada muestra bajo condiciones de cultivo.

*Extracción del DNA:* Terminado el tiempo de incubación a evaluar se retiró el sobrenadante de las cajas, las células se lavaron con 1 mL de PBS y se rasparon

con gendarme, la suspensión celular fue centrifugada a  $500 \times g$  durante 3 min y resuspendida en 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de unión del "kit" Apoptotic DNA Ladder (Roche) y se mezcló inmediatamente, se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente, para luego adicionarle 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol y agitar en vortex. Todo el volumen fue transferido a la columna de afinidad para su unión a la membrana por centrifugación. La membrana se lavó dos veces con la solución amortiguadora correspondiente y la elución del DNA se realizó con agua estéril y libre de RNAsas previamente calentada a  $70^\circ\text{C}$ .

*Electroforesis de DNA:* Se realizó un gel de agarosa al 1%. Se cargaron 12  $\mu\text{L}$  de cada muestra con 0.1  $\mu\text{g}$  de RNAsa A. La electroforesis se corrió a 100 V durante 1 h. A parte del control positivo utilizado en el experimento (etopósido 25  $\mu\text{M}$ ), se corrió también el control positivo del "kit" (lío-filizado de células apoptóticas U937).

### **c. Liberación de LDH.**

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células HeLa en cajas T25 como se indica a continuación:

- Control Negativo.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 0.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 24 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 48 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 72 h.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Cada una de las cajas con los cultivos de células se lavaron con 3 mL de PBS. Posteriormente, se expusieron a 1 mL de L3 al 12.5% durante 5 min. Como control negativo se utilizó medio de cultivo. Por último, se retiró cada una de las soluciones y se adicionaron 4 mL de medio de cultivo incubándose durante el tiempo indicado para cada muestra bajo condiciones de cultivo.

*Determinación de la actividad de LDH:* Al término de cada uno de los tiempos a evaluar se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras, por duplicado, y se les adicionó 50  $\mu\text{L}$  del sustrato para la enzima LDH, provisto en el "kit" Lactate Dehydrogenase Assay (DCL), previamente calentado a  $37^\circ\text{C}$ . Las placas se incubaron en el espectrofotómetro durante 3 min a  $37^\circ\text{C}$  y manteniendo dicha temperatura constante se tomaron las absorbencias de las muestras a 340nm de longitud de onda cada minuto durante 30 min. La actividad enzimática obtenida para cada muestra es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra, por lo que los valores obtenidos fueron graficados como actividad enzimática.

## 5. Microscopía Electrónica

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células HeLa en cajas T25 como se indica a continuación:

- Control Negativo.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 0.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 24 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 48 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 72 h.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5% Tiempo 96 h.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Cada una de las cajas con los cultivos de células se lavaron con 3 mL de PBS. Posteriormente, se expusieron con 1 mL de L3 al 12.5% durante 5 min. Como control negativo se utilizó medio de cultivo. Por último, se retiró cada una de las soluciones y se adicionaron 4 mL de medio de cultivo incubándose durante el tiempo indicado para cada muestra bajo condiciones de cultivo.

*Fijación de las células:* Al término de cada tiempo las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 5 – 10 min y se rasparon con gendarme. La suspensión de células se guardó a 4 °C hasta obtener el último tiempo; y 24 h después, todas las muestras fueron teñidas con tetraóxido de osmio, seguido de una deshidratación con alcohol, después fueron incluidas en resina epóxica para luego ser cortadas finamente y contrastadas con uranilo / plomo para poder ser analizadas en el microscopio electrónico y obtener las micrografías deseadas.

## 6. Microarreglos de DNA

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células HeLa en cajas T25 como se indica a continuación:

- Control del vehículo.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5%.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Las cajas con los cultivos de células se lavaron con 3 mL de PBS. Posteriormente se expusieron con 1 mL de L3 al 12.5% durante 5 min. Como control del vehículo se utilizó solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiraron ambas soluciones y se adicionaron 4 mL de medio de cultivo incubándose durante 6 h bajo condiciones de cultivo.

*Determinación de la expresión génica:* Después de 6 h de incubación se extrajo el RNA de cada una de las muestras utilizando columnas de afinidad de la marca QIAGEN. El RNA obtenido se cuantificó y se observó su estado en un gel desnaturalizante de agarosa, después se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su conversión en cDNA, para lo cual se utilizó dUTP-Cy3, para el control, y dUTP-Cy5, para la muestra de L3. Una vez obtenidos los cDNA's, éstos se mezclaron en cantidades iguales y se hibridaron con los 10000 genes del chip de humano creado y provisto por el Dr. Jorge Ramírez de la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los genes presentes en el chip son representados por fragmentos génicos de 70 bases  $^{\circ}/_{10}$ , impresos por duplicado en una superficie de vidrio. Después del escaneo del microarreglo cada punto se revisó visualmente para que los datos obtenidos por el programa Array Pro-Analyzer 4.0 fueran confiables. El análisis de los datos se realizó de acuerdo a un límite de 1.5 veces de cambio y los genes resultantes se agruparon por función biológica de acuerdo a la base de datos Kegg.<sup>(34)</sup>

## 7. Radiosensibilización de células HeLa

*Cultivo de Células:* Se cultivaron  $1.0 \times 10^4$  células HeLa en una placa de 24 pozos por triplicados como se indica a continuación:

- Control del vehículo.
- Cultivo de células HeLa con L3 al 12.5%.

Se incubaron durante 24 h y bajo condiciones de cultivo ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad relativa del 100%).

*Exposición de L3:* Los pozos con los cultivos de células se lavaron con 1 mL de PBS. Posteriormente, se expusieron con 500  $\mu\text{L}$  de L3 al 12.5% durante 5 min. Como control del vehículo se utilizó solución salina isotónica (SSI). Por último, se retiraron ambas soluciones y se adicionaron 1 mL de medio de cultivo a cada pozo, incubándose durante 48 h bajo condiciones de cultivo.

*Radiación:* AL término de la incubación se retiraron 800  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y se aplicó un pulso de luz UV de  $80\text{ J}/\text{cm}^2$  durante 2 min. Se adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo fresco y se incubaron las células en condiciones de cultivo. Después de 7 y 18 h de cultivo se tomaron fotografías de las células en el microscopio óptico de luz.

## 8. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas ANOVA y para la comparación entre grupos se utilizaron pruebas de Tukey, ambas con el programa estadístico StatistixL 1.5

## RESULTADOS

### 1. Citotoxicidad

Para determinar la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de cada una de las 4 líneas celulares provenientes de cáncer de cervix se obtuvo el porcentaje de inhibición de la proliferación con respecto al control (SSI) y se graficó contra la concentración de L3 utilizada (Figura 6). La ecuación correspondiente a la regresión lineal de cada curva permitió obtener los valores de  $IC_{50}$  para cada línea celular (Tabla 4).

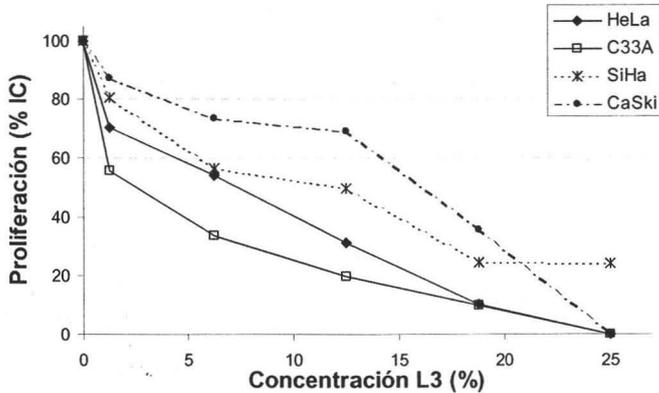


Figura 6. Efecto citotóxico del extracto vegetal L3 en 4 líneas de cáncer cervicouterino, donde se observa después de 5 min de exposición, un efecto dependiente de dosis. El valor obtenido para las células tratadas con SSI se utilizó como 100% de proliferación.

Se evaluó del efecto citotóxico del L3 en 4 líneas de cáncer cervicouterino con diferentes tipos de HPV, con la finalidad de determinar si se encontraban diferencias en la resistencia de las líneas, dependiendo del tipo de HPV presente en su genoma.

	$IC_{50}$ (%)	HPV
HeLa	7.2	18
SiHa	11.5	16
Ca Ski	13.6	16, 18
C33-A	1.0	----

Tabla 4. Concentración de L3 necesaria para inhibir la proliferación del 50% de la población de diversas líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino y su asociación con el tipo de HPV que presentan.

Los resultados obtenidos muestran una sensibilidad diferente dependiendo de la línea celular utilizada, siendo la línea C33A la más sensible ( $IC_{50}=1.0\%$ ), y la línea celular más resistente es CaSki, ya que presenta la  $IC_{50}$  más alta ( $IC_{50}=13.6\%$ ). La línea celular SiHa fue la única que con la concentración más alta de L3 (25%) no se obtuvo el 100% de daño celular. La línea celular HeLa muestra una sensibilidad intermedia y un 100% de daño con la concentración más alta.

La figura 7 muestra los resultados obtenidos para los fibroblastos humanos, donde se puede observar que también son sensibles al tratamiento con el extracto vegetal L3, obteniéndose una  $IC_{50}=9.33$ , valor parecido a las 3 líneas de cáncer de cérvix más resistentes.

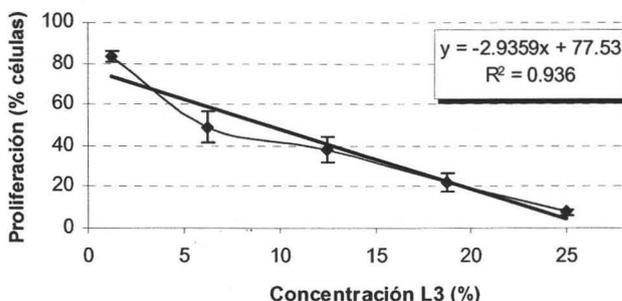


Figura 7. Efecto citotóxico del extracto vegetal L3 en fibroblastos humanos.

Debido a la variación entre las líneas celulares se escogió la línea celular HeLa para caracterizar el efecto del extracto vegetal L3, ya que fue la línea que mostró una sensibilidad intermedia entre los tipos celulares evaluados, incluyendo a los fibroblastos humanos como un control de células no tumorales.

## 2. Ciclo Celular

Las diferencias morfológicas observadas por microscopía de luz eran indicativas de un incremento en la relación núcleo/citoplasma, sugiriendo un arresto en la fase G2/M (Figura 8), por lo que se determinó la fase del ciclo celular en que se encontraban las células HeLa tratadas con diversas concentraciones de L3.

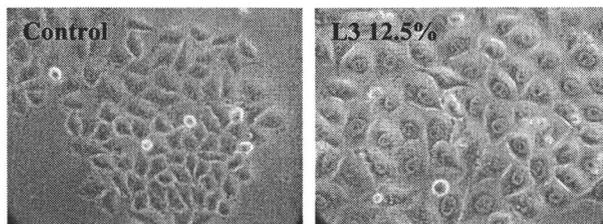


Figura 8. Células HeLa tratadas con SSI(control) y con L3 al 12.5%. Micrografías tomadas 72 h postratamiento con el mismo aumento (32X)

### a. Ciclo celular de HeLa

Los resultados del ciclo celular son indicativos de que el extracto vegetal L3 afecta la fase G0/G1 y G2/M (Figura 9A-H) de las células HeLa a las 72 h después de haber sido expuestas durante 5 min. El arresto del ciclo celular es dependiente de dosis hasta la concentración de 12.5% de L3 (Figura 9A-E), ya que por arriba de esta concentración no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el resto de las diluciones probadas (Figura 10).

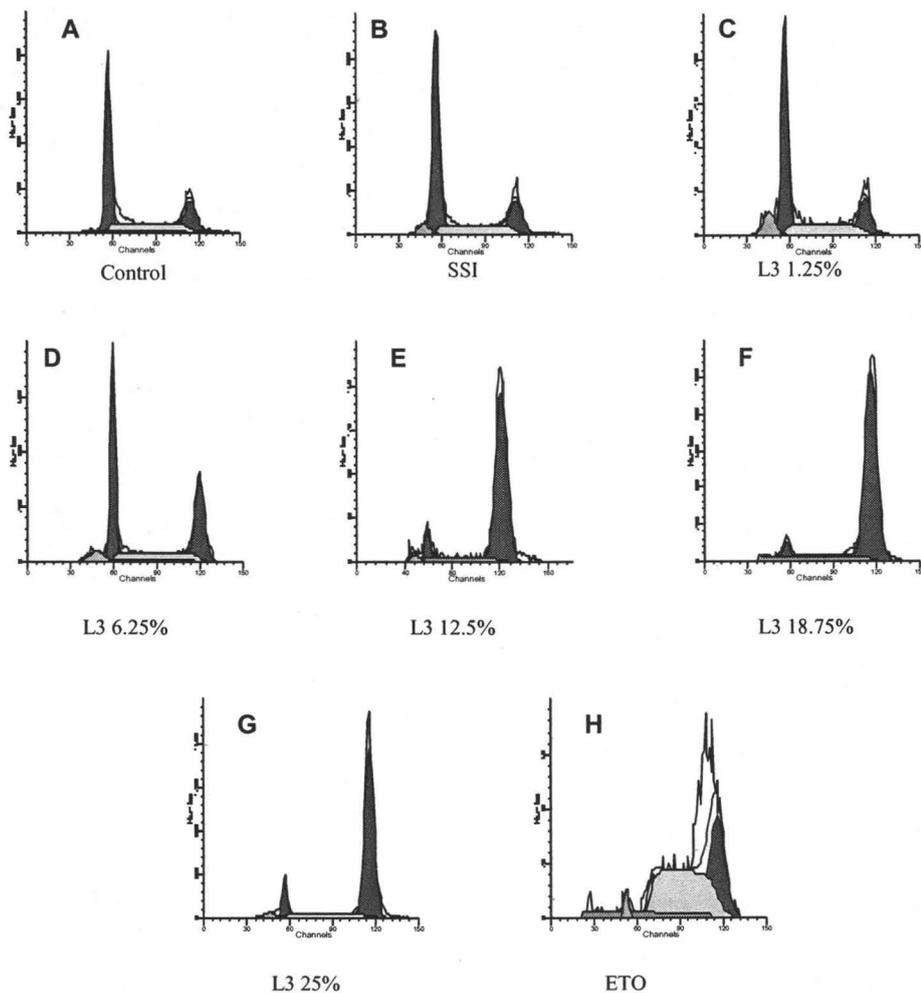


Figura 9. Histogramas obtenidos por citometría de flujo de células HeLa tratadas con diversas concentraciones de L3 y con 25  $\mu$ M de Etopósido .

Los histogramas de la figura 5 muestran como la población de células HeLa se mueve hacia la región correspondiente a la fase G2/M del ciclo celular, estos cambios son pequeños pero estadísticamente significativos a la concentración de 6.25% de L3 (Figura 9D) y claramente significativos e partir de 12.5% de L3 (Figura 9E-H).

La figura 10 agrupa las tres fases del ciclo celular permitiendo observar claramente el arresto en la fase G2/M de células HeLa tratadas durante 5 min con diferentes concentraciones de L3. Se observa que el movimiento de la población es desde la fase G0/G1 hasta la fase G2/M, manteniéndose prácticamente constante la fase S, con excepción de la concentración 12.5% de L3 que si mostró una disminución en el porcentaje de células en fase S, diferencia que fue estadísticamente significativa.

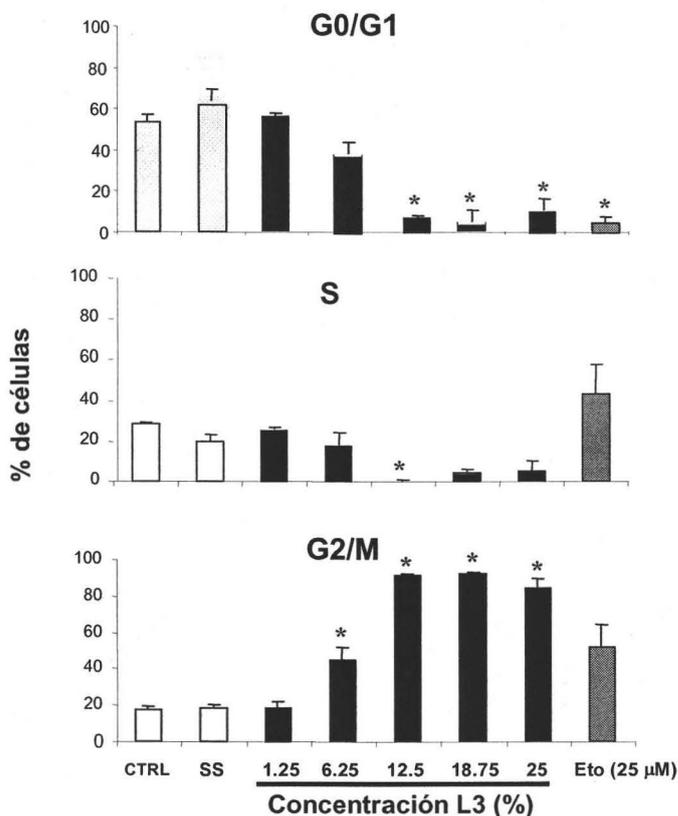


Figura 10. Porcentaje de células HeLa en cada una de las fases del ciclo celular. Evaluación 72h postexposición de 5 min con L3. CTRL.=Control Negativo. SS=Solución Salina Eto=Etopósido. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la SS n=3 ±SD p = 0.05

El análisis de los resultados mostró que la solución salina, utilizada como vehículo para las diluciones de L3, no afectó el avance del ciclo celular de las células, ya que la distribución de la población en el ciclo celular no presentó diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, por ello se toman estos valores como control negativo del experimento y se observa que en las células HeLa tratadas con L3 al 12.5% se presenta una disminución de la fase G0/G1 que va del 61.98% al 8.75% respecto a la población de la SSI, mientras que en la fase G2/M del ciclo celular se observó un incremento del 72.65%, (Tabla 5). A su vez, la población que se encontraba en la fase S (19.78%), también disminuyó considerablemente (0.36%) y pasó a la fase G2/M.

Las células tratadas con etopósido, un conocido inhibidor de topoisomerasas, presentaron una distribución del ciclo celular diferente a las tratadas por L3, ya que más del 90% de su población se encontró repartida en la fase S y en la fase G2/M del ciclo celular.

Es importante comparar que la IC<sub>50</sub> obtenida en el ensayo de citotoxicidad para HeLa (7.2%) corresponde con una concentración suficiente para obtener un arresto de entre el 45 y el 90% de la población celular, aproximadamente, por lo que es posible suponer que el extracto vegetal L3 tiene un efecto citotóxico dependiente de dosis relacionado con el arresto de las células en la fase G2/M del ciclo celular.

	G0/G1	S	G2/M
Control	54.08	28.75	17.18
SSI	61.98	19.78	18.24
L3 1.25%	55.22	26.07	18.71
L3 6.25%	38.01	17.68	44.31
L3 12.5%	8.75	0.36	90.89
L3 18.75%	4.18	3.97	91.85
L3 25%	10.39	5.19	84.42
Eto	4.99	43.05	51.96

Tabla 5. Valores promedio del porcentaje de células HeLa que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular después de haber sido tratadas con L3.



comparación con el arresto del ciclo de células HeLa es el número de células afectadas, ya que como podemos ver en la Tabla 6, la población celular se desplaza únicamente un 10%, aproximadamente, de la fase G0/G1 a la G2/M, notando que la fase S permanece casi constante, ya que en ningún caso se observó diferencia estadísticamente significativa, en todos los casos se utilizó como control negativo y punto de comparación estadística el efecto obtenido por el vehículo (SSI), ya que éste no muestra alteración alguna del ciclo celular de fibroblastos humanos.

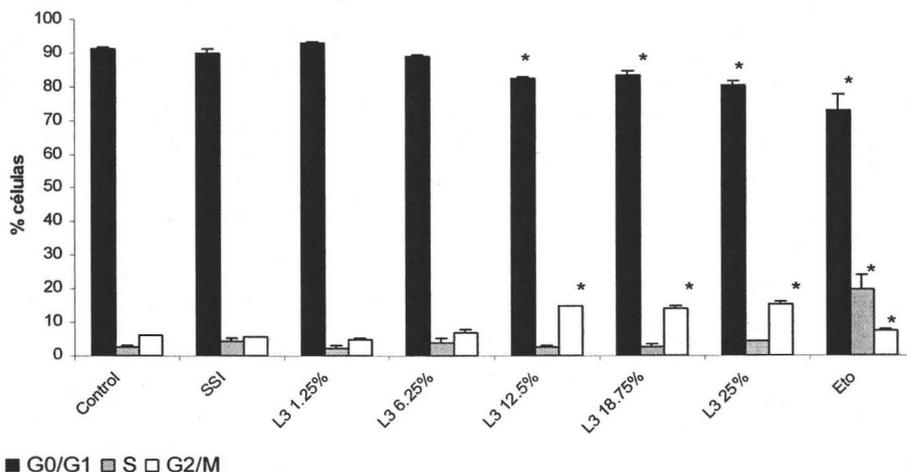


Figura 12. Ciclo celular de fibroblastos humanos p5 tratados 5min con L3, evaluación 72 h postexposición. \* Diferencia significativa con respecto a su propio control de SSI. n=3 ± SD p = 0.05

	G0/G1	S	G2/M
Control	91.30	2.67	6.03
SSI	90.14	4.16	5.70
L3 1.25%	92.99	2.38	4.64
L3 6.25%	88.99	4.02	6.99
L3 12.5%	82.65	2.55	14.80
L3 18.75%	83.44	2.79	13.77
L3 25%	80.44	4.21	15.35
Eto	72.82	19.69	7.49

Tabla 6. Valores promedio del porcentaje de fibroblastos humanos que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular después de haber sido tratados con L3.

Debido a los efectos encontrados en la citotoxicidad y el ciclo celular se decidió utilizar la dosis de 12.5% de L3 para el resto de los ensayos, ya que a esta concentración se obtiene un 50% de efecto citotóxico, aproximadamente, y un 90% de arresto celular en la fase G2/M de células HeLa.

### 3. Inmunohistoquímica Ciclina B1

En condiciones normales la ciclina B1 se une con cdc2 para formar el complejo conocido como MPF (M phase-promoting factor) debido a la habilidad que tiene para inducir el paso a la mitosis celular a través de la activación por fosforilación de substratos que regulan la condensación de la cromatina, los cambios de la membrana nuclear, y la reorganización de microtúbulos mitóticos. <sup>(21)</sup> Es por ello que para determinar si el arresto en la fase G2/M del ciclo celular de células HeLa está relacionado con esta ciclina se realizó una inmunohistoquímica contra esta proteína y se visualizó por microscopía confocal.

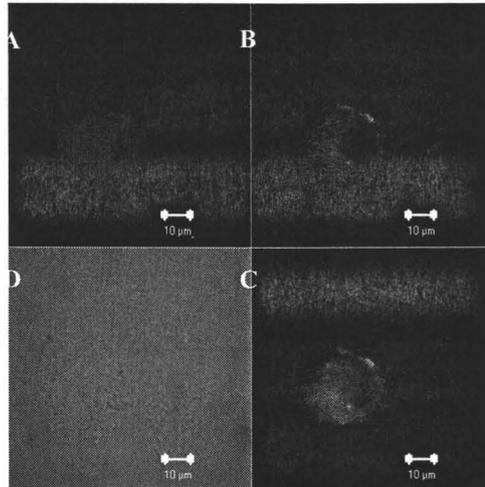


Figura 13. Inmunohistoquímica  $\alpha$ -Cyc B1 de células HeLa tratadas con L3 al 12.5% durante 5 min. A) loduro de propidio. B) Ciclina B1. C) Traslape de ambas imágenes. D) Imagen sin fluorescencia. Aumento 40X.

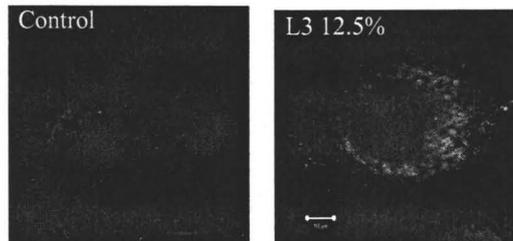


Figura 14 Diferencia en el tamaño de los núcleos y en la acumulación de ciclina B1 en células HeLa control y células tratadas con L3 al 12.5% durante 5 min. Aumento 40X

Las figuras 13 y 14 muestran la acumulación de ciclina B1 alrededor de los núcleos de células HeLa tratadas con L3, por lo que se puede suponer que el arresto del ciclo celular en la fase G2/M pudiera estar asociado con esta acumulación de ciclina B1.

## 4. Apoptosis

### 1) Anexina V-FITC

La anexina es una proteína con una alta afinidad por la fosfatidilserina, la cual es un fosfolípido que se encuentra principalmente en la cara interna de la membrana, por lo que en las etapas iniciales de la apoptosis, cuando se presenta el flip-flop de las membranas este fosfolípido es expuesto por la célula y es por ello que el marcaje con anexina permitió identificar el porcentaje de células apoptóticas.

Debido a que la anexina se encuentra acoplada a la fluoresceína (FITC) es sencillo detectarla por citometría de flujo, y si además se utiliza la tinción paralela con yoduro de propidio, entonces es posible diferenciar las células apoptóticas de las necróticas. Los resultados obtenidos por la citometría de flujo se interpretan por cuadrantes, siendo el cuadrante superior izquierdo el correspondiente a las células necróticas, que son aquellas que dan marca positiva con IP, el inferior derecho a las células apoptóticas que dan marca positiva con anexina, el inferior izquierdo a las células vivas (negativas para ambas marcas) y el superior derecho a las células dobles positivas.

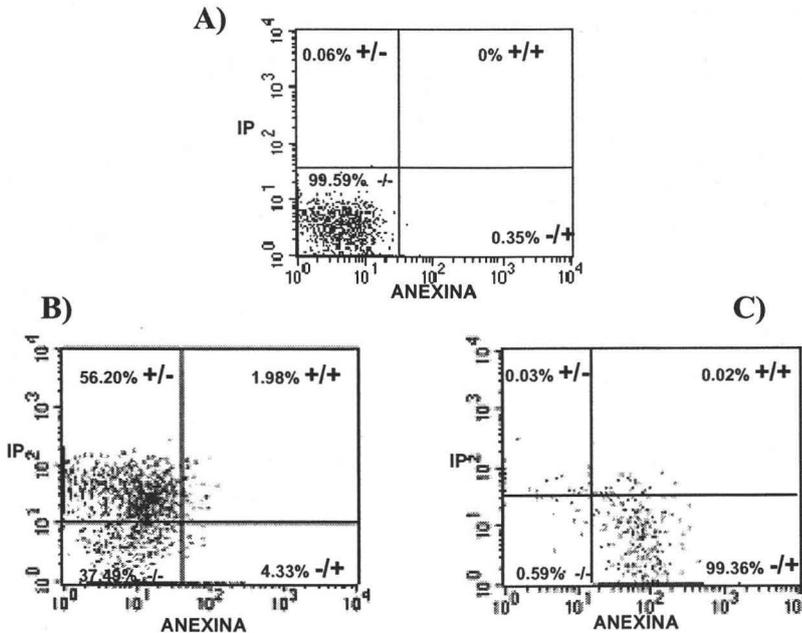


Figura 15. Análisis por citometría de flujo de células HeLa marcadas con anexina V-FITC / IP, A) Control negativo (SSI), B) células tratadas 5 min con L3 12.5% y C) células tratadas con etopósido 25 μM.

Como se observa en la figura 15 el tratamiento con 12.5% de L3 no provoca que la célula exponga la fosfatidilserina, por lo que la marca con anexina es negativa, este resultado sugiere una muerte independiente de apoptosis; a diferencia de lo encontrado en las células tratadas con etopósido, ya que como es sabido, induce la muerte celular por apoptosis al estabilizar el complejo DNA-topoisomerasa y retrasar a la horquilla de replicación.<sup>(50)</sup>

El promedio de los valores encontrados se encuentra representado en la figura 16, donde es evidente la diferencia entre el número de células apoptóticas y necróticas en ambos tratamientos.

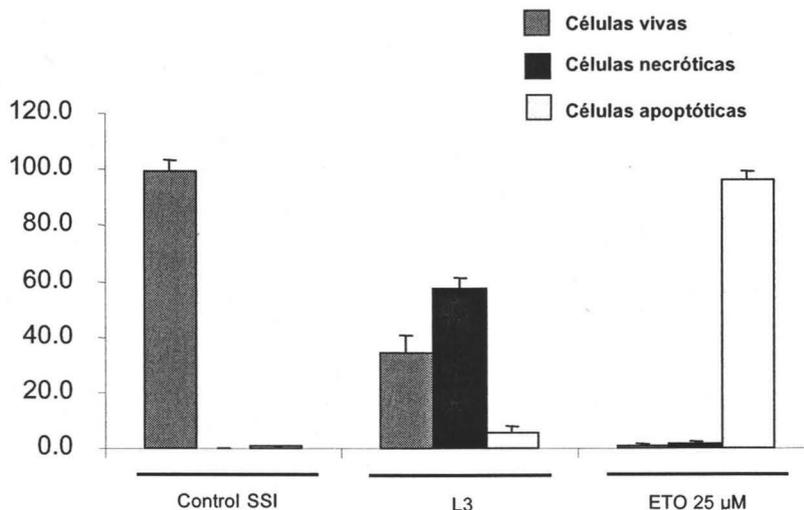


Figura 16. Porcentaje de células apoptóticas / necróticas provocado por el tratamiento con L3 al 12.5% y con etopósido 25 μM en células HeLa.

Estos resultados sugieren que la muerte de las células HeLa inducido por la exposición de L3 al 12.5% no se debe a un proceso apoptótico, y en cambio, la marca positiva para ioduro de propidio sugiere un proceso necrótico. Sin embargo, para confirmar la ausencia de apoptosis se buscó la formación de escaleras de DNA característica de la fragmentación internucleosomal del DNA inducida por un proceso apoptótico.

## 2) Fragmentación del DNA

Se realizó un curso temporal de cada 24 h postexposición para determinar la presencia de las escaleras de DNA y la figura 17 muestra que las células HeLa tratadas durante 5 min con L3 al 12.5% no presentan una fragmentación del DNA a los tiempos probados.

De la misma forma el vehículo utilizado (solución salina) no presenta ninguna alteración a la integridad del DNA.

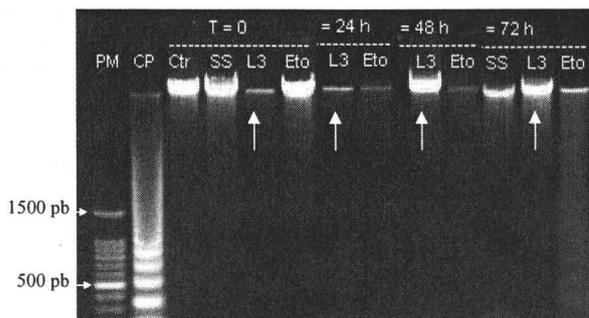


Figura 17. Gel de agarosa al 1 %. Se observa el DNA integro de las células HeLa tratadas con L3 12.5% a diferentes tiempos (flechas). Se observa fragmentación del DNA a las 72 h en las células tratadas con Etoposido 25  $\mu$ M (Eto). PM: Peso Molecular, CP: control positivo, Ctr: control negativo, SS: solución salina

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con L3 no induce la fragmentación internucleosomal del DNA, por lo que se confirma que el efecto citotóxico antes demostrado es independiente de un proceso apoptótico. Es importante mencionar que tampoco se observó degradación inespecífica del DNA, característica de un evento necrótico, por ello y para evaluar una posible necrosis celular asociada a la permeabilidad de la membrana celular se realizó el ensayo de liberación de LDH al medio de cultivo.

### 3) LDH

Se realizó un curso temporal de cada 24 h postexposición para evaluar el efecto producido por la solución de prueba L3 al 12.5% a la membrana de las células HeLa como marcador de un proceso necrótico, y para ello se evaluó la liberación de la enzima citosólica Lactato Deshidrogenasa Humana (LDH) al medio de cultivo. Para lograr la conversión de lactato a piruvato se requiere de la oxidación del cofactor NADH a NAD<sup>+</sup> y debido a que la LDH cataliza también la reacción inversa (de lactato a piruvato), entonces es posible evaluar el incremento en la formación del cofactor NADH, el cual absorbe a 340 nm de longitud de onda. La aparición de este cofactor es directamente proporcional a la actividad enzimática, y ésta a su vez, también es directamente proporcional a la cantidad de enzima, por lo que de forma indirecta es posible detectar el incremento en la cantidad de enzima liberada al medio de cultivo.

Se tomaron 31 lecturas de absorbencia a 340 nm (1 lectura por min durante 30 min) para cada tiempo a evaluar, cada uno por duplicado y se obtuvo el delta promedio del incremento en la absorbencia, estos valores se resumen en la Tabla

7 y la Figura 18 muestra claramente el incremento de la LDH conforme aumenta el tiempo.

	$\bar{\Delta}$ Abs / min	$\bar{\Delta}$ Abs / min	Promedio $\pm$ DE
Control Negativo	0.0045	0.0046	0.0045333 $\pm$ 4.714E-05
Tiempo 0	0.0069	0.0065	0.006700 $\pm$ 0.00033
Tiempo 24 h	0.0092	0.0105	0.0098333 $\pm$ 0.0008957
Tiempo 48 h	0.0121	0.0124	0.0122667 $\pm$ 0.0002357
Tiempo 72 h	0.0169	0.0170	0.0169833 $\pm$ 2.357E-05

Tabla 7. Valores del delta promedio de absorbancia por minuto obtenidos cada 24 h por el tratamiento de L3 al 12.5%. DE=desviación estándar.

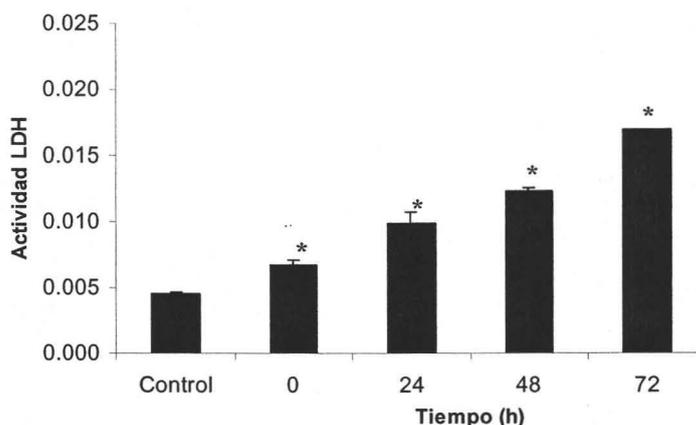


Figura 18. Incremento de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa humana liberada al medio de cultivo de células HeLa tratadas con L3 al 12.5%. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control  $p < 0.05$ .

Los resultados encontrados muestran que conforme pasa el tiempo el daño a la membrana plasmática de las células HeLa tratadas con L3 12.5% también aumenta. Este incremento en la permeabilidad de la membrana pudiera ser consecuencia de la necrosis que están sufriendo las células.

Por último, en el análisis estadístico realizado (Tukey) se encontró que sí existe diferencia estadísticamente significativa entre todos los tiempos analizados.

## 5. Microscopía Electrónica

El análisis por microscopía electrónica mostró que las células HeLa tratadas con L3 presentan un extenso daño intracitoplasmático desde las primeras 24 h de exposición (Figura 19B), particularmente en mitocondrias y en retículo endoplasmático. En los días siguientes (Figura 19C-H), las mitocondrias van perdiendo sus crestas progresivamente y el retículo endoplasmático sus ribosomas.

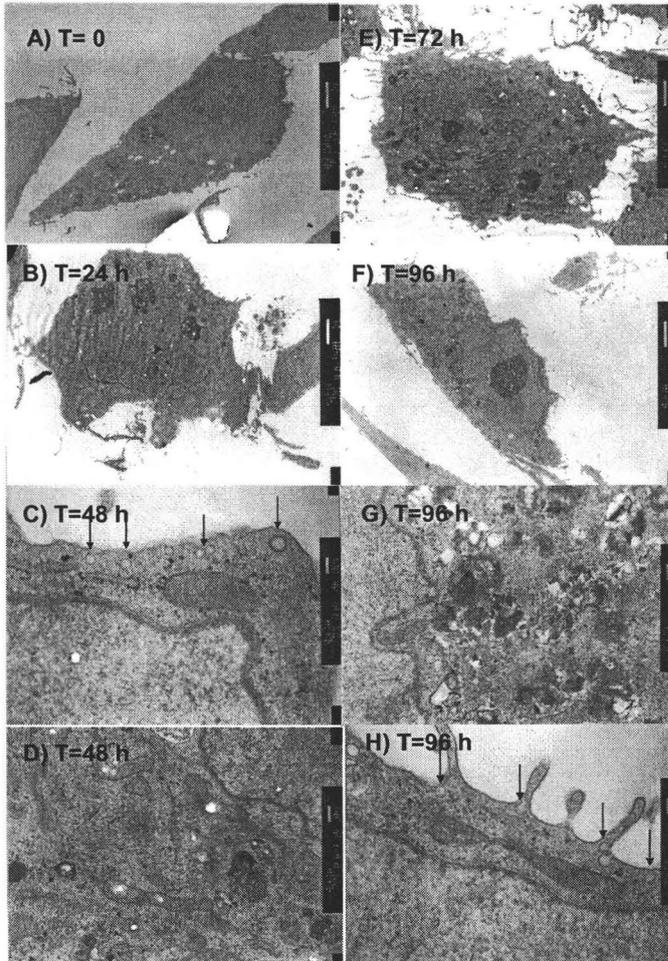


Figura 19. Análisis por microscopía electrónica de células HeLa tratadas con L3 al 12.5%. Las micrografías (A – H) muestran el estado ultraestructural cada 24 h después del tratamiento. Las flechas muestran invaginaciones que se pudieran formar por endocitosis. Micrografías A, B, E y F aumento 4000X. Micrografías C y H aumento 50000X. Micrografías D y G aumento 25000X

Las micrografías obtenidas del análisis por microscopía electrónica de células HeLa tratadas con L3 al 12.5% muestran cambios ultraestructurales asociados a procesos necróticos, se detectan mitocondrias redondas y con pérdida de la estructura interna (Figura 19D), el retículo endoplásmico ha perdido los ribosomas, se observa un incremento en la cantidad de vacuolas citoplasmáticas y formación de autofagosomas (Figura 19G); aunado a esto, se observa una cromatina laxa con membranas nucleares aparentemente intactas (Figura 19 C, D, G y H) . La membrana plasmática no está lisada pero presenta formación de filipodios (Figura 19 E). El aumento en el tamaño del núcleo sugiere un incremento en la cantidad de DNA presente en la célula, propio de un arresto en la fase G2/M (Figura 19B y F).

Las flechas colocadas en las micrografías de 48 y 96 h (Figura 19C y H) indican la presencia de pequeñas vacuolas que pudiéramos suponer corresponden a un proceso activo de endocitosis que no sabemos si es el extracto vegetal L3 siendo endocitado como un mecanismo de defensa de la célula.

## 6. Microarreglos de DNA

Para determinar los cambios en la expresión génica de células HeLa tratadas 5 min con L3 al 12.5% se realizó un microarreglo de DNA, para ello se obtuvo primero el RNA tanto de las células control como de las células tratadas. La extracción se realizó a las 6 h de haber sido expuestas y la figura 13 muestra que el RNA obtenido no se encuentra degradado y que se obtiene una cantidad suficiente de cada muestra para el experimento.

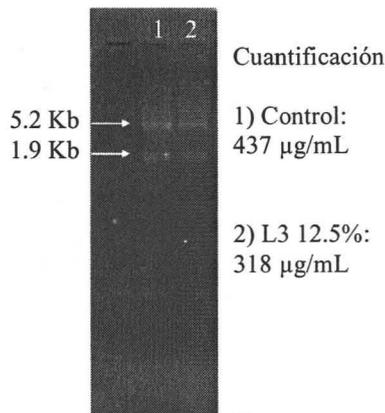


Figura 20. Gel desnaturalizante de agarosa al 1% para detectar el estado del RNA extraído de células HeLa tratadas con L312.5%

Antes del marcaje del RNA, éste fue concentrado con acetato de sodio 3M y etanol absoluto, para obtener la mayor cantidad posible de cada una de las muestras (Tabla 8), mismas que fueron marcadas con los fluoróforos correspondientes. Para igualar la cantidad de muestra que sería hibridada en función de la fluorescencia, se obtuvo la absorbencia de las muestras a 560nm para Cy3 y a 660 nm para Cy5.

Muestra	RNA total	Fluoróforo	Absorbencia
Control	20 µg	Cy3	0.0052
L312.5%	19 µg	Cy5	0.0039

Tabla 8. Valores de absorbencia del cDNA obtenido a partir del RNA de células HeLa tratadas con L312.5% para normalizar la cantidad a hibridar.

La figura 21 muestra la imagen obtenida por el lector de microarreglos, donde los puntos de color rojo representan una disminución en la expresión de ese gen, los puntos verdes una sobreexpresión y los amarillos indican que no hubo cambio en la expresión.

Para la adecuada cuantificación de los valores obtenidos por la emisión de la fluorescencia, se normalizaron las lecturas y se decidió tomar en cuenta los cambios en la expresión genética por arriba de 1.5 veces con respecto al control. Se encontraron 250 genes sobreexpresados y 228 silenciados (anexo II). Los resultados obtenidos fueron agrupados de acuerdo a su función biológica, formando principalmente 6 grupos: Metabolismo, Señalización, Ciclo celular, Moléculas de adhesión, Receptores y Síntesis de proteínas. La tabla 9 presenta algunos genes importantes tomados como ejemplos de cada una de las funciones celulares antes mencionadas.

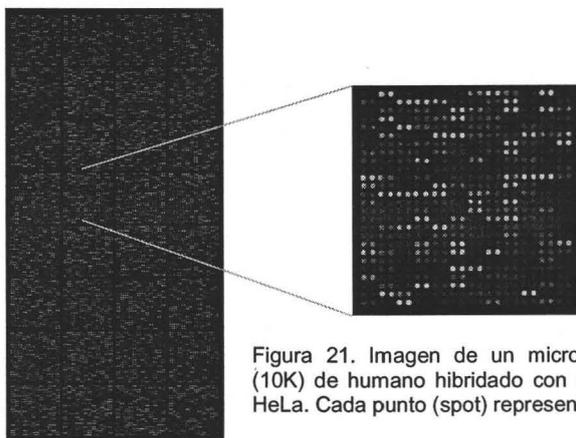


Figura 21. Imagen de un microarreglo de DNA (10K) de humano hibridado con cDNA de células HeLa. Cada punto (spot) representa un gen.

		GENES SOBREEXPRESADOS		GENES SILENCIADOS	
Número Total de Genes		250		228	
Importante conjunto de genes		20 Proteínas Ribosomales		-----	
Metabolismo	Genes presentes en varias vías.	Gen	Función	Gen	Función
		HEMK	Metiltransferasa (metabolismo de a.a.)	ALDH	Aldehído deshidrogenasa (metabolismo de carbohidratos, Ácidos Grasos y a.a.)
	DDC	Dopa descarboxilasa (metabolismo de a.a.)			
Vía mayormente afectada.	Fosforilación Oxidativa		Metabolismo de Purina y Pirimidinas		
Cascadas de señalización	MAPK	MKP	Inhibe ERK, p38 y JNK, se detiene la transcripción de genes proliferativos.	HPK1	Activa JNK, promoviendo la transcripción de genes proliferativos.
	TGF-β	EBAF / TGFB4	Inhibe a TGF-β	PKC	Activa Ras/Raf induciendo proliferación.
	Wnt	CK2	Efectos proliferativos a través de la acumulación de β-catenina.	RBL2/p130	En conjunto con Rb y p107 regulan al factor transcripcional E2F/DP1.
	Fosfatidilinositol	INPP5A	Proteína polifosfatada de membrana indispensable en la señalización.	PKC	Regulación de Ca <sup>++</sup> intracelular.
Ciclo Celular		p27 <sup>Kip1</sup> p57 <sup>Kip2</sup>	Inhibe a la Ciclina D.	PCNA	Participa activamente en el proceso de replicación del DNA.
		CycD	Se une a CDK4/6 y fosforila a RB		
Adhesión	Mediada por Integrinas	PAK4 / p21	Participa activamente en la reorganización de citoesqueleto de actina y formación de filipodios	GIT2	Inhibe a p21
	Mediada por Cadherinas	CK2	Estabiliza los microtúbulos	-----	
Receptores		GABA	Incrementa la posibilidad de hiperpolarizar la membrana plasmática.	P2RX4	Canal Iónico dependiente de ATP extracelular.
		GPR8	Receptor acoplado a proteína G 8	GPR74	Receptor acoplado a proteína G 74
Transcripción y Traducción		GTF2IRD1	Factor transcripcional basal TFIIIF3	POLR3F POLR3G	Polipéptidos F y G de unión al DNA de la RNAPol III

Tabla 9. Análisis de los cambios en la expresión genética de células HeLa tratadas 5min con L3 12.5%, para la interpretación de los resultados se utilizó la base de datos Kegg.

## 7. Radiación

EL daño ocasionado por la radiación UV en células HeLa fue mucho mayor en comparación con las células control (Figura 22), el daño no fue cuantificado, simplemente se observan las diferencias morfológicas entre las células.

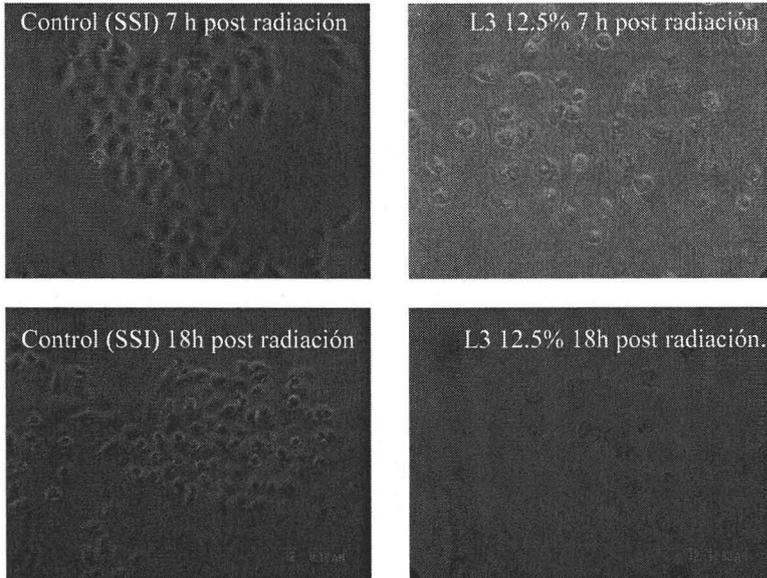


Figura 22. Cultivos de células HeLa tratadas con L3 12.5% durante 5 min y 48 h después fueron expuestas a luz UV ( $80 \text{ J/m}^2$ ) durante 2 min. Las fotografías se tomaron 7 y 18 h postradiación en el microscopio invertido con el mismo aumento (objetivo 32X).

Las diferencias encontradas tanto en el número de células por campo, como en la morfología celular sugieren una mayor sensibilidad a la radiación de las células previamente tratadas con L3, esto apoyaría lo observado en el ciclo celular ya que, como es sabido las células cuando se encuentra en la fase G2/M son más sensibles a la radiación, <sup>(51)</sup> por ello es factible proponer el tratamiento con el extracto vegetal L3 como terapia adyuvante en otro tipo de cánceres, en los cuales la resistencia de algunos tumores a la radiación complican el tratamiento y como consecuencia la calidad de vida de los pacientes.

## DISCUSIÓN

El extracto vegetal L3 ha mostrado un efecto citotóxico "in vitro" de una manera dependiente de dosis. Las diferentes sensibilidades obtenidas pudieran deberse a las diferencias histopatológicas de las líneas probadas, ya que por ejemplo, HeLa proviene de un adenocarcinoma epitelial, mientras que SiHa proviene de un carcinoma escamoso y Ca Ski, que a pesar de provenir de una mujer con carcinoma epidermoide, la línea celular fue establecida a partir de sitios metastásicos en el intestino delgado. Igualmente, las diferencias en susceptibilidad pueden estar ligadas a diferentes mutaciones puntuales en las diferentes líneas tumorales. También es cierto que la sensibilidad de una línea a ciertos fármacos puede deberse a otros factores, como son ciertos mecanismos moleculares específicos, como la activación de NF-kappa- $\beta$ , que se ha visto contribuye a la resistencia contra ciertos antineoplásicos,<sup>(52)</sup> ó inclusive, que las diferencias en la sensibilidad pudieran deberse a los niveles de receptores, canales iónicos o transportadores membranales presentes entre las diversas líneas celulares analizadas.<sup>(53)</sup> También es sabido que la presencia de ciertos tipos de HPV de alto riesgo (HPV 16 y 18) presentes en algunas líneas celulares esta relacionado con su resistencia a diversos antineoplásicos como el cisplatino o a factores fisicoquímicos como la radiación,<sup>(54)</sup> esto pudiera explicar la extremada sensibilidad de la línea C33A (HPV negativo), sin embargo, encontramos que el efecto citotóxico del extracto vegetal L3 no es exclusivo de células tumorales ya que la IC<sub>50</sub> de los fibroblastos tratados con L3 y su efecto dependiente de dosis es muy similar a las líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino. Otro factor a considerar es el estado de p53 de las líneas de cáncer de cérvix probadas, ya que SiHa y CaSki tienen una expresión normal de esta proteína y fueron las más resistentes, HeLa tiene disminuida su expresión y C33A lo expresa mutado y fue la más sensible, por lo que, excluyendo la posible participación de otras mutaciones, sería posible suponer que exista un mecanismo de acción dependiente de p53 pero independiente del tipo de HPV.

Muchos de los tratamientos contra el cáncer, incluyendo la radiación, los antimetabolitos de purinas y pirimidinas, los agentes alquilantes, los inhibidores de topoisomerasas e inclusive los derivados de compuestos de platino, dañan en parte, al DNA de las células, y debido a que estos tratamientos no son selectivos para las células cancerígenas, los pacientes sufren de graves efectos secundarios cuando son tratados con estos fármacos, es por ello que muchos grupos de investigación se encuentran en la búsqueda de nuevos compuestos contra el cáncer que cada vez sean más específicos y por ende más eficientes.

Los avances contra el cáncer derivados del estudio del ciclo celular han permitido la creación de la idea de los anuladores del punto de control en G2 (G2 checkpoint abrogators) como una terapia específica contra una célula cancerosa, basándose en el descubrimiento de que muchas de ellas presentan alteraciones en la regulación del punto de control G1 (G1 checkpoint), provocando así que la célula dependa de su punto de control en G2 para lograr la replicación celular y en caso de ser anulado la célula morirá, principalmente por apoptosis. Una ventaja de

estos agentes terapéuticos es que se convierten en específicos para las células tumorales y por ello existe la posibilidad de un mejor tratamiento y por lo tanto mejorar el pronóstico. <sup>(55)</sup>

El incremento en la relación núcleo/citoplasma se ha observado en los casos de arresto del ciclo celular en la fase G2/M, debido al doblaje del DNA y al impedimento de la mitosis. Al observar por microscopía de luz a las células tratadas con L3 se encontró este fenómeno morfológico, obligando así el estudio del ciclo celular de las células tratadas con L3.

Al comparar el efecto en el ciclo celular del extracto L3 entre las células HeLa y los fibroblastos notamos una diferencia importante, ya que a pesar de obtenerse el arresto en la misma fase (G2/M), la fracción poblacional afectada es muy diferente: 90% HeLa Vs 14% Fibroblastos (ambos después de 12.5% de L3), ésta diferencia tan marcada en la sensibilidad entre las células tumoral y las primarias en el ciclo celular hace factible la idea de que el L3 presenta cierta especificidad para las células HeLa, por lo menos después del 6.25% de L3, ya que a menores dosis no se presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células tratadas con solución salina y después de 12.5% de L3 se alcanza el efecto máximo, mismo que se mantiene constante a 18.75 y 25% de L3. Este comportamiento también se observó en el ciclo celular de los fibroblastos, siendo la concentración de 12.5% de L3 la que decidiera el estado de arresto en la fase G2/M del ciclo celular.

Estos resultados sugieren que el extracto vegetal L3 pudiera compararse con un anulador del punto de control en G2, y de ser así, aportaría grandes ventajas en el tratamiento de displasias cervicales.

Es sabido que las ciclinas forman parte fundamental en la progresión del ciclo celular, siendo el complejo ciclina B1 / cdc2 el encargado de controlar el paso de G2 a M, este complejo se encuentra inactivo en el citoplasma, debido a la inhibición que produce la fosforilación de los residuos Thr<sup>14</sup> y Tyr<sup>15</sup> de cdc2, por lo que éste requiere ser activado por la fosfatasa Cdc25C. Además existe una vía de importación y exportación nuclear para la ciclina B1, que está regulada por la fosforilación y desfosforilación de 4 residuos de serina (Ser<sup>94</sup>, Ser<sup>96</sup>, Ser<sup>101</sup>, Ser<sup>113</sup>) presentes en una secuencia de retención citoplasmática (CRS-citoplasmatic retention sequence), que a su vez contiene una secuencia de exportación nuclear (NES-nuclear export sequence) que al activarse por fosforilación de la Ser<sup>113</sup> impide que la Ciclina B1 se una al factor de transporte nuclear CRM1, logrando así la acumulación del complejo en el núcleo para que pueda tener su acción. Es por ello que la actividad biológica del complejo ciclina B1 / cdc2 está regulada tanto por su activación enzimática como por su distribución subcelular. <sup>(56)</sup>

Los resultados inmunohistoquímicos encontrados muestran la acumulación nuclear de la ciclina B1, por lo que se puede inferir que el arresto en la fase G2/M, inducido por el tratamiento con el extracto vegetal L3, pudiera estar asociado más que con la acumulación nuclear de la ciclina B1, con la actividad enzimática de

ésta, ya que si la función enzimática del complejo no estuviera alterada y el problema se encontrara a nivel del sistema de exportación nuclear, la célula se arrestaría en M. Si el complejo ciclina B1/cdc2 no fuera exportado y degradado por el proteosoma, la célula iniciaría la mitosis pero se arrestaría al término de la anafase, <sup>(57)</sup> de hecho existen estudios en embriones de ratón en un estadio de 2 células, que cuentan con la suficiente cantidad de ciclina B1 para entrar en mitosis y su arresto en G2/M es debido a la baja actividad en la desfosforilación de cdc2. <sup>(44)</sup>

Los resultados obtenidos respecto a la acumulación nuclear de ciclina B1 deben ser estudiados con mayor profundidad, ya que inclusive es posible que la acumulación de esta proteína sea consecuencia del arresto en G2/M y no la causa del mismo.

El daño producido por el extracto vegetal L3 se presenta de una forma, dependiente de tiempo y dosis, a través de un arresto del ciclo celular en la fase G2/M, por lo que se trató de determinar si la muerte era debida a un proceso asociado a apoptosis. Contrario a lo esperado, al analizar el proceso a través del cual las células tratadas con L3 al 12.5% mueren se encontró que se debe principalmente a un proceso necrótico, ya que no se observa marca con Anexina V, ni fragmentación del DNA y, en cambio, la liberación de LDH al medio de cultivo se incrementó al paso del tiempo, si bien es cierto que los marcadores analizados son exclusivos del proceso al que están asociados, no podemos aún, determinar un mecanismo puntual de muerte, ya que el L3 es un extracto cuyos componentes y la proporción de los mismo es aún desconocido por nosotros y cuyo mecanismo de acción no ha sido elucidado aún, por lo que hasta ahora y con los resultados obtenidos solo es posible visualizar un efecto citotóxico dependiente de dosis, asociado al arresto del ciclo celular en la fase G2/M, mismo que pudiera deberse a la activación y/o acumulación de la Ciclina B1.

El análisis obtenido por microscopía electrónica apoya la idea de que la muerte celular es debida a un proceso necrótico, ya que a pesar de que la membrana plasmática no presenta lisis evidente, la membrana nuclear conserva su integridad y la cromatina se mantiene laxa en todo momento, con lo que se puede concluir que no se presentan los marcadores clásicos de apoptosis como son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear.

El daño encontrado en las células HeLa tratadas con L3 al 12.5% se incrementó conforme pasó el tiempo. Este deterioro en el tiempo correlaciona con las grandes alteraciones morfológicas observadas en mitocondrias y retículo endoplásmico, mismas que podrían ser responsables de la disminución del metabolismo celular, afectando procesos de respiración y producción de energía, así como traducción de proteínas llevando a la célula a un estado inevitable de muerte.

En muchos casos se ha observado que cuando las células no pueden salir del arresto del ciclo celular mueren generalmente por apoptosis, sin embargo, para que esto suceda se requiere de una serie de factores y condiciones que de no

cumplirse podrían inducir un cambio en el tipo de muerte, de apoptosis a necrosis ó viceversa. Estos factores son muy variados, se ha demostrado la necesidad de una concentración óptima de ATP para que la progresión de la apoptosis se lleve a cabo, ya que cuando la célula no puede mantener niveles estables de ATP intracelular, un estímulo apoptótico causa necrosis, debido a que los requerimientos energéticos para lograr la condensación de la cromatina, la degradación del DNA y en sí el colapso del núcleo, son muy elevados. <sup>(45)</sup> Otros estudios han demostrado que las caspasas pueden disparar una necrosis secundaria si se unen e inactivan las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, ya que si la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta la membrana plasmática se lisa como consecuencia de un desequilibrio osmótico. <sup>(46)</sup> A su vez, muchas de las señales apoptóticas inducen cambios en la mitocondria, como la apertura de un canal iónico altamente regulado que se encuentra entre la cara interna y la externa de la mitocondria y se llama poro transicional (PT) de la permeabilidad mitocondrial. El PT es un gran complejo proteico compuesto principalmente por un transportador de adenina, ciclofilina D y un canal aniónico dependiente de voltaje (porina). Cuando el PT se encuentra abierto permite el paso de solutos de aproximadamente 1500 Da, y como resultado, se produce una despolarización de la mitocondria generando una disminución en el gradiente electroquímico, con lo cual se induce una inhibición de la respiración, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y se detiene la producción de ATP. <sup>(47)</sup> Entonces, si una señal apoptótica abre el poro y este es incapaz de cerrarse, la célula morirá por necrosis.

En la búsqueda de un mecanismo de acción para el extracto vegetal L3 se tendrá que determinar si el daño es inducido por un proceso únicamente necrótico, o si al inicio se presentan estímulos apoptóticos, que por causas ya mencionadas, terminen en una muerte con características de necrosis.

Dentro de la idea de que el efecto biológico producido por el extracto vegetal L3 es a través de mecanismos moleculares bien definidos se realizó un análisis de la expresión génica en células HeLa 6 h después de haber sido expuestas al L3 12.5%. Este análisis puede ser visto de dos formas, 1) los cambios en la expresión genética son generados por alguna vía de señalización y dichos cambios represente la causa del efecto biológico encontrado para el tratamiento con L3, ó 2) la inducción de los cambios en la expresión genética se presenta como consecuencia del daño producido a la célula por la presencia de L3, es decir, lo que notamos es un mecanismo de defensa celular para tratar de reparar el daño. Tomando en cuenta el tiempo al cual se realizó la evaluación (6 h) y considerando que en los ensayos biológicos el tiempo de evaluación del efecto fue hasta las 72 h post-exposición es más factible creer que los resultados encontrados son consecuencia de una vía de señalización específica. Ahora bien, no todos los cambios en la expresión genética deben ser considerados causales de todos los efectos biológicos, ya que es posible que la muerte celular, e inclusive el arresto, se obtengan por mecanismos independientes, producidos por la interacción del L3 con cualquier componente celular, y por tanto, los cambios en la expresión genética puedan simplemente contribuir con el efecto.

Otro concepto que se debe tener en cuenta para mantener la debida distancia entre el análisis de la expresión genética y su asociación al efecto biológico de L3, es que el análisis de los genes encontrados solo representan el nivel transcripcional de la célula en ese preciso momento y mientras no se evalúen los cambios traduccionales de la misma, será imposible asegurar que estos genes terminarán en proteínas funcionales con la capacidad de inducir un efecto biológico; sin embargo, lo que sí se puede asegurar es que el simple hecho de obtener cambios en la expresión genética de aproximadamente 500 genes es evidencia suficiente de que el extracto vegetal L3 genera alteraciones metabólicas que finalmente desembocan en la muerte celular.

Es muy importante aclarar que los resultados de sobreexpresión o silenciamiento de genes obtenidos en este microchip no fueron confirmados por ninguna otra técnica, por lo que su análisis es muy subjetivo y aplica para los experimentos realizados bajo las condiciones descritas en este trabajo, esta aclaración se debe a que inclusive dentro de un mismo laboratorio en muchos casos no se obtienen resultados reproducibles ya que la metodología de los microarreglos de DNA todavía presenta variaciones técnicas importantes.<sup>(48)</sup>

Los resultados obtenidos del análisis en la expresión genética de células HeLa 6 h después de haber sido tratadas durante 5 min con L3 12.5% muestran que varias funciones celulares se encuentran alteradas: 1) el metabolismo celular, 2) importantes vías de señalización, 3) el ciclo celular, 4) moléculas de adhesión, 5) receptores membranales acoplados a proteínas G ó receptores asociados al equilibrio electroquímico de la célula y 6) funciones transcripcionales y traduccionales.

Dentro del metabolismo celular notamos que los genes que se encuentran tanto sobreexpresados como silenciados se comparten en diferentes rutas metabólicas y codifican para un grupo de enzimas claves en la síntesis y degradación de aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos. También se encontró una sobreexpresión de varios genes relacionados con la fosforilación oxidativa y un silenciamiento de varios genes relacionados con el metabolismo de purinas y pirimidinas. Algunos de estos cambios en el metabolismo celular correlacionan con el daño observado (por microscopia electrónica y por sales de tetrazolio) a la mitocondria y por ende, podría suponerse una disminución del aporte energético de la célula, lo que la obliga a incrementar la fosforilación oxidativa sacrificando el metabolismo de bases nitrogenadas para tratar de compensar el gasto de energía.

En las cascadas de señalización afectadas encontramos que en la vía de las MAP cinasas está sobreexpresado el gene de MKP, el cual inhiben la transcripción de genes encargados de activar la proliferación celular como JNK, ERK y p38. La activación de éstas últimas dos proteínas está asociada con apoptosis.<sup>(49)</sup> Además, están silenciados genes que activan directamente la proliferación celular, por lo que es factible imaginar que a través de esta vía se logra una contribución al arresto del ciclo celular.

Todos los cambios en la expresión genética de las vías de señalización apoyan la hipótesis que el L3 actúa a través de alguna de estas cascadas para lograr su efecto biológico, ya que notamos que los genes alterados están asociados, además de la inhibición de la proliferación, con la regulación del calcio intracelular y la regulación de la migración. Por ejemplo, se ha demostrado la importancia de la proteína cinasa C (PKC) como un mediador de la señal mitogénica, así como su papel en la regulación de señales antiapoptóticas, por ello, la inhibición de PKC puede inducir apoptosis e incrementar el efecto citotóxico de algunos compuestos. <sup>(50)</sup> En el caso del efecto producido por L3 no podemos asegurar que sea un inhibidor de PKC, pero lo que sí notamos es una disminución en la expresión de esta importante proteína.

Durante el análisis de los cambios en la expresión de los genes asociados con el ciclo celular, encontramos que tanto la ciclina D2 como el inhibidor de complejos ciclinas/cdks (ciclinaE/cdk2, ciclinaD2/cdk4, ciclinaA/cdk2) llamado p57<sup>Kip2</sup> están sobreexpresados, mientras que la ciclina D2 tiene un incremento de 1.8 veces con respecto a las células no tratadas, su inhibidor p57<sup>Kip2</sup> tiene un incremento de 3.0 veces (Anexo II), por lo que podría uno suponer que predominaría el efecto del inhibidor y como consecuencia un arresto en G0/G1; sin embargo, mucho se ha comentado las deficiencias de las células tumorales para regular adecuadamente el punto de control G0/G1. <sup>(55)</sup> También se encontró que el gen que codifica para PCNA está silenciado, el cual además de ser vital durante la replicación del DNA, se ha visto está relacionado con Cdc25C durante la transición de G2 a M, <sup>(51)</sup> por lo que su ausencia pudiera contribuir con el arresto observado en las células tratadas con L3; también es sabido que cuando se presenta algún tipo de daño al DNA antes de que la célula termine la fase S se puede obtener arresto en G2/M a través de la proteína sensora ATR, la cual previene la activación del complejo ciclina B/cdc2 por inducción de su secuestro citoplasmático y/o por la inhibición catalítica de Cdc25C. <sup>(52)</sup> Por ello, es posible que el efecto encontrado en los cambios de la expresión genética con respecto al ciclo celular se refleje en el punto de control en G2, impidiendo que la célula se divida.

Desde hace tiempo se sabe que existe una estrecha relación entre las vías de señalización -en particular la familia de proteínas de unión a GTP relacionadas a Rho- la reorganización del citoesqueleto y la adecuada entrada y progresión del ciclo celular, <sup>(53)</sup> de hecho, el gen con mayor sobreexpresión (3.67 veces) fue una proteína activadora de Rho (Anexo II). En algunos experimentos con análogos a nucleosidos se ha propuesto que el efecto citotóxico se deba a la intervención de los puntos de control de daño al DNA, a las vías de señalización asociadas a la reorganización de citoesqueleto y a la maquinaria central de división celular para inducir un arresto irreversible del ciclo en G2/M como el principal mecanismo de muerte, aún más que por apoptosis. <sup>(54)</sup> Estos datos soportan la idea de que la sobreexpresión de moléculas de adhesión relacionadas con la reorganización del citoesqueleto también pudieran contribuir con el arresto del ciclo y la muerte de células HeLa tratadas con L3.

En los cambios de la expresión genética relacionados con los receptores celulares, encontramos alteración en dos tipos, los acoplados a proteínas G, capaces de iniciar una vía de señalización a través de segundos mensajeros y los receptores relacionados con el equilibrio electroquímico de la célula como GABA o canales iónicos dependientes de ATP, es de esperarse que cualquier alteración de estos influya en el metabolismo de la célula, en el arresto del ciclo celular ó probablemente, en su muerte, suponiendo que alguno de los compuestos del extracto vegetal L3 se une a la membrana plasmática y bloquea canales iónicos o ATPasas provocando cambios en la polaridad de la membrana, probablemente irreversibles, que pudieran conducir a la muerte por necrosis<sup>(46)</sup> y/o que uno o más compuestos presentes en el extracto L3 se una específica o inespecíficamente a receptores de membrana acoplados a proteínas G, como RhoA, desencadenando cambios importantes en la morfología de la célula, la comunicación célula-célula, la movilidad celular y la organización actina-miosina,<sup>(55)</sup> situación que como ya se ha discutido ampliamente pudiera inhibir la proliferación de las células y arrestarlas en la fase G2/M del ciclo celular

En el último grupo, relacionado con la transcripción y la traducción celular, se encontró la sobreexpresión de un gen (GTF2IRD1) cuyo producto tiene una función de factor transcripcional o como regulador transcripcional negativo análogo a TFII-I<sup>(56)</sup> y además un par de genes silenciados, POLR3F y POLR3G conocidos también como RPC39 y RPC32, respectivamente. Estos genes codifican para polipéptidos de unión al DNA de la RNAPol III a través del complejo que forma su factor transcripcional TFIIB. Por lo tanto, si la RNAPol III presenta deficiencias en su interacción con el DNA, la transcripción de tRNA's, del 5S rRNA y de los RNAs pequeños que participan en el procesamiento o "splicing" del mRNA se verá afectada provocando una interrupción en la traducción proteica, en cuyo caso podría, de ser confirmado, inhibir también la síntesis de las proteínas de HPV E6 y E7 ayudando a la muerte y arresto celular mediadas por p53 y pRB.

En conjunto, el análisis del microarreglo de DNA confirma que el efecto biológico obtenido en células HeLa tratadas con L3 (muerte celular asociada al arresto en la fase G2/M del ciclo celular) se debe a mecanismos moleculares, donde cualquiera de las funciones celulares analizadas pudiera en algún momento contribuir con dicho efecto.

Un último experimento que confirma el potencial de este extracto en la lucha contra el cáncer, es su capacidad para radiosensibilizar a las células a través de su arresto en G2/M, que como ya es sabido es una de las fases del ciclo celular en la cual las células son más sensibles a la radiación,<sup>(57)</sup> es por ello que el extracto vegetal L3 no solo tiene un gran potencial en las displasias cervicales, sino también como terapia adyuvante para otros tipos de cánceres cuyos tumores son resistentes a la radiación.

Es un hecho que el mecanismo de acción del extracto vegetal L3 solo puede estar, hasta ahora, basado en suposiciones, por ello, es importante continuar con las investigaciones tratando de fraccionar dicho extracto hasta lograr identificar las

diversas moléculas que lo conforman, así como la actividad biológica de cada una de ellas, lo cual nos permitiría proponer de forma menos compleja un mecanismo de acción para este derivado de la lignina, ya que como se ha mencionado mientras se tenga una mezcla será difícil determinar que compuesto es el que produce el efecto biológico encontrado, y aún más difícil determinar el mecanismo de acción. Así mismo, si se llegarán a presentar efectos secundarios por el tratamiento con el extracto L3, será importante poder identificar al compuesto responsable, y si es posible, eliminarlo de la preparación.

De acuerdo a la literatura sobre los complejos que pueden formar la lignina con carbohidratos <sup>(21)</sup>, es posible que de forma similar a ellos, el L3 esté actuando por inhibición de enzimas claves para el funcionamiento celular, ya sea con cierta especificidad o por la simple afinidad que tiene por las proteínas, se este uniendo a ellas de forma aleatoria, provocando alteraciones dramáticas en el metabolismo celular.

En la medida que se vayan identificando los componentes del extracto L3, será posible indagar sobre otros efectos biológicos (antimicrobiano, antiviral, antimutagenico, etc) en comparación con otros derivados de la lignina que presentan esta variedad de actividades.

## CONCLUSIONES

- EL extracto vegetal L3 tiene efecto citotóxico en una forma dependiente de dosis para células de cáncer cervicouterino y fibroblastos humanos.
- El extracto vegetal L3 induce un arresto del ciclo celular en la fase G2/M en células HeLa 72 h posteriores al tratamiento con una concentración del 12.5%, este arresto está asociado a una acumulación de ciclina B1 en el núcleo.
- La muerte de las células HeLa tratadas con L3 al 12.5% está asociada a un proceso necrótico.
- El tratamiento con L3 al 12.5% induce cambios en la expresión genética de células HeLa, que pudieran estar implicados en el mecanismo de acción del extracto.
- El mecanismo de acción de L3 no ha sido descubierto, pero suponemos que pudiera iniciar en la membrana plasmática a través de receptores y/o canales iónicas para inducir necrosis por daño mitocondrial y arresto del ciclo celular por alteración en las vías de señalización.

## PERSPECTIVAS

El presente trabajo solo describe el efecto biológico, mostrado por el tratamiento con el extracto vegetal L3, en células de cáncer cervicouterino *in vitro*, por lo que se considera que las investigaciones subsecuentes deberán dirigirse hacia la elucidación de un mecanismo de acción a través de análisis genómicos más profundos, así como también análisis proteómicos.

Otro factor a considerar a futuro es la posibilidad de fraccionar el extracto vegetal L3 en busca del compuesto responsable de la actividad biológica y en la medida de lo posible, purificarlo para ayudar en la elucidación del mecanismo de acción.

Por último, es muy importante profundizar en el potencial que presenta el extracto vegetal L3 como terapia adyuvante en la lucha contra el cáncer, a través de su efecto radiosensibilizador.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tapia, RC, Sarti, E, Kuri, P, Ruiz-Matus, C, Velázquez, O. *et al.* Cáncer cervicouterino. El Manual de Salud Pública. Tomo 4. México. 2003. pag 735-767.
2. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 2001;164(7):1017-1025.
3. Palacio-Mejia LS, Rangel-Gomez G, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E. Cervical cancer, a disease of poverty mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Suppl 3:S315-S325.
4. Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Suppl 3:S306-S314.
5. Bosch FX, Muñoz N, Shah KV, and Meheus A. Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer.* 1992. 52:171-173
6. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002; 16(3):231-240.
7. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(1-2):9-19
8. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997; 71(3):2449-56
9. Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirol.* 1994. 37(3-4):150-158
10. Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol.* 1997; 78 (5):1095-1101.
11. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(3):252-258.
12. Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol Res.* 1998;10(10):523-531.
13. Okamoto A, Woodworth CD, Yen K, Chung J, Isonishi S, Nikaido T, Kiyokawa T, Seo H, Kitahara Y, Ochiai K, Tanaka T. Combination therapy with podophyllin and vidarabine for human papillomavirus positive cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol Rep.* 1999; 6(2):269-276.
14. Kim KY, Blatt L, Taylor MW. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. *J Gen Virol.* 2000; 81(3):695-700.
15. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine.* 2005; 23(17-18):2388-2394

16. Hatfield R, Vermerris W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol.* 2001; 126(4):1351-1357
17. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond).* 2003; 91 Spec No:179-194.
18. Sorimachi K, Watanabe K, Yamazaki S, Yasumura Y. Inhibition of fibroblast growth by polyanions; effects of dextran sulfate and lignin derivatives. *Cell Biol Int Rep.* 1992; 16(1):63-71.
19. Susuki, H. Tochikura, KI. Yamazaki, S. Yamamoto, N. Toda, S. Lignosulfonate, a water-solubilized lignin from the waste liquor of the pulping process, inhibits the infectivity and citopathic effects of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53(12): 3369-3372.
20. Labaj J, Slamenova D, Kosikova B. Reduction of genotoxic effects of the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by dietary lignin in mammalian cells cultured *in vitro*. *Nutr Cancer.* 2003; 47(1):95-103
21. Sakagami H, Hashimoto K, Suzuki F, Ogiwara T, Satoh K, Ito H, Hatano T, Takashi Y, Fujisawa S. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry.* 2005; 66(17):2108-2120.
22. Harada H, Sakagami H, Konno K, Sato T, Osawa N, Fujimaki M, Komatsu N. Induction of antimicrobial activity by antitumor substances from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *Anticancer Res.* 1988; 8(4):581-587
23. Hanaoka, A., Sakagami, H., Konno, K. Pine cone antitumor substances stimulate cytotoxic factor production in young mice, but not in aged or tumor-bearing mice. *Showa Univ. J. Med. Sci.* 1989; 1:57-63
24. Jiang Y, Satoh K, Aratsu C, Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Kikuchi H, Nishikawa H, Ochiai K, Sakagami H. Combination effect of lignin F and natural products. *Anticancer Res.* 2001; 21(2A):965-970..
25. Sakagami H, Asano K, Yoshida T, Kawazoe Y. Organ distribution and toxicity of lignin. *In Vivo.* 1999; 13(1):41-44.
26. Nakashima H, Murakami T, Yamamoto N, Naoe T, Kawazoe Y, Konno K, Sakagami H. Lignified materials as medicinal resources. V. Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of some synthetic lignins. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1992; 40(8):2102-2105.
27. Lai PK, Donovan J, Takayama H, Sakagami H, Tanaka A, Konno K, Nonoyama M. Modification of human immunodeficiency viral replication by pine cone extracts. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990; 6(2):205-217.
28. Nagata K, Sakagami H, Harada H, Nonoyama M, Ishihama A, Konno K. Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances. *Antiviral Res.* 1990; 13(1):11-21.
29. Sakagami H, Takeda M, Kawazoe Y, Nagata K, Ishihama A, Ueda M, Yamazaki S. Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *In Vivo.* 1992; 6(5):491-495.
30. Harada H, Sakagami H, Nagata K, Oh-hara T, Kawazoe Y, Ishihama A, Hata N, Misawa Y, Terada H, Konno K. Possible involvement of lignin structure in anti-influenza virus activity. *Antiviral Res.* 1991; 15(1):41-49.

31. Mukoyama A, Ushijima H, Nishimura S, Koike H, Toda M, Hara Y, Shimamura T. Inhibition of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. *Jpn J Med Sci Biol.* 1991; 44(4):181-186.
32. Comunicación verbal de la compañía Oculus Innovative Sciences. [www.oculusis.com](http://www.oculusis.com)
33. [www.atcc.com](http://www.atcc.com)
34. [www.kegg.com](http://www.kegg.com)
35. Porter LA, Cukier IH, Lee JM. Nuclear localization of cyclin B1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Blood.* 2003; 101(5):1928-1933.
36. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Prog Cell Cycle Res.* 2003; 5:295-300.
37. Sperelakis. *Cell Physiology Source Book.* 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press. 1998. Cap 68.
38. Salvatore C, Camarda G, Maggi CA, Goso C, Manzini S, Binaschi M. NF-kappaB activation contributes to anthracycline resistance pathway in human ovarian carcinoma cell line A2780. *Int J Oncol.* 2005; 27(3):799-806.
39. Hougardy BM, van der Zee AG, van den Heuvel FA, Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. *Gynecol Oncol.* 2005; 97(2):353-364.
40. Saxena A, Yashar C, Taylor DD, Gercel-Taylor C. Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(5):1399-1403.
41. Kawabe, T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(4):513-519.
42. Yang J, Song H, Walsh S, Bardes ES, Kornbluth S. Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites. *J Biol Chem.* 2001; 276(5):3604-3609.
43. Jin P, Hardy S, Morgan DO. Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J Cell Biol.* 1998; 141(4):875-885.
44. Ohashi A, Minami N, Imai H. Nuclear accumulation of cyclin B1 in mouse two-cell embryos is controlled by the activation of Cdc2. *Biol Reprod.* 2001; 65(4):1195-1200.
45. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997; 185(8):1481-1486.
46. Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9(8):818-831.
47. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(15):5454-5468.
48. Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, Gabrielson E, Garcia JG, Geoghegan J, Germino G, Griffin C, Hilmer SC, Hoffman E,

- Jedlicka AE, Kawasaki E, Martinez-Murillo F, Morsberger L, Lee H, Petersen D, Quackenbush J, Scott A, Wilson M, Yang Y, Ye SQ, Yu W. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods*. 2005; 2(5):345-350
49. Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(1):83-89.
50. Kaubisch A, Schwartz GK. Cyclin-dependent kinase and protein kinase C inhibitors: a novel class of antineoplastic agents in clinical development. *Cancer J*. 2000; 6(4):192-212.
51. Kawabe T, Suganuma M, Ando T, Kimura M, Hori H, Okamoto T. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene*. 2002; 21(11):1717-1726.
52. Abraham, RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*. 2001; 15(17):2177-2196.
53. Ridley, AJ. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*. 1995; 5(1):24-30.
54. Halloran PJ, Fenton RG. Irreversible G2-M arrest and cytoskeletal reorganization induced by cytotoxic nucleoside analogues. *Cancer Res*. 1998; 58(17):3855-3865.
55. Wei Q, Adelstein RS. Pitx2a expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(2):683-697.
56. Franke Y, Peoples RJ, Francke U. Identification of GTF2IRD1, a putative transcription factor within the Williams-Beuren syndrome deletion at 7q11.23. *Cytogenet Cell Genet*. 1999; 86(3-4):296-304.
57. Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, Psutka J. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol Res*. 2004; 53(3):335-342.

**ANEXO I**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**Ciclo celular HeLa**

Descriptive Statistics					
Y Variable	Group	Mean	Std Dev.	Std Err	N
G0/G1	Control	54.077	2.690	1.553	3
	SSI	61.977	5.560	3.210	3
	L3 1.25%	55.220	2.493	1.439	3
	L3 6.25%	38.013	1.530	0.883	3
	L3 12.5%	8.753	1.264	0.730	3
	L3 18.75%	4.180	1.316	0.760	3
	L3 25%	10.390	0.541	0.312	3
	Eto	4.990	2.571	1.484	3
	S	Control	28.750	0.920	0.531
SSI		19.783	3.384	1.954	3
L3 1.25%		26.067	0.835	0.482	3
L3 6.25%		17.677	6.106	3.525	3
L3 12.5%		0.360	0.624	0.360	3
L3 18.75%		3.967	2.456	1.418	3
L3 25%		5.193	5.210	3.008	3
Eto		43.050	14.424	8.327	3
G2/M		Control	17.177	1.908	1.102
	SSI	18.237	2.310	1.334	3
	L3 1.25%	18.713	3.012	1.739	3
	L3 6.25%	44.307	7.628	4.404	3
	L3 12.5%	90.887	1.011	0.584	3
	L3 18.75%	91.850	1.247	0.720	3
	L3 25%	84.417	4.676	2.700	3
	Eto	51.960	11.857	6.846	3

Post Hoc tests for Factor = Variable Test Tukey						
Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
G0/G1	Control	SSI	-7.900	1.540	5.129	0.037
		L3 1.25%	-1.143	1.540	0.742	0.999
		L3 6.25%	16.063	1.540	10.429	0.000
		L3 12.5%	45.323	1.540	29.426	0.000

Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
		L3 18.75%	49.897	1.540	32.395	0.000
		L3 25%	43.687	1.540	28.363	0.000
		Eto	49.087	1.540	31.869	0.000
	SSI	L3 1.25%	6.757	1.540	4.387	0.097
		L3 6.25%	23.963	1.540	15.558	0.000
		L3 12.5%	53.223	1.540	34.555	0.000
		L3 18.75%	57.797	1.540	37.524	0.000
		L3 25%	51.587	1.540	33.492	0.000
		Eto	56.987	1.540	36.998	0.000
	L3 1.25%	L3 6.25%	17.207	1.540	11.171	0.000
		L3 12.5%	46.467	1.540	30.168	0.000
		L3 18.75%	51.040	1.540	33.137	0.000
		L3 25%	44.830	1.540	29.106	0.000
		Eto	50.230	1.540	32.612	0.000
	L3 6.25%	L3 12.5%	29.260	1.540	18.997	0.000
		L3 18.75%	33.833	1.540	21.966	0.000
		L3 25%	27.623	1.540	17.934	0.000
		Eto	33.023	1.540	21.440	0.000
	L3 12.5%	L3 18.75%	4.573	1.540	2.969	0.454
		L3 25%	-1.637	1.540	1.063	0.994
		Eto	3.763	1.540	2.443	0.671
	L3 18.75%	L3 25%	-6.210	1.540	4.032	0.149
		Eto	-0.810	1.540	0.526	1.000
	L3 25%	Eto	5.400	1.540	3.506	0.271
S	Control	SSI	8.967	3.487	2.571	0.618
		L3 1.25%	2.683	3.487	0.769	0.999
		L3 6.25%	11.073	3.487	3.175	0.377
		L3 12.5%	28.390	3.487	8.141	0.001
		L3 18.75%	24.783	3.487	7.107	0.002
		L3 25%	23.557	3.487	6.755	0.004
		Eto	-14.300	3.487	4.100	0.138
	SSI	L3 1.25%	-6.283	3.487	1.802	0.896
		L3 6.25%	2.107	3.487	0.604	1.000
		L3 12.5%	19.423	3.487	5.570	0.020
		L3 18.75%	15.817	3.487	4.535	0.080
		L3 25%	14.590	3.487	4.184	0.124
		Eto	-23.267	3.487	6.672	0.004

Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
	L3 1.25%	L3 6.25%	8.390	3.487	2.406	0.687
		L3 12.5%	25.707	3.487	7.371	0.002
		L3 18.75%	22.100	3.487	6.337	0.007
		L3 25%	20.873	3.487	5.985	0.011
		Eto	-16.983	3.487	4.870	0.052
	L3 6.25%	L3 12.5%	17.317	3.487	4.965	0.046
		L3 18.75%	13.710	3.487	3.931	0.168
		L3 25%	12.483	3.487	3.580	0.250
		Eto	-25.373	3.487	7.276	0.002
	L3 12.5%	L3 18.75%	-3.607	3.487	1.034	0.994
		L3 25%	-4.833	3.487	1.386	0.971
		Eto	-42.690	3.487	12.241	0.000
	L3 18.75%	L3 25%	-1.227	3.487	0.352	1.000
		Eto	-39.083	3.487	11.207	0.000
	L3 25%	Eto	-37.857	3.487	10.855	0.000
G2/M	Control	SSI	-1.060	3.171	0.334	1.000
		L3 1.25%	-1.537	3.171	0.485	1.000
		L3 6.25%	-27.130	3.171	8.556	0.000
		L3 12.5%	-73.710	3.171	23.247	0.000
		L3 18.75%	-74.673	3.171	23.551	0.000
		L3 25%	-67.240	3.171	21.206	0.000
		Eto	-34.783	3.171	10.970	0.000
	SSI	L3 1.25%	-0.477	3.171	0.150	1.000
		L3 6.25%	-26.070	3.171	8.222	0.001
		L3 12.5%	-72.650	3.171	22.913	0.000
		L3 18.75%	-73.613	3.171	23.216	0.000
		L3 25%	-66.180	3.171	20.872	0.000
		Eto	-33.723	3.171	10.636	0.000
	L3 1.25%	L3 6.25%	-25.593	3.171	8.072	0.001
		L3 12.5%	-72.173	3.171	22.762	0.000
		L3 18.75%	-73.137	3.171	23.066	0.000
		L3 25%	-65.703	3.171	20.722	0.000
		Eto	-33.247	3.171	10.485	0.000
	L3 6.25%	L3 12.5%	-46.580	3.171	14.691	0.000
		L3 18.75%	-47.543	3.171	14.994	0.000
		L3 25%	-40.110	3.171	12.650	0.000
		Eto	-7.653	3.171	2.414	0.684

Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
	L3 12.5%	L3 18.75%	-0.963	3.171	0.304	1.000
		L3 25%	6.470	3.171	2.041	0.825
		Eto	38.927	3.171	12.277	0.000
	L3 18.75%	L3 25%	7.433	3.171	2.344	0.712
		Eto	39.890	3.171	12.581	0.000
	L3 25%	Eto	32.457	3.171	10.236	0.000

### Ciclo celular Fibroblastos

Descriptive Statistics					
Y Variable	Group	Mean	Std Dev.	Std Err	N
G0/G1	Control	91.300	0.461	0.266	3
	SSI	90.140	1.097	0.633	3
	L3 1.25%	92.987	0.472	0.272	3
	L3 6.25%	88.990	0.580	0.335	3
	L3 12.5%	82.650	0.165	0.095	3
	L3 18.75%	83.437	1.118	0.645	3
	L3 25%	80.440	1.084	0.626	3
	ETO	72.817	4.735	2.734	3
S	Control	2.667	0.357	0.206	3
	SSI	4.157	0.932	0.538	3
	L3 1.25%	2.377	0.738	0.426	3
	L3 6.25%	4.023	1.208	0.697	3
	L3 12.5%	2.553	0.389	0.225	3
	L3 18.75%	2.793	0.582	0.336	3
	L3 25%	4.210	0.306	0.177	3
	ETO	19.687	4.484	2.589	3
G2/M	Control	6.033	0.159	0.092	3
	SSI	5.703	0.166	0.096	3
	L3 1.25%	4.640	0.427	0.246	3
	L3 6.25%	6.990	0.841	0.485	3
	L3 12.5%	14.797	0.266	0.153	3
	L3 18.75%	13.770	1.209	0.698	3
	L3 25%	15.350	1.005	0.580	3
	ETO	7.490	0.265	0.153	3

Post Hoc tests for Factor = Variable Test Tukey							
Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.	
G0/G1	Control	SSI	1.160	1.058	1.097	0.992	
		L3 1.25%	-1.687	1.058	1.595	0.941	
		L3 6.25%	2.310	1.058	2.184	0.774	
		L3 12.5%	8.650	1.058	8.178	0.001	
		L3 18.75%	7.863	1.058	7.434	0.002	
		L3 25%	10.860	1.058	10.267	0.000	
	SSI	ETO	18.483	1.058	17.475	0.000	
		L3 1.25%	-2.847	1.058	2.691	0.568	
		L3 6.25%	1.150	1.058	1.087	0.993	
		L3 12.5%	7.490	1.058	7.081	0.003	
		L3 18.75%	6.703	1.058	6.338	0.007	
		L3 25%	9.700	1.058	9.171	0.000	
	L3 1.25%	ETO	17.323	1.058	16.378	0.000	
		L3 6.25%	3.997	1.058	3.779	0.201	
		L3 12.5%	10.337	1.058	9.773	0.000	
		L3 18.75%	9.550	1.058	9.029	0.000	
		L3 25%	12.547	1.058	11.862	0.000	
		ETO	20.170	1.058	19.069	0.000	
	L3 6.25%	L3 12.5%	6.340	1.058	5.994	0.011	
		L3 18.75%	5.553	1.058	5.250	0.031	
		L3 25%	8.550	1.058	8.083	0.001	
		ETO	16.173	1.058	15.291	0.000	
		L3 12.5%	L3 18.75%	-0.787	1.058	0.744	0.999
		L3 25%	2.210	1.058	2.089	0.808	
	L3 18.75%	ETO	9.833	1.058	9.297	0.000	
		L3 25%	2.997	1.058	2.833	0.509	
		ETO	10.620	1.058	10.041	0.000	
L3 25%		ETO	7.623	1.058	7.207	0.002	
S	Control	SSI	-1.490	0.993	1.500	0.956	
		L3 1.25%	0.290	0.993	0.292	1.000	
		L3 6.25%	-1.357	0.993	1.366	0.973	
		L3 12.5%	0.113	0.993	0.114	1.000	
		L3 18.75%	-0.127	0.993	0.127	1.000	
		L3 25%	-1.543	0.993	1.553	0.948	
	SSI	ETO	-17.020	0.993	17.132	0.000	
		L3 1.25%	1.780	0.993	1.792	0.898	
		L3 6.25%	0.133	0.993	0.134	1.000	
		L3 12.5%	1.603	0.993	1.614	0.937	
		L3 18.75%	1.363	0.993	1.372	0.973	
		L3 25%	-0.053	0.993	0.054	1.000	

Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
		ETO	-15.530	0.993	15.632	0.000
	L3 1.25%	L3 6.25%	-1.647	0.993	1.657	0.929
		L3 12.5%	-0.177	0.993	0.178	1.000
		L3 18.75%	-0.417	0.993	0.419	1.000
		L3 25%	-1.833	0.993	1.845	0.884
		ETO	-17.310	0.993	17.424	0.000
	L3 6.25%	L3 12.5%	1.470	0.993	1.480	0.959
		L3 18.75%	1.230	0.993	1.238	0.984
		L3 25%	-0.187	0.993	0.188	1.000
		ETO	-15.663	0.993	15.766	0.000
	L3 12.5%	L3 18.75%	-0.240	0.993	0.242	1.000
		L3 25%	-1.657	0.993	1.668	0.927
		ETO	-17.133	0.993	17.246	0.000
	L3 18.75%	L3 25%	-1.417	0.993	1.426	0.966
		ETO	-16.893	0.993	17.004	0.000
	L3 25%	ETO	-15.477	0.993	15.578	0.000
G2/M	Control	SSI	0.330	0.385	0.857	0.998
		L3 1.25%	1.393	0.385	3.620	0.239
		L3 6.25%	-0.957	0.385	2.486	0.654
		L3 12.5%	-8.763	0.385	22.769	0.000
		L3 18.75%	-7.737	0.385	20.101	0.000
		L3 25%	-9.317	0.385	24.206	0.000
		ETO	-1.457	0.385	3.785	0.199
	SSI	L3 1.25%	1.063	0.385	2.763	0.538
		L3 6.25%	-1.287	0.385	3.343	0.320
		L3 12.5%	-9.093	0.385	23.626	0.000
		L3 18.75%	-8.067	0.385	20.959	0.000
		L3 25%	-9.647	0.385	25.064	0.000
		ETO	-1.787	0.385	4.642	0.070
	L3 1.25%	L3 6.25%	-2.350	0.385	6.106	0.010
		L3 12.5%	-10.157	0.385	26.389	0.000
		L3 18.75%	-9.130	0.385	23.721	0.000
		L3 25%	-10.710	0.385	27.826	0.000
		ETO	-2.850	0.385	7.405	0.002
	L3 6.25%	L3 12.5%	-7.807	0.385	20.283	0.000
		L3 18.75%	-6.780	0.385	17.616	0.000
		L3 25%	-8.360	0.385	21.721	0.000
		ETO	-0.500	0.385	1.299	0.980
	L3 12.5%	L3 18.75%	1.027	0.385	2.667	0.578
		L3 25%	-0.553	0.385	1.438	0.965
		ETO	7.307	0.385	18.984	0.000

Y Variable	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
	L3 18.75%	L3 25%	-1.580	0.385	4.105	0.137
		ETO	6.280	0.385	16.317	0.000
	L3 25%	ETO	7.860	0.385	20.422	0.000

### Liberación de LDH

Post Hoc tests for Factor = Tiempo						
Test	Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
Tukey	Control	T = 0	-108.8558	17.0033	6.4021	0.0285
		T = 24h	-266.2781	17.0033	15.6604	0.0003
		T = 48h	-388.5316	17.0033	22.8504	0.0000
		T = 72h	-625.5024	17.0033	36.7872	0.0000
	T = 0	T = 24h	-157.4223	17.0033	9.2584	0.0047
		T = 48h	-279.6758	17.0033	16.4483	0.0002
		T = 72h	-516.6466	17.0033	30.3851	0.0000
	T = 24h	T = 48h	-122.2535	17.0033	7.1900	0.0166
		T = 72h	-359.2243	17.0033	21.1268	0.0000
	T = 48h	T = 72h	-236.9708	17.0033	13.9368	0.0005

## Anexo II

### Lista de genes sobreexpresados

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM_013422	ARHGAP6	32.8880194	121.024523	3.679897
NM_021784	FOXA2	43.35047461	157.0975605	3.623895
NM_014782	ARMCX2	29.09266668	103.3767321	3.55336
NM_001031	RPS28	89.51895703	287.1166154	3.207328
NM_000913	OPRL1	18.30041856	56.24357039	3.073349
NM_012467	TPSG1	76.02641309	232.6246671	3.059787
NM_000076	CDKN1C	43.80018699	131.6955976	3.006736
NM_018509	PRO1855	18.28930457	50.95726745	2.786179
NM_004907	IER2	49.06758171	132.8506819	2.707504
X79563	RPS21	57.15255997	147.8189456	2.586392
XM_004628		115.8373388	297.6517597	2.569567
NM_004054	C3AR1	246.5306819	627.7072986	2.546163
NM_006236	POU3F3	67.45943071	170.0995371	2.521509
NM_001021	RPS17	67.32938879	168.5344487	2.503134
NM_002032	FTH1	155.7074691	389.7479512	2.503078
NM_000984	RPL23A	51.93499568	129.924498	2.501675
NM_000988	RPL27	48.67746628	121.6887528	2.499899
NM_001022	RPS19	66.65794116	166.5703393	2.498882
NM_018478	C20orf35	42.20136053	105.192459	2.492632
NM_033301	RPL8	38.74385478	95.77402436	2.47198
NM_024992		11.74074082	28.55798147	2.432383
NM_019554	S100A4	48.88674744	117.8166952	2.409993
NM_002988	CCL18	104.9309465	250.5112187	2.387391
NM_001501	GNRH2	891.6077288	2121.288286	2.379172
NM_004295	TRAF4	20.6328794	48.91078024	2.370526
NM_005539	INPP5A	22.46431224	52.7585332	2.348549
NM_002487	NDN	34.00716055	79.68991138	2.343327
NM_004096	EIF4EBP2	33.0547749	77.16871573	2.334571
NM_005286	GPR8	112.3117924	261.665511	2.329813
NM_000915	OXT	49.3263344	114.7156165	2.325646
NM_001540	HSPB1	44.70552837	103.9381263	2.32495
NM_016176	Cab45	36.4163368	83.92753324	2.304667
NM_003793	CTSF	21.66125041	49.79430813	2.298773

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM 002244		84.05487123	192.904373	2.294981
NM 005884	PAK4	19.54898731	44.83100459	2.293265
XM 060006		172.9532072	393.5999959	2.27576
NM 020979	APS	14.98645193	34.05210523	2.272193
NM 080566		88.61834283	198.5009091	2.239953
NM 020673	RAB22A	22.37409612	49.99787983	2.234632
NM 012121	CDC42EP4	46.92093269	104.7698009	2.232901
NM 005617	RPS14	42.52203116	94.9169593	2.232183
NM 003224	ARFRP1	15.5552955	34.67875375	2.229386
NM 002147	HOXB5	47.78550714	106.5196523	2.22912
NM 001934	DLX4	93.41135497	207.7888757	2.22445
NM 022551	B3GALT4	103.1682792	228.544059	2.215255
NM 002246	KCNK3	25.48504303	56.42317116	2.213972
NM 006042	HS3ST3A1	99.98581198	221.0826706	2.21114
NM 017726	PPP1R14D	48.14611095	105.4703787	2.190631
NM 001871	CPB1	11.9033979	26.03909913	2.187535
mwghuman20K#5417 hk1		19.15125444	41.80217643	2.182738
NM 017774	CDKAL1	50.90612619	111.0251036	2.180977
NM 004168	SDHA	83.87844853	182.7988203	2.17933
NM 020158	EXOSC5	9.80067268	21.31968881	2.175329
NM 014637	CHPPR	34.02976044	73.89896932	2.171598
NM 014947		33.46010704	71.90842536	2.149079
NM 006563	KLF1	102.3126881	219.7788362	2.148109
NM 001932	MPP3	25.03524737	53.69740243	2.144872
NM 014035	SNX24	20.20381009	43.09284974	2.132907
NM 021077	NMB	120.9556212	257.9374797	2.132497
NM 006509	RELB	129.2464946	275.0001605	2.127719
XM 018287		127.025647	268.6499749	2.114927
NM 022083	C1orf24	27.65930266	58.04944993	2.098732
NM 007275	TUSC2	19.85767107	41.58953229	2.094381
NM 005086	SSPN	30.58130234	63.97565733	2.091986
NM 018458		102.5888314	214.507744	2.090946
NM 001320	CSNK2B	22.14288013	46.24639723	2.088545
NM 016011	CGI-63	10.79593076	22.49316894	2.083486
NM 001017	RPS13	30.02656137	62.4122998	2.07857
NM 018143	KLHL11	26.72193479	55.4241303	2.074106

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM_021827		71.6501858	148.361027	2.07063
NM_001407	<u>CELSR3</u>	14.21285237	29.40970806	2.069233
NM_018953	<u>HOXC6</u>	62.38194216	128.8928869	2.066189
NM_002996	<u>CX3CL1</u>	66.34983748	136.8335043	2.062304
NM_020552	<u>TCL6</u>	12.98083755	26.75848045	2.061383
NM_016202	<u>ZNF580</u>	40.73468978	83.96424074	2.061247
NM_000976	<u>RPL12</u>	71.42091197	146.727332	2.054403
NM_032011	<u>PCDHGC3</u>	82.99048969	169.6568677	2.044293
NM_018250	<u>FLJ10871</u>	14.84162591	30.25187096	2.038312
NM_058196		16.80689721	34.2420634	2.037382
NM_002273	<u>KRT8</u>	15.54228829	31.66456769	2.037317
NM_014370	<u>STK23</u>	14.62954155	29.79408547	2.03657
NM_003093	<u>SNRPC</u>	28.81721147	58.61765541	2.03412
XM_071938		151.1363123	306.1756848	2.025825
humrp10a1#2-r1		40.02995421	81.01418736	2.023839
NM_001015	<u>RPS11</u>	70.68861225	142.5829131	2.017056
NM_004317	<u>ASNA1</u>	17.04764183	34.29365403	2.011636
NM_012175		46.83390378	94.13686034	2.010015
NM_000666	<u>ACY1</u>	25.04089129	50.23279058	2.00603
D13897_2		41.61265967	83.46594448	2.005782
NM_006387	<u>CHERP</u>	80.30674842	160.828	2.002671
NM_015493	<u>ANKRD25</u>	26.31067769	52.54941778	1.997266
NM_002496	<u>NDUFS8</u>	27.72312269	55.21687641	1.991726
NM_003610	<u>RAE1</u>	150.9181239	300.2649043	1.989588
XM_016979		12.61606492	25.07776527	1.987764
NM_002566	<u>P2RY11</u>	190.4533278	378.2122227	1.985853
NM_006789	<u>APOBEC2</u>	128.3009398	254.1371243	1.980789
NM_007056	<u>SFRS16</u>	153.5176196	303.7971351	1.978907
NM_022773	<u>FLJ12681</u>	42.32737612	83.63655124	1.975945
NM_004418	<u>DUSP2</u>	15.67502202	30.79256159	1.964435
NM_001523	<u>HAS1</u>	76.10349497	149.2838997	1.961591
NM_000054	<u>AVPR2</u>	22.25803708	43.61540556	1.959535
XM_011673		134.3419481	262.5180848	1.954104
NM_012068	<u>ATF5</u>	21.67831091	42.34866022	1.953504
NM_013246	<u>CLC</u>	26.11004348	50.84485131	1.947329
NM_000407	<u>GP1BB</u>	18.86442256	36.73512037	1.947323

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM_001020	RPS16	119.6095504	232.8100379	1.946417
NM_014489	FRAG1	48.10758467	93.49954231	1.943551
NM_021075	NDUFV3	32.54708654	63.21597658	1.942293
NM_012324	MAPK8IP2	29.18286649	56.60461762	1.939652
NM_004223	UBE2L6	82.97534978	160.9409975	1.939624
NM_004107	FCGRT	10.11218062	19.57091632	1.93538
NM_016173	HEMK	25.11891905	48.49770106	1.930724
NM_018329		19.86873335	38.31292922	1.928303
NM_013324	CISH	15.74341857	30.31916762	1.925831
XM_056112		39.15351659	75.30040723	1.923209
NM_006456	SIAT7B	27.65834277	53.10321106	1.919971
NM_002905	RDH5	20.30619114	38.98637956	1.919926
NM_005022	PFN1	60.33148833	115.8272317	1.919847
NM_020435	GJA12	16.65273003	31.89716023	1.915431
NM_012323	MAFF	53.59371251	102.573269	1.913905
AF116704		1104.856997	2109.224115	1.909047
NM_002494	NDUFC1	101.4898172	193.4550741	1.906153
NM_016026	RDH11	89.11396286	169.8305638	1.905768
NM_012445	SPON2	9.907265663	18.8663867	1.904298
NM_000152	GAA	28.2896738	53.78557569	1.901244
BC015202	FLJ13111	14.22924943	27.03108378	1.899684
NM_000025	ADR3	266.6701025	506.5684509	1.899607
NM_016149		27.56427161	52.29494409	1.8972
NM_006013	RPL10	66.23268219	125.583174	1.896091
NM_003811	TNFSF9	27.04752783	51.26924555	1.895524
NM_016837		24.23419609	45.92754994	1.895155
XM_069860		64.59149402	122.3405336	1.894066
NM_001522	GUCY2F	43.10102598	81.54273512	1.891898
NM_000994	RPL32	35.70101486	67.53907647	1.891797
NM_013259	NP25	18.33843125	34.67368793	1.890766
NM_001194	HCN2	24.09803619	45.53167408	1.889435
NM_000201	ICAM1	569.31595	1074.308695	1.887017
NM_005809	PRDX2	44.18915743	83.35197759	1.886254
NM_002163	ICSBP1	17.99842019	33.93425755	1.885402
NM_006623	PHGDH	61.68268052	116.2423877	1.884522
NM_018926	PCDHGC3	45.21832239	84.8118934	1.875609

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM_015908	ARS2	18.61351231	34.88688322	1.874277
NM_006979	SLC39A7	19.3850255	36.32725719	1.873986
NM_002121	HLA-DPB1	130.7398169	244.9290641	1.873408
NM_018404	CENTA2	191.5194347	358.7550941	1.873205
NM_005794	DHRS2	26.20021678	49.05851684	1.872447
NM_002153	HSD17B2	53.38536254	99.92631179	1.871792
NM_007205	TREX2	167.0524326	312.473705	1.870513
NM_022044	SDF2L1	16.23314564	30.32857884	1.868312
NM_016415		537.6986039	1004.571423	1.86828
NM_003160	AURKC	93.06285076	173.099209	1.860025
NM_002434	MPG	34.89557849	64.73642172	1.855147
NM_005556	KRT7	59.19455295	109.5793889	1.851174
humtubak1#1-r1		112.5928905	208.260335	1.849676
NM_003240	EBAF	203.6928274	376.6730382	1.849221
NM_003507	FZD7	344.7608015	636.9569387	1.847533
NM_005258	GCHFR	22.02249512	40.61773846	1.844375
NM_022042	SLC26A1	12.77619374	23.55178547	1.843412
NM_002133	HMOX1	14.39289155	26.49489558	1.840832
NM_001689	ATP5G3	12.94245239	23.77948782	1.837325
NM_003355	UCP2	11.6744571	21.41492359	1.83434
NM_012079	DGAT1	15.10471543	27.65650537	1.830985
NM_006035	CDC42BPB	571.6551716	1043.489739	1.825383
NM_022834	WARP	42.6157078	77.72715847	1.823909
NM_001481	C16orf3	39.36555683	71.50646381	1.816473
NM_020309	SLC17A7	143.0397786	259.7204582	1.815722
NM_004165	RRAD	40.61752367	73.72994676	1.815225
NM_006396	MTVR1	75.55784148	137.1092532	1.814626
XM_009877		167.9650067	304.0693695	1.810314
NM_023075	MPPE1	20.49258947	37.09362813	1.8101
NM_020421	ADCK1	66.48726038	120.0015696	1.804881
NM_003087	SNCG	43.5901854	78.66338133	1.804612
NM_018936	PCDHB2	14.0206482	25.27841996	1.802942
NM_001759	CCND2	49.68194513	89.50159076	1.801491
NM_002590	PCDH8	24.54477272	44.1718973	1.799646
NM_004210	NEURL	822.9940323	1479.808409	1.798079
NM_000992	RPL29	104.010603	186.9021969	1.796953

NM 024748		44.35031365	79.67055458	1.796392
NM 003498	SNN	13.70174555	24.58225671	1.794097
NM 007037	ADAMTS8	26.89240564	48.18825155	1.791891
NM 006547	IMP-3	33.48563029	59.99136564	1.791556
NM 014694	KIAA0605	19.82084563	35.50454732	1.791273
NM 012126	CHST5	108.1315542	193.6080801	1.790486
NM 014643		66.2336454	118.5176387	1.789387
NM 018600		83.97439848	149.5499862	1.7809
NM 017659	FLJ20084	66.53925218	118.174322	1.776009
NM 002984	CCL4	233.3169837	414.3666655	1.775982
NM 000979	RPL18	23.97292379	42.54127587	1.774555
NM 005922	MAP3K4	182.3376858	323.4648835	1.773988
AK027130	C19orf33	56.72007536	100.6031469	1.773678
NM 003254	TIMP1	44.08869951	77.93331305	1.767648
NM 001829	CLCN3	69.06771429	122.0535744	1.767158
NM 017874	C20orf27	43.7102629	77.14142948	1.764836
NM 001673	ASNS	29.16820906	51.41011966	1.762539
NM 001639	APCS	57.51465169	101.3688281	1.762487
NM 001450	FHL2	12.60558005	22.17940822	1.759491
AB030648	FGF20	29.26889562	51.46802696	1.758455
NM 025069	FLJ14299	250.4973918	440.1145997	1.756963
NM 000526	KRT14	15.57611631	27.3570798	1.756348
NM 001669	ARSD	29.47630036	51.73394906	1.755103
NM 000978	RPL23	50.47245827	88.52007087	1.753829
NM 002046	GAPD	95.19123057	166.6659965	1.750855
NM 012456	TIMM10	120.6403661	211.1353653	1.750122
NM 021939	FKBP10	18.85383844	32.96733613	1.748574
NM 003946	NOL3	37.52242112	65.58927363	1.748002
NM 002904	RDBP	19.06894766	33.29542223	1.746055
NM 006883	SHOX	17.00150101	29.66850976	1.745052
NM 014606		53.097472	92.65021382	1.744908
NM 007171	POMT1	180.6149771	314.8194471	1.743042
NM 005116	SLC23A2	17.36874434	30.25033118	1.741653
NM 018173	FLJ10665	87.45086986	152.2884088	1.741417
NM 001678	ATP1B2	183.5079934	319.3854409	1.740444
NM 017706	FLJ20195	25.91820255	45.09392321	1.739855
NM 015559	SETBP1	108.4098576	188.5733373	1.739448
NM 017856	FLJ20514	24.81134251	43.15035849	1.739138

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM 021212	ZF	69.70643627	120.9092555	1.734549
NM 016328	GTF2IRD1	83.99804914	145.4805393	1.731951
NM 018228	C14orf115	26.10208798	45.17426963	1.730676
NM 057158	DUSP4	22.43254886	38.80891033	1.730027
NM 018161	NADSYN1	14.10642687	24.39896355	1.729635
NM 001703	BAI2	137.255615	237.0624644	1.72716
NM 006368	CREB3	24.49665605	42.29778369	1.726676
NM 003955	SOCS3	23.6183885	40.76813352	1.726118
NM 025236	RNF39	209.7461577	360.9113152	1.720705
NM 004723	ARHGEF2	75.91485078	130.5555185	1.719763
NM 014610	GANAB	187.2707364	321.8777395	1.718783
NM 000787	DBH	39.71077433	68.14755539	1.716097
NM 001011	RPS7	25.99044104	44.5853692	1.715453
NM 004927	MRPL49	13.07318941	22.37407394	1.711447
NM 014867		16.13759739	27.59156194	1.709769
NM 001997	FAU	31.57954342	53.98023099	1.709342
NM 001888	CRYM	14.81002449	25.28782942	1.707481
NM 014211	GABRP	28.42042982	48.49762092	1.706435
NM 002574	PRDX1	275.722431	470.4996536	1.706425
NM 000999	RPL38	42.12335001	71.82248755	1.705052
NM 005096	ZNF261	42.10610351	71.76553739	1.704397
AE006466 5		214.3579872	365.3433677	1.704361
NM 013349	SPUF	17.2868462	29.45209056	1.703728
NM 024644	C14orf169	19.7777532	33.62760696	1.700274
XM 030144		25.90173452	44.02573465	1.699721
NM 004323	BAG1	41.21919397	69.89110971	1.695596
NM 016140	CGI-38	114.9914044	194.9590146	1.695423
NM 014364	GAPDS	17.74599073	30.07873915	1.69496
NM 000790	DDC	121.977757	206.5718392	1.693521
NM 005321	HIST1H1E	349.6091821	591.9472614	1.693169
NM 016820	OGG1	18.22785231	30.83430746	1.691604
NM 000325	PITX2	39.97829549	67.62105124	1.691444
NM 014353	RAB26	10.60653712	17.93689	1.691117
NM 017728	FLJ20255	62.05339063	104.878105	1.690127

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Lista de genes silenciados

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
<a href="#">NM_005800</a>	<a href="#">C13orf22</a>	42.71201888	15.65395518	-2.72851
<a href="#">NM_020373</a>	<a href="#">TMEM16B</a>	63.46221058	25.26942325	-2.51142
<a href="#">NM_033656</a>	<a href="#">C21orf107</a>	169.5883021	67.56499834	-2.51
<a href="#">NM_016323</a>	<a href="#">HERC5</a>	99.92518886	42.0822429	-2.37452
<a href="#">NM_003927</a>	<a href="#">MBD2</a>	520.1363613	220.6344642	-2.35746
<a href="#">NM_016340</a>	<a href="#">RAPGEF6</a>	308.8336511	131.3882587	-2.35054
<a href="#">NM_018076</a>	<a href="#">ARMC4</a>	131.4118847	56.04292056	-2.34484
<a href="#">NM_012399</a>	<a href="#">PITPNB</a>	224.672293	96.26428242	-2.33391
<a href="#">NM_000306</a>	<a href="#">POU1F1</a>	88.5297849	37.97678822	-2.33116
<a href="#">NM_005925</a>	<a href="#">MEP1B</a>	54.98660251	23.78712854	-2.31161
<a href="#">NM_001775</a>	<a href="#">CD38</a>	159.1305877	69.14091727	-2.30154
<a href="#">NM_006379</a>	<a href="#">SEMA3C</a>	209.1222617	91.1589598	-2.29404
<a href="#">NM_018133</a>	<a href="#">FLJ10546</a>	66.44457616	28.96542288	-2.29393
<a href="#">NM_003675</a>	<a href="#">PRPF18</a>	212.0660275	93.63487305	-2.26482
<a href="#">NM_001819</a>	<a href="#">CHGB</a>	108.0588132	47.96350438	-2.25294
<a href="#">NM_018686</a>	<a href="#">CMAS</a>	174.318562	78.0850745	-2.23242
<a href="#">NM_014018</a>	<a href="#">MRPS28</a>	209.4364347	94.086718	-2.22599
<a href="#">NM_004844</a>	<a href="#">SH3BP5</a>	367.2239634	165.1377398	-2.22374
<a href="#">NM_003742</a>	<a href="#">ABCB11</a>	165.5199212	74.70718253	-2.21558
<a href="#">NM_000957</a>	<a href="#">PTGER3</a>	260.8110511	117.9476862	-2.21124
<a href="#">NM_016090</a>	<a href="#">RBM7</a>	619.8482028	280.343355	-2.21103
<a href="#">NM_006451</a>	<a href="#">PAIP1</a>	311.2864071	141.0257087	-2.2073
<a href="#">NM_014351</a>	<a href="#">SULT4A1</a>	401.9337897	184.5959805	-2.17737
<a href="#">NM_022476</a>	<a href="#">FTS</a>	175.9389344	80.85144176	-2.17608
<a href="#">NM_018844</a>	<a href="#">BCAP29</a>	118.6328611	54.57299722	-2.17384
<a href="#">NM_003410</a>	<a href="#">ZFX</a>	97.38254484	44.96080052	-2.16594
<a href="#">NM_006803</a>	<a href="#">AP3M2</a>	90.91156964	42.08359209	-2.16026
<a href="#">NM_017881</a>	<a href="#">C9orf95</a>	328.1135356	152.1230001	-2.1569
<a href="#">NM_004830</a>	<a href="#">CRSP3</a>	79.92411865	37.10233384	-2.15415
<a href="#">NM_016477</a>		118.373768	55.05765451	-2.15
<a href="#">NM_006540</a>	<a href="#">NCOA2</a>	128.4825227	59.8909602	-2.14527
<a href="#">NM_012408</a>	<a href="#">PRKCBP1</a>	597.5018216	279.7065879	-2.13617
<a href="#">NM_003592</a>	<a href="#">CUL1</a>	731.2201738	342.9877601	-2.13191
<a href="#">NM_005742</a>	<a href="#">TXNDC7</a>	238.128188	111.8688852	-2.12864

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM_002560	P2RX4	59.05067185	27.80836859	-2.12349
NM_000582	SPP1	131.5232967	61.95940401	-2.12273
BC000963	NGLY1	860.439519	406.6829927	-2.11575
NM_002296	LBR	112.4720471	53.70407608	-2.09429
NM_000751	CHRND	43.07989058	20.61037355	-2.0902
NM_000358	TGFBI	48.6539823	23.30038079	-2.08812
NM_012238	SIRT1	155.4394173	74.53879966	-2.08535
NM_001326	CSTF3	261.5295915	125.8624979	-2.0779
NM_000535	PMS2	294.7334711	142.433554	-2.06927
NM_017412	FZD3	159.2406557	76.99020426	-2.06832
NM_004788	UBE4A	171.175171	82.85432988	-2.06598
NM_001948	DUT	760.1789142	368.2283713	-2.06442
NM_024576	OGFRL1	243.649225	118.5053392	-2.05602
NM_000026	ADSL	97.66100325	47.82567232	-2.04202
NM_004768	SFRS11	227.2626126	111.3483498	-2.04101
NM_004693	K6HF	110.2304141	54.07557062	-2.03845
NM_004951	EBI2	109.3849623	53.80717923	-2.03291
NM_022133	SNX16	220.2707291	108.5511254	-2.02919
XM_011118		654.1365032	322.7305976	-2.02688
NM_018168	C14orf105	82.16978567	40.54485299	-2.02664
NM_016399	HSPC132	423.6996696	209.3847319	-2.02355
XM_013065		220.220646	109.0703719	-2.01907
NM_018410	DKFZp762E1312	79.33397356	39.46410849	-2.01028
NM_000161	GCH1	89.50916405	44.5396218	-2.00965
NM_001462	FPRL1	22.58697057	11.25312307	-2.00717
NM_018912	PCDHGC3	62.22408177	31.1020062	-2.00065
NM_018440	PAG	125.3952027	62.73275689	-1.99888
NM_025235	TNKS2	104.9763198	52.53005542	-1.9984
NM_015577	RAI14	84.60258573	42.33578493	-1.99837
NM_021998	ZNF6	358.0036415	179.3740491	-1.99585
NM_012108	BRDG1	149.0754313	74.8669381	-1.99121
NM_006541	TXNL2	405.4895186	204.5431517	-1.98242
NM_017680	ASPN	241.5762187	122.0427231	-1.97944
BC017212	PHF11	132.1870271	66.83049585	-1.97794
XM_029162		42.64029369	21.59686836	-1.97437
NM_017639		167.9994299	85.27607761	-1.97007

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM_014118		516.4143815	262.4436492	-1.96772
NM_032582	<u>USP32</u>	69.01155707	35.07865748	-1.96734
NM_022353	<u>OSGEPL1</u>	34.5093142	17.5484615	-1.96652
NM_013341	<u>PTD004</u>	62.56317239	31.95426782	-1.9579
NM_018471	<u>LEREPO4</u>	699.428701	358.0654134	-1.95335
NM_006980	<u>MTERF</u>	86.11163935	44.11205023	-1.95211
NM_006611	<u>KLRA1</u>	112.4847985	57.77573167	-1.94692
NM_017523	<u>HSXIAPAF1</u>	104.0103967	53.45506984	-1.94575
mwghuman20K#8615_hk1		265.2148526	136.3359304	-1.9453
NM_021004	<u>DHRS4</u>	113.2587497	58.264293	-1.94388
NM_003286	<u>TOP1</u>	103.2456789	53.16480015	-1.94199
NM_019000	<u>FLJ20152</u>	168.8832917	87.16098065	-1.9376
NM_002618	<u>PEX13</u>	75.37528315	38.98498793	-1.93344
NM_022461	<u>AZ2</u>	748.1352927	387.8735214	-1.92881
NM_000922	<u>PDE3B</u>	354.2643025	183.6715861	-1.92879
mwqaracontrol#002-07		29.96161742	15.53799434	-1.92828
NM_004982	<u>KCNJ8</u>	58.88705097	30.569903	-1.92631
NM_024894	<u>FLJ14075</u>	249.0332534	129.3464942	-1.92532
NM_002598	<u>PDCD2</u>	417.8630237	217.0538925	-1.92516
NM_004730	<u>ETF1</u>	110.9908717	57.65467584	-1.9251
NM_007007	<u>CPSF6</u>	252.9022707	131.6415036	-1.92114
NM_006467	<u>POLR3G</u>	112.2954974	58.47913873	-1.92027
NM_017897	<u>FLJ20604</u>	59.36110792	31.04818675	-1.9119
NM_006134	<u>C21orf4</u>	363.9457995	190.3645913	-1.91184
NM_022456	<u>RAB3IP</u>	116.8704821	61.19164084	-1.90991
NM_001990	<u>EYA3</u>	64.86473559	33.99540556	-1.90804
NM_014776	<u>GIT2</u>	151.3186519	79.32175536	-1.90766
NM_022765	<u>NICAL</u>	328.6484005	172.4641172	-1.9056
NM_021067		67.93930186	35.74398031	-1.90072
NM_013303		64.55277913	33.98993401	-1.89917
NM_002025	<u>FMR2</u>	90.78197519	47.84602059	-1.89738
NM_018224		339.49973	179.0374406	-1.89625
NM_002357	<u>MAD</u>	73.59243848	38.86733019	-1.89343
NM_000440	<u>PDE6A</u>	168.4731857	89.01996649	-1.89253
NM_014548	<u>TMOD2</u>	31.45638026	16.67551028	-1.88638
NM_006788	<u>RALBP1</u>	101.1290208	53.62468501	-1.88587

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM 007285	GABARAPL2	248.895998	132.5985292	-1.87706
NM 017775	FLJ20343	71.52241867	38.12152459	-1.87617
NM 021120	DLG3	47.25662481	25.19839756	-1.87538
NM 014814	p44S10	112.5401706	60.02038138	-1.87503
NM 016308	UMP-CMPK	410.0331952	218.8232217	-1.87381
NM 006466	POLR3F	37.88533151	20.25943187	-1.87001
NM 005536	IMPA1	45.49149579	24.39285963	-1.86495
NM 001627	ALCAM	136.8873338	73.4151384	-1.86457
NM 014914	CENTG2	147.9822666	79.38441321	-1.86412
NM 022474	MPP5	174.3651215	93.69462183	-1.86099
AK000364	CHD7	48.81170287	26.23225975	-1.86075
NM 024109	MGC2654	301.3872523	162.4182831	-1.85562
NM 006998	SCGN	79.38278647	42.84478441	-1.8528
NM 017548	H41	51.36388827	27.7380624	-1.85175
NM 017662	TRPM6	58.5821726	31.65102795	-1.85088
NM 002495	NDUFS4	28.79566532	15.56767041	-1.84971
NM 014666	ENTH	71.94983948	39.08191513	-1.841
XM 042940		766.2891922	416.2648244	-1.84087
NM 003290	TPM4	224.0323569	121.7336872	-1.84035
NM 005524	HES1	964.9883237	524.4440583	-1.84002
NM 014278	APG-1	161.4083986	87.75697866	-1.83927
NM 014333	IGSF4	265.8831239	144.6356662	-1.8383
NM 002072	GNAQ	91.61308737	49.84189428	-1.83807
NM 018313	PB1	41.23764459	22.4358485	-1.83802
NM 004290	RNF14	451.4443036	245.9674645	-1.83538
NM 000696	ALDH9A1	235.727256	128.5532902	-1.83369
XM 016170		293.2675289	160.2570508	-1.82998
NM 006010	ARMET	78.04954421	42.69807345	-1.82794
NM 006481	TCF2	22.3158547	12.22692316	-1.82514
NM 018547		53.59024073	29.36420301	-1.82502
NM 007212	RNF2	74.21894318	40.69827367	-1.82364
NM 005410	SEPP1	210.1783582	115.5289705	-1.81927
NM 006837	COP55	352.5463095	193.8838216	-1.81834
NM 014942		271.550788	149.4647948	-1.81682
NM 016622	MRPL35	154.0563601	84.83034039	-1.81605
NM 002670	PLS1	20.75380878	11.43925061	-1.81426

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM 003732	EIF4EBP3	124.4948164	68.62524438	-1.81413
NM 016487	C6orf203	200.237301	110.4880422	-1.8123
NM 015878	OAZIN	50.26376445	27.74906611	-1.81137
AL050296	IK	142.9675099	78.96469535	-1.81052
NM 022091	HELIC1	136.5353382	75.52021616	-1.80793
NM 001608	ACADL	43.56783092	24.10311033	-1.80756
NM 001877	CR2	27.30232198	15.11870308	-1.80586
NM 025126	RNF34	120.8348678	67.02515941	-1.80283
mwgaracontrol#002-04		36.42195817	20.22178785	-1.80112
NM 015677	SH3YL1	52.5745387	29.2059862	-1.80013
NM 006548	IMP-2	245.9115387	136.6167272	-1.80001
NM 022771	TBC1D15	945.0930904	525.8291243	-1.79734
NM 003676	DEGS	93.35036753	52.04799856	-1.79354
NM 015239	AGTPBP1	127.7702292	71.34982273	-1.79076
NM 001548	IFIT1	350.8823383	196.3973853	-1.78659
NM 024072	DDX54	137.9421639	77.25484541	-1.78555
NM 002180	IGHMBP2	68.01139877	38.09693759	-1.78522
NM 001231	PEA15	157.9837388	88.51635525	-1.7848
NM 014143	PDCD1LG1	277.7179204	155.822637	-1.78227
NM 025246	TMEM22	225.3667138	126.6860708	-1.77894
NM 019093	UGT1A10	93.58410108	52.73543336	-1.7746
AB023430	PTPNS1	721.4491176	406.9497619	-1.77282
NM 024535	FLJ22021	506.1366652	285.681004	-1.77168
NM 024855	ACTR5	642.367145	362.6588041	-1.77127
NM 002583	PAWR	623.4685651	352.0458491	-1.77099
NM 020390	EIF5A2	366.4235242	207.1085684	-1.76923
NM 053036	GPR74	359.49339	203.2043709	-1.76912
NM 006282	STK4	22.29177834	12.60769049	-1.76811
NM 024051	C7orf24	91.86554424	52.09334773	-1.76348
NM 006573	TNFSF13B	75.21561126	42.86094514	-1.75488
NM 021999	ITM2B	95.39453747	54.37618641	-1.75434
NM 004245	TGM5	74.12306551	42.26016575	-1.75397
mwgaracontrol#002-08		29.99719972	17.11350713	-1.75284
NM 016065	MRPS16	381.3495654	217.5640624	-1.75282
NM 000355	TCN2	148.4583464	84.80269944	-1.75063
NM 030666	SERPINB1	22.83215681	13.06925796	-1.74701

GB acc	Gene symbol	Control: (Intensity)	L3 12.5%: (Intensity)	Times of Change
NM 006245	PPP2R5D	454.1963428	260.6579998	-1.7425
NM 000629	IFNAR1	47.24436534	27.1582396	-1.7396
NM 017895	DDX27	258.0606145	148.4100221	-1.73884
NM 002789	PSMA4	151.7126709	87.30268852	-1.73778
NM 012278	ITGB1BP2	107.6560173	61.96106281	-1.73748
NM 004067	CHN2	87.25480213	50.24632373	-1.73654
NM 004388	CTBS	540.3017183	311.204315	-1.73616
NM 006807	CBX1	192.8803376	111.1529153	-1.73527
NM 005611	RBL2	24.44703377	14.09279351	-1.73472
NM 005768	C3F	29.77408209	17.16500046	-1.73458
NM 018975	TERF2IP	335.373654	193.3552249	-1.73449
NM 005570	LMAN1	72.36802157	41.72666908	-1.73433
NM 024580	EFTUD1	142.5503525	82.21653895	-1.73384
NM 016213	TRIP4	66.5448385	38.38312182	-1.7337
XM 070924		155.3896937	89.7429194	-1.7315
NM 031857	PCDHA2	35.39157948	20.44366436	-1.73118
NM 004839	HOMER2	124.1319288	71.78700704	-1.72917
NM 002063	GLRA2	18.01386992	10.42058141	-1.72868
NM 017696		270.4741029	156.4867791	-1.72842
AK055328	C21orf59	222.3648398	128.6662762	-1.72823
NM 016180	MATP	70.69886974	40.95453501	-1.72628
NM 014099		57.73129342	33.44537945	-1.72614
NM 014904	Rab11-FIP2	45.75136173	26.54605103	-1.72347
NM 000380	XPA	355.2238712	206.1702904	-1.72296
NM 004268	CRSP6	226.4657714	131.5313391	-1.72176
NM 003020	SGNE1	48.92077179	28.45253604	-1.71938
NM 002592	PCNA	249.1457143	144.9549713	-1.71878
NM 018180	DHX32	322.4774662	187.7256697	-1.71781
NM 018368	C6orf209	70.69284124	41.17144334	-1.71704
NM 016029	DHRS7	115.8047235	67.49324079	-1.7158
NM 007181	MAP4K1	283.1601499	165.2542568	-1.71348
NM 001412	EIF1AX	66.62824908	38.88786411	-1.71334
NM 016289	MO25	74.35128162	43.4127894	-1.71266
XM 011708		37.77597401	22.07282019	-1.71142
NM 000272	NPHP1	132.8567416	77.64278613	-1.71113
NM 015571	SENP6	39.77602044	23.26208341	-1.70991

<b>GB acc</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>Control: (Intensity)</b>	<b>L3 12.5%: (Intensity)</b>	<b>Times of Change</b>
<u>NM 024332</u>	<u>C6.1A</u>	1008.535686	591.0182651	-1.70644
<u>NM 006919</u>	<u>SERPINB3</u>	26.28391583	15.4101106	-1.70563
<u>NM 003772</u>	<u>JRKL</u>	211.0378296	123.7793037	-1.70495
<u>NM 021820</u>	<u>C6orf75</u>	37.53319987	22.02412564	-1.70419
<u>NM 006157</u>	<u>NELL1</u>	184.548336	108.3675847	-1.70298
<u>NM 024834</u>	<u>C10orf119</u>	231.2786761	135.865715	-1.70226
<u>NM 005792</u>	<u>MPHOSPH6</u>	383.1007824	225.078779	-1.70207
<u>NM 002504</u>	<u>NFX1</u>	47.45891886	27.89309297	-1.70146
<u>XM 018464</u>		316.0565714	186.2343124	-1.69709
<u>XM 002943</u>		29.15728827	17.19896063	-1.69529
<u>NM 002077</u>	<u>GOLGA1</u>	95.06301315	56.11574554	-1.69405
<u>NM 018328</u>	<u>MBD5</u>	91.61632737	54.08293478	-1.694
<u>NM 003668</u>	<u>MAPKAPK5</u>	468.0069434	276.8734459	-1.69033