



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA COMBINACIÓN DE
HIDRALAZINA Y VALPROATO EN LÍNEAS CELULARES DE LINFOMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
HAROLD ANDRES SALAMANCA ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alfonso Dueñas González
[Instituto Nacional de Cancerología](#)
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Rosana Pelayo Camacho
[Centro Médico Nacional Siglo XXI](#)

Dr. Ángel Zarain Herzberg
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2017



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 mis padres Martha Ortiz y Pedro Salamanca, por su constante apoyo, afecto y por ser mi motivación cada día para ser mejor persona y profesional.

A mi novia Catalina Rodríguez, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por ser siempre mi apoyo diario y por su cariño incondicional.

Al Dr. Alfonso Dueñas, por tener la confianza de recibirme en su laboratorio, por darme este bonito proyecto y por sus enseñanzas durante mi estancia en México.

Al comité tutorial: a la Dra. Rosana Pelayo y el Dr. Ángel Zarain, quienes, por medio de sus críticas constructivas, hicieron que creciera profesionalmente durante este tiempo.

A los doctores/as Alma Chávez, Guadalupe Domínguez, Catalina Trejo, Aurora González, Lucy Taja, y Enrique Pérez, porque me enseñaron que se puede ser científicos siendo personas sencillas y dispuestas a aprender y enseñar.

Especialmente quiero agradecer a las doctoras Alma y Lupita por ser mis tutoras en estos dos años, por enseñarme tantas cosas y sobre todo tenerme paciencia. Además, por brindarme su confianza, amistad y ser una muy agradable compañía durante mi trabajo en el laboratorio. Las estimo bastante.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Desiree De La Cruz y Alfonso Rivera, por su bonita amistad y compañía en el transcurso de mi maestría. En Colombia siempre tendrán un amigo que los recibirá con los brazos abiertos.

A la biol. Rocío Morales por la medición de las muestras del citómetro y por asesorarme en los análisis de resultados.

Al CONACYT por apoyarme económicamente durante este tiempo, ya que, sin esta institución, no hubiera podido tener esta magnífica oportunidad.

A la UNAM por ser una excelente Universidad, la cual, mediante sus profesores, me han enseñado y ayudado a ser un mejor profesional.

Al PAEP por el apoyo económico brindado para la asistencia del congreso internacional

Al INCan y al Laboratorio de Epigenética en Cáncer por los recursos y espacios físicos brindados.

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS	4
2.	RESUMEN	5
3.	MARCO TEÓRICO	7
3.1	Cáncer	7
3.2	Linfoma	8
1.2.1.	Linfoma de Hodgkin.....	8
1.2.2	Linfoma no Hodgkin.....	10
3.3	Epigenética del cáncer	11
1.3.1	Metilación del DNA	13
1.3.2	Modificaciones postraduccionales de Histonas.....	16
4.	ANTECEDENTES.....	20
4.1	Inhibidores de las DNMT.....	20
4.2	Inhibidores de las HDACs.....	22
4.3	Terapia epigenética combinada.....	24
4.4	Terapia epigenética en linfomas	25
5.	JUSTIFICACIÓN.....	29
6.	HIPÓTESIS.....	29
7.	OBJETIVOS.....	29
7.1	GENERAL	29
7.2	ESPECÍFICOS.....	29
8.	METODOLOGÍA.....	30
8.1	Cultivo Celular	30
8.2	Ensayos de viabilidad celular	30
8.3	Apoptosis.....	30
8.4	Ciclo celular.....	31
8.5	Extracción de RNA.....	32
8.6	Microarreglos de expresión	32
8.7	Validación de los microarreglos mediante qRT-PCR	33
9.	RESULTADOS	34
10.	DISCUSIÓN.....	53
11.	PERSPECTIVAS	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	75

1. ABREVIATURAS

NHL	Linfoma no Hodgkin
B-NHL	Linfoma no Hodgkin de células B
T-NHL	Linfoma no Hodgkin de células T
HDAC	Histonas Desacetilasas
DNMT	DNA Metiltransferasas
HDACi	Inhibidores de Histonas Desacetilasas
DNMTi	Inhibidores de DNA Metiltransferasas
CTCL	Linfoma Cutáneo de Células T
DLBCL	Linfoma Difuso de Células B Grandes
BL	Linfoma de Burkitt
SIRT	Sirtuinas
RIN	Número de Integridad del RNA
MBP	Proteínas de enlace a los grupos metilo
GST	Genes supresores de tumor
HV	Tratamiento con Hidralazina y Valproato

2. RESUMEN

Introducción: Las DNA Metiltransferasas (DNMT) y las Histonas Desacetilasas (HDAC) son enzimas que trabajan juntas para modular la actividad transcripcional a nivel genómico. Particularmente, la DNMT -1, 3a, -3b y las HDAC -1, -2, -3, -6, -9 están sobre-expresadas en Linfoma no Hodgkin, y ha sido relacionado con la linfomagénesis, progresión tumoral y pobre pronóstico. Por esta razón, esas enzimas han sido importantes blancos para la terapia epigenética en los últimos años.

La combinación de hidralazina (inhibidor DNMT) y valproato (inhibidor HDAC) ha mostrado tener efecto sinérgico antitumoral en diferentes tipos de cáncer *in vitro* e *in vivo*, así como una buena respuesta en pacientes con linfoma de células T cutáneo (CTCL). Sin embargo, los mecanismos moleculares de este tratamiento aún permanecen desconocidos y su efecto antitumoral sobre Linfoma no Hodgkin de Células B aún no se ha realizado. Por esta razón, este trabajo consistió en la evaluación del efecto antiproliferativo de esta combinación en líneas celulares de linfoma T (Hut 78) y B (Raji y Toledo), así como elucidar los procesos celulares involucrados mediante la evaluación de apoptosis, arresto del ciclo celular y los cambios de expresión del genoma completo.

Metodología: Se evaluó la combinación de hidralazina y valproato en las líneas celulares Hut 78 (linfoma cutáneo de células T), Raji (linfoma de Burkitt) y Toledo (linfoma difuso de células B grandes), usando diferentes dosis y tiempos de exposición. La apoptosis y el arresto del ciclo celular fueron determinados por citometría de flujo, usando Annexin V-FITC y PI, respectivamente. Los cambios de expresión global del genoma completo fueron determinados por microarreglos (Human Gene 2.0, Affymetrix). Mediante qRT-PCR, se validaron los genes *FASN* y *SCD* para las células Hut 78, y *STAT1* para las células RAJI.

Resultados: Se demostró que la combinación de hidralazina y valproato presentó efecto antiproliferativo dosis y tiempo dependientes en todas las líneas celulares, y de manera interesante, las líneas de linfoma de células B fueron más sensibles al tratamiento que la línea de linfoma células T. Este efecto antiproliferativo fue modulado parcialmente por un arresto del ciclo celular en G0/G1 para las células Raji y Toledo, así como un arresto en G2/M para Hut 78. Adicionalmente, esta combinación de fármacos indujo de manera significativa a apoptosis en las tres líneas celulares. Estos resultados fueron corroborados mediante microarreglos, donde se sugiere que el arresto en G0/G1 para la línea celular Raji, fue debida a la inducción de los genes *CDKN1B* (p27) y *RB1*, así como una regulación a la baja de los genes *SKP2*, *TFDP1*, *E2F3*, *MCM4*, *MCM6*, *MCM7*, *ORC1*, *ORC6*, *CDC6*, *CDC45*, *POLE*, *POLA2*, *CCNA2* y *CCNB1*. De igual manera, respecto al arresto observado en G2/M para Hut 78, se sugiere que fue modulado por la inducción de *CDKN1A* (p21). En cuanto a los resultados de apoptosis, se identificaron los posibles genes que están induciendo este tipo de muerte celular. En el caso de las células Raji, los genes pro-apoptóticos inducidos fueron: *TNFSF10*, *FAS*, *PMAIP1*, *XAF1* y *TP53INP1*, así como una posible participación de esta muerte celular mediada por la inducción de *STAT1*, *IFNB1* y *GADD45B*; mientras que los genes

anti-apoptóticos reducidos fueron *BIRC5* y *HELLS*. Esto, podría sugerir que la apoptosis observada en esta línea celular fue mediada por la vía extrínseca. Para el caso de la línea celular Hut 78, la apoptosis estuvo modulada por una inducción de los genes pro-apoptóticos *APAF-1*, *TP53/11* y *PMAIP1*, así como una disminución del gen anti-apoptótico *BCL3*, lo cual podría dar un indicio de que la apoptosis fue inducida por la vía intrínseca. Respecto a las demás vías alteradas, para el caso de las células Raji se observó una importante disminución del gen *BCL6*, además de *CD79* (pertenecientes a la vía de receptores de células B), los cuales podrían estar atenuando la proliferación de las células B. Adicionalmente, de manera interesante, esta combinación de fármacos alteró la expresión de genes involucrados en rutas metabólicas, tal como la disminución del gen *CTPS1* (metabolismo de pirimidinas), y de los genes *EIF4E*, *EIF1AX* y *EIF5A* (biosíntesis de proteínas). De igual manera, hubo una regulación a la baja del gen *DHX9* (procesamiento mRNA) y una inducción del gen *TET2* (desmetilador activo del DNA). Respecto a las demás vías involucradas en el efecto antiproliferativo de la línea celular Hut 78, se destacó la inducción de los genes *PHLPP1* (vía PI3K/AKT/mTOR), *MAP3K8* (MAPK) y *TLR6* (receptores Toll-like), así como la disminución de los genes *ACACA*, *SREBF1*, *FASN* y *SCD* (biosíntesis de ácidos grasos). Cabe aclarar que la inducción de los genes *MAP3K8* y *TLR6* aún permanece contradictoria, ya que hay estudios que demuestran que estos genes pueden promover el desarrollo de tumores, pero también hay otros que afirman que puede suprimirlos, por lo que su función aún permanece en investigación.

Finalmente, hubo 91 genes que se sobre-expresaron entre las células Raji y Hut 78, de los cuales destaca la función del gen *JUN*. Por el contrario, hubo 9 genes que se regularon a la baja entre las dos líneas celulares, entre los cuales se destaca el gen *ACACA* (biosíntesis de ácidos grasos).

Conclusiones: La combinación de hidralazina y valproato presentó efecto antiproliferativo en todas las líneas celulares de linfoma. Estos fármacos fueron capaces de inducir el arresto del ciclo celular y apoptosis en todas las líneas, reactivando un patrón distinto de genes para las líneas celulares Raji y Hut 78, los cuales fueron congruentes con el tipo de arresto del ciclo celular y apoptosis observados. Nuestros resultados indican que la combinación de estos fármacos indujo la expresión de genes pro-apoptóticos, anti-proliferativos, así como una regulación a la baja de genes anti-apoptóticos, proliferativos, e involucrados en rutas metabólicas tales como biosíntesis de pirimidinas, ácidos grasos y proteínas. De esta manera, estos fármacos fueron capaces de reactivar genes supresores de tumor y regular a la baja algunos oncogenes, con el fin de atenuar la proliferación de estas líneas de linfoma.

Perspectivas: Teniendo en cuenta que las líneas de linfoma B fueron más sensibles al tratamiento que la línea de linfoma T, sería interesante evaluar el efecto antitumoral de estos fármacos en un modelo in vivo. Además, profundizar sobre el efecto de estos fármacos sobre los genes más importantes que se seleccionaron, como posibles responsables de este efecto antiproliferativo observado.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Cáncer

El cáncer se puede definir como un “conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento tumoral incontrolado que conlleva a la invasión de tejidos circundantes y a la diseminación (metástasis) en otras partes del cuerpo” (King & Robins, 2006). Se ha encontrado asociaciones directas entre el desarrollo del cáncer y una serie de mutaciones y cambios de expresión (mediados por la epigenética) en una variedad de proto-oncogenes, genes supresores de tumor y/o genes reparadores de DNA, que conllevan a que las células adquieran un proceso descontrolado de proliferación, evasión de apoptosis y de la respuesta inmune. Así mismo, las células tumorales son capaces de inducir a su microambiente (células normales, moléculas y vasos sanguíneos circundantes) a que le otorgue los nutrientes necesarios para su crecimiento (<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>, 2015).

El proceso de la carcinogénesis comprende tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión (fig. 1). En la etapa de iniciación, los factores de riesgo (tales como el alcohol, tabaco, obesidad, radiación, dieta, agentes infecciosos, productos químicos, estrés, entre otros) pueden causar un conjunto de mutaciones en una célula (tales como inserciones, deleciones, cambio de marco de lectura, entre otras), así como alteraciones en las marcas epigenéticas a lo largo del genoma, que conllevan a la activación de proto-oncogenes (convirtiéndolos en oncogenes), al silenciamiento de los genes supresores de tumor y/o a una modificación de los genes reparadores del DNA. La célula, por tanto, comienza a presentar alteraciones en el control de su ciclo celular, fomentando su proliferación y evadiendo la apoptosis. En este proceso (etapa de promoción), las células entran en un estado de competencia por selección natural, y aquellas que sobrevivan se propagarán por el tejido adyacente (regulado por los factores de crecimiento, receptores de membrana, angiogénesis y degradación de matrices extracelulares) culminando en la formación del tumor (Martin de Civetta & Domingo Civetta, 2011). En la etapa de progresión, las células tumorales adquieren la capacidad de invadir tejidos externos por un proceso conocido como metástasis. En este proceso, las células se desprenden del tumor primario vascularizado, penetran el tejido circundante, entran en los vasos sanguíneos (o vasos linfáticos) y viajan por el sistema circulatorio (o sistema linfático) hacia diferentes partes del cuerpo; ocasionalmente, algunas de esas células se adhieren a la pared de estos vasos, se extravasan y finalmente, invaden el tejido adyacente formando un tumor secundario (Wirtz, Konstantopoulos, & Searson, 2011).

Se han encontrado más de 100 tipos de cáncer, y el nombre que se le asigna a cada tipo depende del tejido donde se originó, conocido como tumor primario. Algunas de las categorías que comienzan en células específicas son: carcinoma (células epiteliales), sarcoma (células mesenquimatosas no hematopoyéticas), leucemia (células hematopoyéticas que se diferencian en la médula ósea), linfoma (células hematopoyéticas que se diferencian en el ganglio linfático), mieloma múltiple

(células plasmáticas), glioma (células gliales) y melanoma (melanocitos) (<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>, 2015).

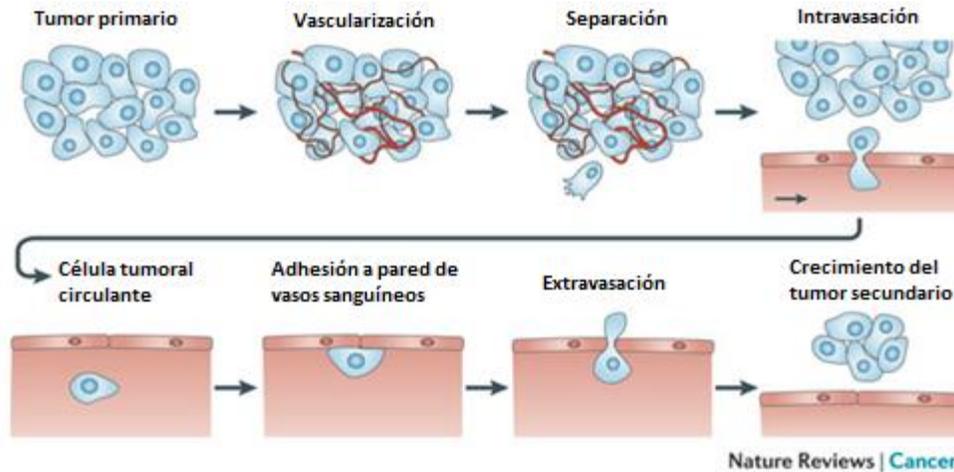


Figura 1. Proceso de la metástasis. El tumor primario inicialmente es vascularizado, y posteriormente, una de sus células se separa y se incorpora al torrente sanguíneo (o linfático) con el fin de circular a otras partes del cuerpo. Esta célula tumoral se extravasa y comienza el crecimiento de un tumor secundario en un tejido adyacente (tomado de Wirtz et al., 2011).

3.2 Linfoma

Los linfomas son un grupo heterogéneo de tumores malignos que se originan en los linfocitos, los cuales han sufrido una serie de mutaciones y cambios epigenéticos que les han conferido crecimiento descontrolado y una ventaja selectiva de sobrevivencia sobre las células normales. Estas neoplasias se originan usualmente en los nodos linfáticos del cuello, axila, diafragma, bazo, abdomen, ingle y pelvis; o también pueden ocurrir sobre tejidos linfáticos (linfoma extraganglionar) (Press & Lichtman, 2016). Básicamente, los linfomas se pueden clasificar en dos grandes grupos: linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin.

1.2.1. Linfoma de Hodgkin

Este tipo de linfoma se caracteriza por presentar un número variable de células gigantes multinucleadas conocidas como *células de Reed-Sternberg* o sus variantes (células de Hodgkin). Estas células neoplásicas constituyen una fracción minoritaria (1%) respecto a los componentes no neoplásicos tales como linfocitos T, histiocitos, eosinófilos, granulocitos, fibroblastos y células plasmáticas (Bellas Menéndez, 2004; Brauningner et al., 2006; "Childhood Hodgkin Lymphoma Treatment–Health Professional Version (PDQ®)," 2016). Las diferencias morfológicas entre una célula de Reed-Sternberg y un linfocito normal, es que la primera es mucho más grande, puede ser binucleada o multinucleada, tiene núcleo bilobulado y presenta dos nucléolos grandes (figura 2). Este tipo de célula se caracteriza porque expresa CD30 en su mayoría, CD15 en un 70 % y CD20 en un 6-10% de los casos, y aunque provienen de células B del centro germinal, en general no expresan antígenos de

estas células como CD45, CD1 y CD79A (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>, 2016).

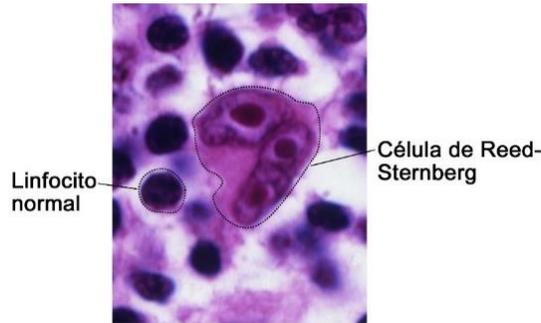


Figura 2. Comparación morfológica entre linfocito normal y célula de Reed-Sternberg. La célula Reed-Sternberg es más grande que el linfocito B normal, es multinucleada, bilobulada, y no presenta los marcadores específicos de células B (tomado de <http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>, 2016).

Con base en las diferencias morfológicas de las células de Reed-Sternberg, al inmunofenotipo y al comportamiento clínico, los linfomas de Hodgkin se pueden clasificar en dos tipos: clásico o con predominio linfocítico nodular (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>, 2016).

El **linfoma de Hodgkin clásico**, es el más común de los linfomas de Hodgkin (95 % de los casos) y es el que ha presentado los mejores índices de curación. Puede subdividirse en:

- **Esclerosis nodular:** Es el tipo más común de linfoma Hodgkin clásico (80%), se caracteriza por presentar bandas colagenosas que dividen el ganglio linfático en nódulos, quienes, a su vez, contienen una variante de las células Reed-Sternberg denominadas células lagunares. Estas células tienen un núcleo multilobulado, con pequeños nucléolos y abundante citoplasma que se retrae en el tejido fijado en formol generando una “laguna” (Bellas Menéndez, 2004). Se puede subdividir en EN I y EN II dependiendo del número de las células neoplásicas en los nódulos. Ocurre principalmente en niños mayores y adolescentes (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>, 2016).
- **Celularidad mixta:** Constituye el 15-30 % de los casos y se caracteriza por presentar células Reed-Sternberg junto con abundantes células normales como los linfocitos T, células plasmáticas, eosinófilos, neutrófilos e histiocitos. Es más común en niños pequeños que en adultos y adolescentes (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>, 2016).
- **Rico en linfocitos:** Representa 6 % de los casos y se caracteriza por tener abundancia de linfocitos en los componentes no neoplásicos, además de células

de Reed-Sternberg. Presenta mayor incidencia en varones de mediana edad (Von Vasielewski, Mengel, & Fischer, 1997).

- **Agotamiento linfocitario:** Es el subtipo menos frecuente (1 %) y se caracteriza porque los ganglios linfáticos presentan casi en su totalidad células Reed-Sternberg. Ocurre en su mayoría en adultos mayores y personas con VIH principalmente (<http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/linfoma-de-hodgkin/panorama-general>, 2015).

En cuanto al **linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico nodular**, se presenta alrededor de 5-10 % de los casos y se caracteriza por presentar las *células popcorn* (derivadas de las Reed-Sternberg), las cuales son mononucleares con un núcleo lobulado, voluminoso y contorneado parecido a una palomita de maíz (<http://www.cancer.org/espanol/cancer/enfermedaddehodgkin/guiadetallada/enfermedad-de-hodgkin-what-is-what-is-hodgkin-disease>, 2016). A diferencia de las células Reed-Sternberg clásicas, estas células si pueden expresar antígenos de células B tales como CD20, CD19, CD22 (sin expresar CD15 y pueden o no expresar CD30) y presentan los oncogenes *OCT-2* y *BOB.1*, lo que las hace diferentes de los otros subtipos de linfoma Hodgkin, pareciéndose a nivel genético y proteínico al linfoma no Hodgkin de células B (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>, 2016). A menudo este tipo de linfoma se desarrolla en los ganglios linfáticos del cuello, axilas o ingle, y se presenta con mayor frecuencia en varones menores de 18 años. En algunos casos, los pacientes que padecen esta enfermedad pueden transformarlo en un tumor más agresivo como el linfoma difuso de células B (<http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/linfoma-de-hodgkin/panorama-general>, 2015).

1.2.2 Linfoma no Hodgkin

El linfoma no Hodgkin (NHL) es un grupo heterogéneo de enfermedades linfoides que no cumplen con las características anteriormente mencionadas de los linfomas de Hodgkin. Este tipo de linfoma crece y se propaga a diferentes tasas y suele agruparse como indolente o agresivo (de bajo y alto grado, respectivamente). Los linfomas de tipo indolente tienden a crecer y propagarse lentamente, presentando escasas señales de síntomas; mientras que los linfomas de tipo agresivo crecen y se propagan rápidamente, manifestando señales de síntomas severos (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/patient/adult-nhl-treatment-pdq>, 2016) . Se han encontrado más de 60 subtipos de linfoma no Hodgkin, cada uno con sus propias características epidemiológicas, etiológicas, morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y de respuesta terapéutica, y dependiendo del subtipo se pueden originar en linfocitos B, T o NK (<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/non-hodgkins-lymphoma/about/types/the-most-common-types-of-non-hodgkins-lymphoma>, 2014). A continuación, se muestran algunos ejemplos de la clasificación de los linfomas no Hodgkin de acuerdo a su agresividad (<http://www.cancer.gov/types/lymphoma/patient/adult-nhl-treatment-pdq>, 2016)

Linfomas no Hodgkin indolentes:

- Linfoma folicular (células B).
- Linfoma linfoblástico (células B).
- Linfoma zona marginal (células B).
- Linfoma de células primarias cutáneas anaplásicas grandes.

Linfomas no Hodgkin agresivos:

- Linfoma difuso de células B grandes.
- Linfoma folicular de células grandes, etapa III.
- Linfoma anaplásico de células grandes (células T).
- Linfoma de células T/NK extranodal.
- Granulomatosis linfomatoide.
- Linfoma angioinmunoblástico de células T.
- Linfoma periférico de células T.
- Linfoma intravascular de células B grandes.
- Linfoma de Burkitt (células B).
- Linfoma linfoblástico (células B o T).
- Linfoma/leucemia adulto de células T.
- Linfoma de células del manto (células B).
- Desórdenes linfoproliferativos postransplantación.
- Linfoma histiocítico verdadero.
- Linfoma efusión primaria (células B).
- Linfoma plasmablástico (células B).

La incidencia global de los linfomas no Hodgkin incrementan con la edad, siendo para las personas mayores de 45 años más común en hombres que en mujeres. Se han encontrado múltiples causas asociadas a agentes infecciosos tales como el virus del Epstein-Barr, *Helicobacter pylori*, HHV-8, virus de la Hepatitis C y VIH (Maeda et al., 2009; Peveling-Oberhag, Arcaini, Hansmann, & Zeuzem, 2013; Pinzone et al., 2012); a medicamentos como dioxina, bifenilos policlorados y herbicidas fenoxi (S. Kramer, Hikel, Adams, Hinds, & Moon, 2012); a enfermedades genéticas como el síndrome de klinefelter y síndrome de Chédiak-Higashi; a enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea y el lupus sistémico eritomatoso y a tratamientos médicos como la quimioterapia y radioterapia (Freedman & Nadler, 2000).

3.3 Epigenética del cáncer

La epigenética se puede definir como el “estudio de los cambios heredables en la regulación génica que no involucra un cambio en la secuencia de DNA o de la secuencia de proteínas asociadas al DNA” (Tollefsbol, 2009). Hasta el momento se han encontrado tres tipos de modificaciones epigenéticas: la metilación del DNA, la modificación postraducciona de histonas y el silenciamiento génico mediado por siRNAs. Estas modificaciones son fundamentales para regular la expresión génica

de varios procesos celulares, incluyendo apoptosis, diferenciación celular, angiogénesis, embriogénesis, impronta genómica, inactivación del cromosoma X, interacciones DNA-proteína y supresión de transposones (Portela & Esteller, 2010).

Los reguladores epigenéticos se dividen de acuerdo a su función, de esta manera se clasifican como escritores, borradores y lectores (figura 3). Los escritores establecen marcadores epigenéticos sobre DNA o histonas, tales como las histonas acetiltransferasas (HATs), histonas metiltransferasas (HMTs), cinasas, proteínas arginina metiltransferasas (PRMTs), DNA metiltransferasas (DNMT), entre otras. Estas marcas pueden ser reconocidas por lectores epigenéticos, tales como proteínas con bromodominios, cromodominios, dominios Tudor y los dominios de enlace metilo al DNA (MBD), para reclutar otros modificadores de cromatina y así lograr alterar su estructura y función. Estas marcas epigenéticas también pueden ser eliminadas por los borradores epigenéticos, tales como las histonas desacetiltransferasas (HDAC), lisina desmetilasas (KDMs) y fosfatasa (Falkenberg & Johnstone, 2014).

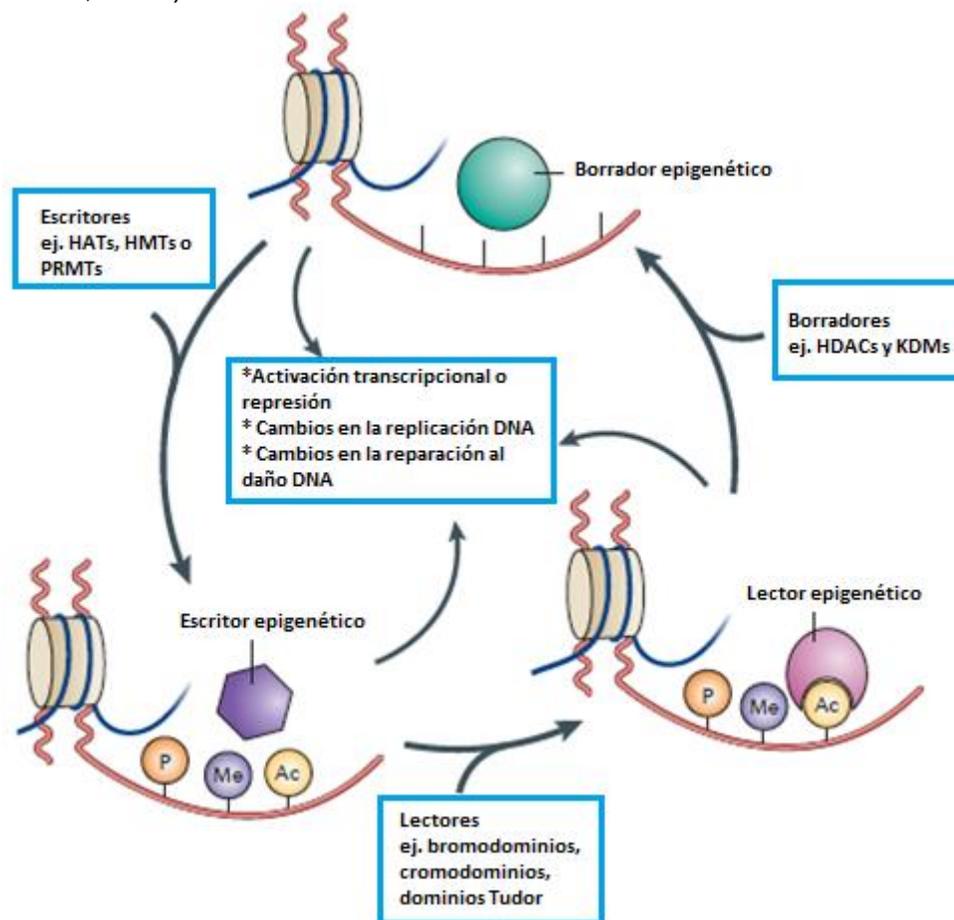


Figura 3. Reguladores epigenéticos: escritores (writers), lectores (readers) y borradores (erasers). Los escritores se encargan de incorporar grupos químicos (metilo, acetilo, entre otros) al DNA o las histonas. Los lectores se encargan de reconocer estos grupos químicos y reclutar otras proteínas tales como los remodeladores de cromatina. Los borradores eliminan estos grupos químicos, modificando la estructura de la cromatina (tomado de Falkenberg & Johnstone, 2014).

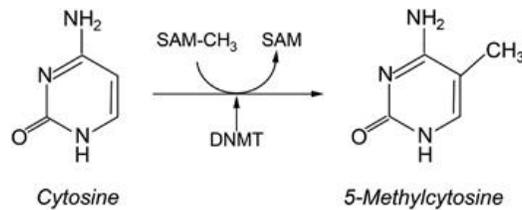
En los últimos años, estos modificadores epigenéticos, tales como las DNA metiltransferasas e Histonas desacetilasas han demostrado estar implicados en los procesos de carcinogénesis y progresión tumoral en varios tipos de cáncer, por esta razón, la epigenética del cáncer actualmente ha tomado mucha importancia y se ha fomentado la búsqueda y diseño de inhibidores contra esas enzimas epigenéticas, con el objeto de re-expresar genes supresores de tumor que han sido silenciados mediante marcadores epigenéticos, tales como la metilación de las islas CpG del DNA y acetilación de histonas.

1.3.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA es la modificación epigenética mejor conocida, y tiene gran importancia en la regulación génica. Es regulada por las DNA Metiltransferasas (DNMTs), específicamente por las DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (en mamíferos), quienes catalizan la incorporación de un grupo metil en la posición 5 de las citosinas (proveniente del S-adenosil-metionina) generando 5-metilcitosina (figura 4). La DNMT1 es la enzima responsable del mantenimiento de los patrones de metilación seguido de la replicación de DNA; mientras que las enzimas DNMT3a y DNMT3b son las responsables de la metilación de novo (Esteller, 2007).

El mecanismo de reacción por el cual las DNMT metilan las citosinas del DNA se puede observar en la figura 4. Allí, una base (posiblemente el grupo fosfato del DNA) desprotona al grupo tiol de la cisteína de la enzima DNMT para convertirlo en un fuerte nucleófilo. Este tiolato de cisteína ataca al C6 de la citosina en una reacción de adición conjugada, formando un enlace covalente entre el átomo de S y el C6. Un residuo de glutamato estabiliza la carga negativa de la citosina e inicia el ataque nucleofílico sobre el grupo metil de la S-adenosil-l-metionina (AdoMet), convirtiéndolo a S-Adenosil-l-homocisteína (AdoHcy). Finalmente, ocurre una eliminación- β entre el enlace C5-C6, liberando así a la enzima DNMT (<http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>, 2016).

a)



b)

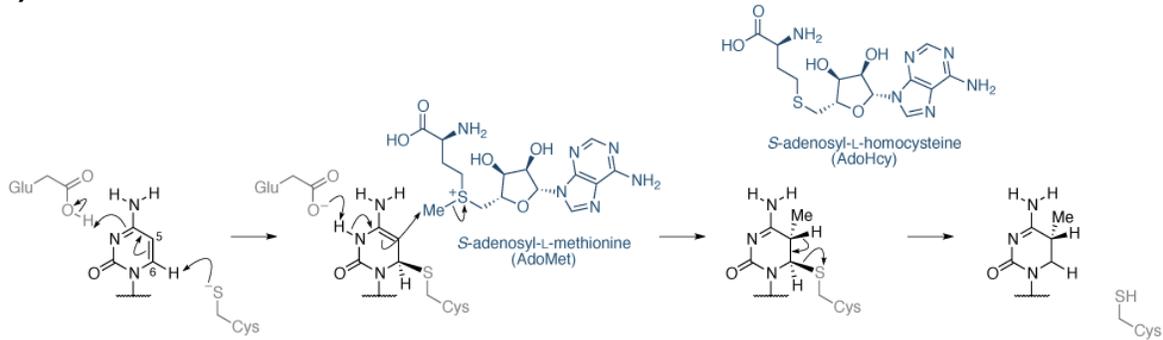


Figura 4. Metilación de las citosinas del DNA mediado por DNMT. **a)** Esquema básico de la metilación, donde la S-adenosilmetionina cede su grupo metilo a la citosina mediado por la DNMT para formar la 5-metilcitosina (tomado de Gibney & Nolan, 2010). **b)** Mecanismo de reacción de la DNMT para la incorporación del grupo metilo a la citosina (modificado de <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>, 2016).

En cáncer, hay aberraciones en los patrones de metilación bien sea por hipermetilación de las islas CpG de las regiones promotoras o en las zonas costeras de las islas CpG, así como la hipometilación en los cuerpos génicos y secuencias repetitivas (figura 5). En el primer caso (figura 5.a), la hipermetilación de las citosinas de las islas CpG impide que la RNA polimerasa reconozca al promotor y por tanto haya un silenciamiento transcripcional. A estas islas CpG hipermetiladas se le unen las proteínas de enlace metil-CpG (MBD), las cuales funcionan como traductores entre la metilación del DNA y los genes modificadores de histonas que establecen una conformación de heterocromatina. Esta familia de proteínas consiste de cinco miembros: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4 (Ballestar & Esteller 2005). Por medio de este tipo de metilación se silencian la mayoría de genes supresores de tumor en cáncer, al igual que se ven afectados genes que están involucrados en rutas principales tales como: reparación de DNA (hMLH1, MGMT, WRN, BRCA1), señalización Ras (RASSF1A, NORE1A), control del ciclo celular (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, RB), red p53 (p14^{ARF}, p73, HIC-1), apoptosis (TMS1, DAPK1, WIF-1, SFRP1), entre otros (Esteller, 2007; Portela & Esteller, 2010). El segundo tipo de metilación (figura 5.b) consiste en la hipermetilación de las citosinas de las zonas costeras a las islas CpG (ubicados a 2kb de la región promotora), y al igual que en el caso anterior, se produce un silenciamiento transcripcional al impedir que la RNA polimerasa reconozca la región promotora. En el tercer tipo (figura 5.c) la hipometilación de las regiones intragénicas permite que varias RNAs polimerasas inicien simultáneas transcripciones y, por tanto, haya múltiples transcritos que pueden conllevar a inestabilidad cromosómica. En el último caso (figura 5.d), cuando hay una hipometilación en las secuencias repetitivas se pueden activar

secuencias endoparásitas, promover las translocaciones, recombinaciones y generar inestabilidad en el genoma (Portela & Esteller, 2010).

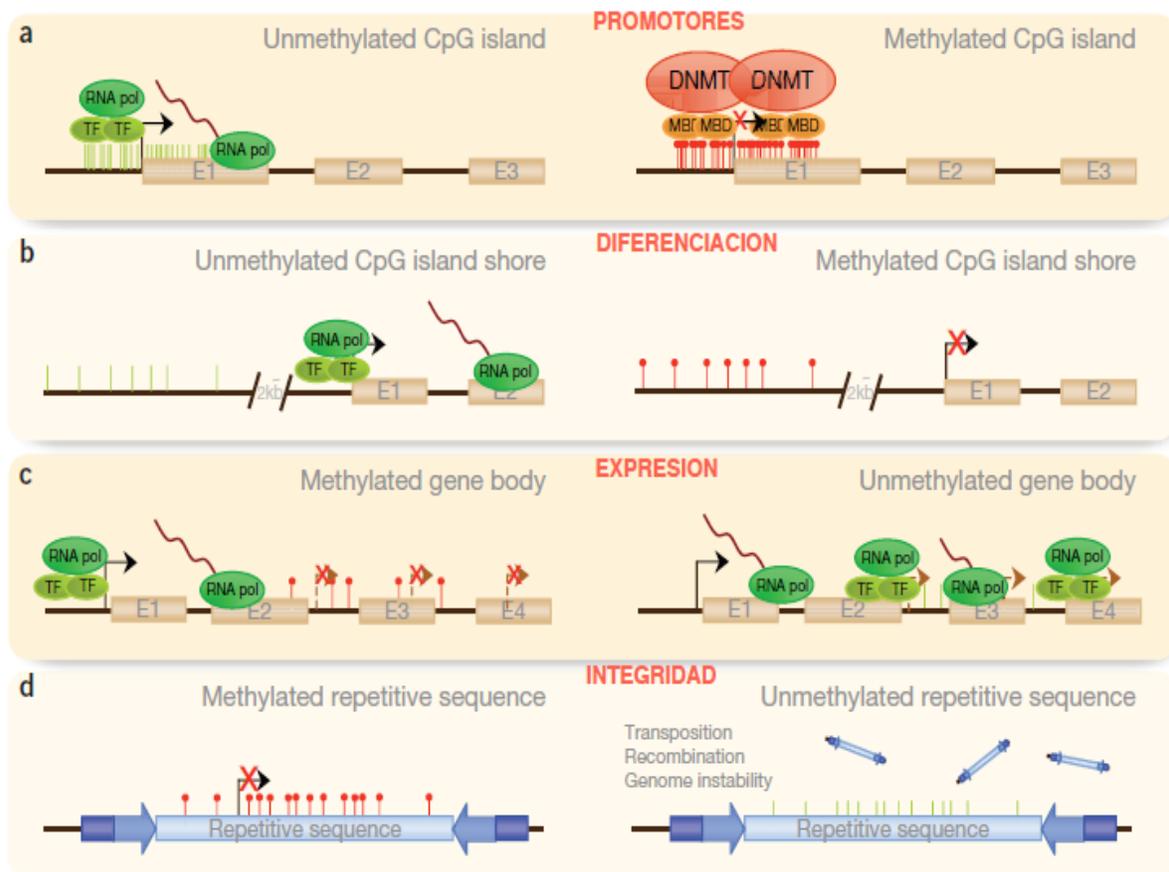


Figura 5. Tipos de metilación del DNA y sus diferencias entre células normales (izquierda) y cancerosas (derecha). **a)** La hipermetilación en las islas CpG de la región promotora recluta las proteínas de enlace metil-CpG (MBD) y otros factores remodeladores de la cromatina, impidiendo la transcripción del gen **b)** La hipermetilación en zonas costeras a las islas CpG también reprime la transcripción del gen por impedir que la RNA polimerasa reconozca el promotor. **c)** La hipometilación en regiones intragénicas genera inestabilidad cromosómica al fomentar la producción de múltiples transcritos. **d)** La hipometilación en secuencias repetitivas fomenta la transcripción de secuencias endoparásitas, así como translocaciones, recombinaciones e inestabilidad cromosómica (tomado de Portela & Esteller, 2010).

La sobre-expresión de DNMT1, DNMT3a y/o DNMT3b conlleva a una hipermetilación de las citosinas de las islas CpG, y por tanto al silenciamiento génico de una variedad de genes supresores de tumor. Varias investigaciones soportan que la sobre-expresión de estas enzimas ha estado relacionado con un pobre pronóstico en varios tipos de cáncer, tal como cáncer pancreático, mama, pulmón, estómago, hígado, riñón, ovario, cerebro, próstata, boca, leucemia y linfoma (Bai et al., 2012; Gao et al., 2013; Hayette et al., 2012; Kobayashi et al., 2011; Lin et al., 2007; Liu et al., 2017; Oh et al., 2007; Purkait et al., 2016; Supic, Kozomara, Zeljic, Jovic, & Magic, 2017; Yang et al., 2011; Yu et al., 2015). De ahí su importancia en

el uso de inhibidores contra estas enzimas para contrarrestar el avance de esta enfermedad.

En la tabla 1 se pueden observar algunos ejemplos de genes que son silenciados por hipermetilación y se encuentran agrupados de acuerdo al proceso celular que se ve afectado. De esta manera, se puede observar que la hipermetilación puede silenciar a genes involucrados en la apoptosis, ciclo celular, reparación del daño de DNA, respuesta a factores de crecimiento, transducción de señales y arquitectura del tumor (Johnstone, 2002).

Tabla 1. Procesos celulares que son regulados por metilación del DNA (tomado de Johnstone, 2002).

Genes metilados	Proceso celular afectado
CDKN2A, APAF1, CASP8, TP73, DAPK, TMS1	Apoptosis
CDKN2A, RB, TP73, CDKN2B, SOCS1, VHL, RIZ1	Ciclo celular
MLH1, BRCA1, MGMT, GSTP1	Reparación del daño DNA
ER, RAR β , androgen receptor, endothelin B receptor	Respuesta a factores de crecimiento
APC, LKB1	Transducción de señales
TIMP3, thrombospondin 1, E-cadherin, VHL, ICAM1, NES1	Arquitectura del tumor

1.3.2 Modificaciones postraduccionales de Histonas

Las histonas son las proteínas más abundantes asociadas con DNA eucariótico. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las histonas nucleares sobre las cuales se enrolla el DNA y forman el nucleosoma (figura 6). Dentro del nucleosoma, las histonas H2A y H2B forman dos dímeros (ubicados en la parte inferior de la figura 6) mientras que las histonas H3 y H4 forman un tetrámero. Las histonas H1 se unen al DNA linker y permiten una mayor compactación entre los nucleosomas (Watson et al., 2013).

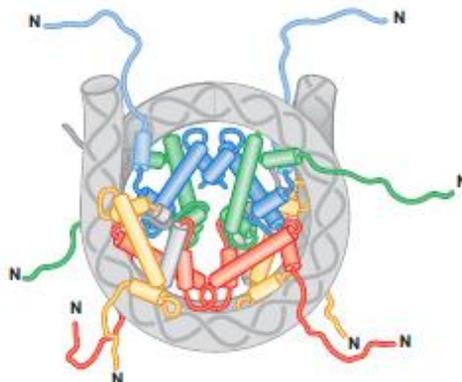
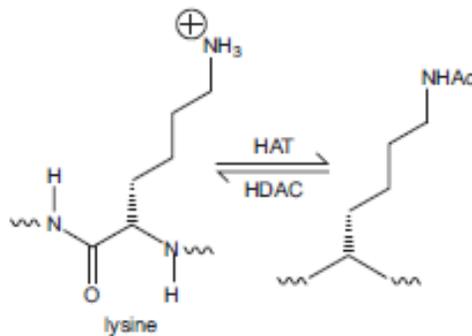


Figura 6. Conformación de un nucleosoma y los extremos amino terminal de las histonas. H3 (azul), H4 (verde), H2A (amarillo), H2B (rojo, tomado de Watson et al., 2013).

Dentro de esta conformación, los extremos aminoterminal quedan orientados hacia el exterior, los cuales tienen como función principal estabilizar las fibras de 30nm por interacción con nucleosomas adyacentes. Las modificaciones postraduccionales sobre estos extremos modulan su función, permitiendo activar o desactivar transcripcionalmente los genes que regulan, por medio de la relajación o compactación de la estructura de la cromatina, respectivamente. Las modificaciones que se han descrito hasta la actualidad son: acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación, sumoilación, ADP-ribosilación, deaminación, crotonilación, propionilación, butirilación, formilación, hidroxilación, isomerización de prolina y O-GlcNAcilación (Falkenberg & Johnstone, 2014). Estas modificaciones son estereoespecíficas para determinados aminoácidos en histonas específicas y tienen un rol importante sobre la regulación de la transcripción, reparación y replicación del DNA, así como en el procesamiento alternativo y en la condensación de la cromatina (Portela & Esteller, 2010). Respecto a esta última, dichas modificaciones hacen que la cromatina adopte una estructura de eucromatina o heterocromatina. Las marcas epigenéticas que caracterizan a la eucromatina son los altos niveles de acetilación y trimetilación en las regiones H3K4, H3K36 y H3K79; y dentro de esta conformación, los genes activos transcripcionalmente están caracterizados por los altos niveles de H3K4me3, H3K27ac, H2BKac y H4K20me1 en la región promotora y H3K79me1 y H4K20me1 a lo largo de los cuerpos génicos (Karlic, Chung, Lasserre, Vlahovicek, & Vingrom, 2010). A diferencia de la eucromatina, la heterocromatina se caracteriza por tener bajos niveles de acetilación y altos niveles de metilación en los puntos H3K9, H3K27 y H4K20, y aunque se conciba a la heterocromatina como una conformación transcripcionalmente inactiva, se han encontrado algunos ncRNA derivados de sus loci (B. Li, Carey, & Workman, 2007; Portela & Esteller, 2010).

El proceso de acetilación/desacetilación de las histonas es catalizado por las histonas acetiltransferasas (HAT) e histonas desacetilasas (HDAC) respectivamente, y es una de las modificaciones postraduccionales más importantes y mejor conocidas. La acetilación de los grupos ϵ -NH₂ de las lisinas de los extremos amino terminal correlaciona con el remodelamiento de la cromatina para activar la transcripción, mientras que las histonas desacetiladas correlacionan con el remodelamiento de la cromatina para reprimir la transcripción (Johnstone, 2002). De esta manera, las HATs y HDACs trabajan de forma cooperativa con los remodeladores de cromatina dependientes de ATP (Flaus & Owen-Hughes, 2001; Johnstone, 2002). Hay dos hipótesis sobre la función de la acetilación: la primera consiste en que la acetilación sirve para neutralizar la carga total positiva de los extremos amino terminal, y así reducir la afinidad de los extremos amino terminal por las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA (mecanismo cis), mientras que la segunda función propuesta consiste en que estos grupos acetilo sirven como marcas de reconocimiento para proteínas con bromodominios, y así, fomentar el reclutamiento de factores modificadores de la cromatina (mecanismo trans) (Allis & Jenuwein, 2016).

a)



b)

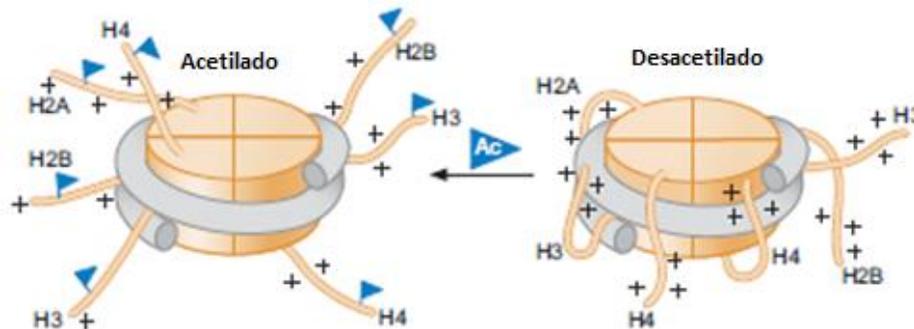


Figura 7. Acetilación/Desacetilación de histonas. **a)** Incorporación del grupo acetilo a la lisina mediado por las Histonas Acetiltransferasas y la desacetilación de la misma mediado por las Histonas Desacetiltransferasas. **b)** La incorporación de los grupos acetilo neutraliza la carga positiva de las lisinas, disminuyendo la interacción electrostática de los extremos amino-terminal de las histonas con el DNA (tomado de Watson et al., 2013).

Las HDAC se pueden clasificar en 4 grupos de acuerdo a su función y similitud en la secuencia de DNA (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las Histonas Desacetilasas (Lue, Amengual, & O'Connor, 2015).

Clase HDAC	Subtipo	Cofactor	Homología con levadura	Localización celular
Clase I	HDAC 1, 2, 3 y 8	Zn ²⁺	Rpd3	Núcleo, exceptuando HDAC3 que puede encontrarse citoplasma
Clase IIa	HDAC 4, 5, 7 y 9	Zn ²⁺	Hda1	Núcleo / citoplasma
Clase IIb	HDAC 6 y 10	Zn ²⁺	Hda1	Principalmente citoplasma
Clase III (Sirtuinas)	SIRT 1 – 7	NAD ⁺	Sir2	Núcleo, mitocondria o citoplasma, dependiendo del subtipo
Clase IV	HDAC 11	Zn ²⁺	Hda1 y Rpd3	Núcleo / citoplasma

En cáncer, se ha visto un incremento en los patrones de desacetilación de las histonas, fomentando el silenciamiento de genes supresores de tumor. Este incremento de la desacetilación es producto de una sobre-expresión de las HDAC, la cual ha sido demostrada en varios de tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, colon, estómago, boca, riñón, próstata, ovario, leucemia y linfoma; y a su vez, esta sobre-expresión ha estado ligado a un pobre pronóstico (H. H. Chang et al., 2009; Fritzsche et al., 2008; Hayashi et al., 2010; Patra, Patra, & Dahiya, 2001; Shan et al., 2017; Song et al., 2005; Spurling et al., 2008; Van Damme et al., 2012).

El mecanismo de la metilación del DNA y de la acetilación/desacetilación de histonas están estrictamente relacionados en cuanto al empaquetamiento de la cromatina. La DNMT1 junto con las methyl-binding proteins (MBP), tal como la methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) pueden reclutar las HDAC conllevando a un mayor empaquetamiento de la cromatina, y por tanto reduciendo el acceso de factores transcripcionales al DNA (Nan et al., 1998; Rountree, Bachman, & Baylin, 2000). En la figura 8 se puede observar los cambios conformacionales de la cromatina mediados por las HDAC y DNMTs, donde la heterocromatina se caracteriza por tener el DNA metilado en regiones específicas (principalmente en las regiones promotoras) y las histonas deacetiladas; mientras que la eucromatina se caracteriza por tener el DNA desmetilado (principalmente en las regiones promotoras) y las histonas acetiladas, conllevando a un relajamiento de la cromatina y por tanto a una transcripción activa (Johnstone, 2002).

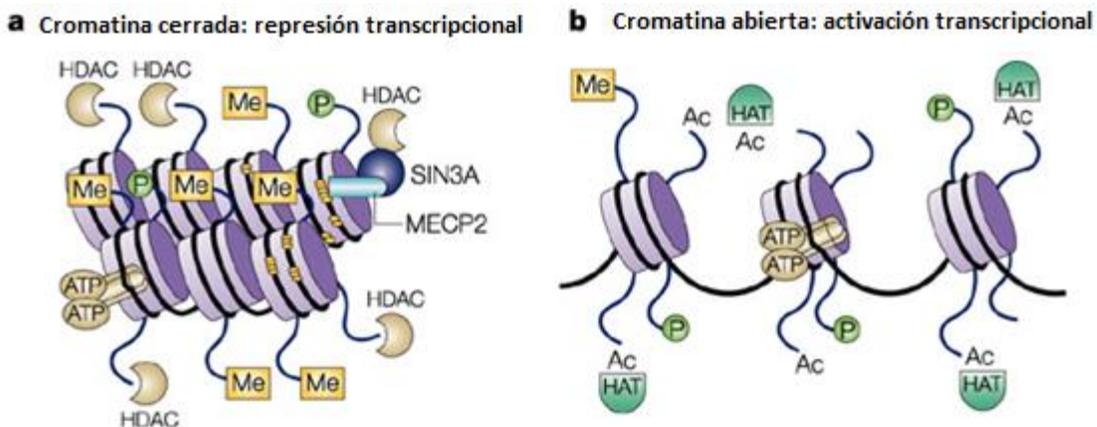


Figura 8. Modificación de histonas y DNA y su relación con el empaquetamiento de la cromatina. **a)** Cromatina cerrada (heterocromatina). La hipermetilación de las citosinas islas CpG de las regiones promotoras, recluta proteínas de enlace metil-CpG, Histonas Desacetilasas y complejos remodeladores de cromatina que fomentan el estado de heterocromatina y, por tanto, de represión transcripcional. **b)** Cromatina abierta (eucromatina). La desmetilación de las citosinas de las islas CpG y la acetilación de las histonas permite la apertura de la cromatina y, por tanto, la RNA polimerasa puede posicionarse sobre la región promotora para activar la transcripción del gen (tomado de Johnstone, 2002).

4. ANTECEDENTES

4.1 Inhibidores de las DNMT

Las DNMT y las HDAC al estar sobre expresadas en varios tipos de cáncer, encontrar inhibidores contra esas enzimas ha sido objeto de estudio en los últimos años en la investigación epigenética. Respecto a los inhibidores de las DNMT, la FDA (Food and Drug Administration) hasta el momento ha aprobado los fármacos *Azacitidina* y *Decitabina* para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS).

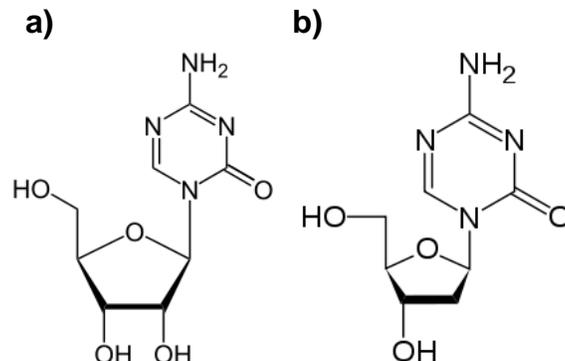


Figura 9. Inhibidores de las DNMTs aprobados por la FDA. **a)** Azacitidina. **b)** Decitabina. La diferencia estructural de estos fármacos respecto a los nucleósidos es la presencia del nitrógeno en la posición 5. Este grupo nitrógeno es el responsable de formar un enlace covalente con la enzima DNMT, inhibiendo su acción.

Estos medicamentos han sido capaces de reactivar genes supresores de tumor mediante la desmetilación de DNA, y han demostrado un fuerte efecto inhibitorio del crecimiento tumoral a nivel *in vitro* e *in vivo* (Bender, Pao, & Jones, 1998). Estos análogos de nucleósidos pueden reactivar un grupo de genes tales como p16, MLH1 y RB que son importantes para el control de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis; pueden aumentar la quimiosensibilidad por activar genes reparadores, incrementar la adhesión de las células por expresar E-cadherin,; mejorar la respuesta a interferones por activación de transposones y mejorar la inmunogenicidad por reactivar antígenos tumorales (figura 10) (C. Yoo & Jones, 2006). Como son análogos de nucleósidos, su mecanismo de acción es incorporarse al DNA capturando las DNMT e impidiendo que metilen las citosinas diana. El problema que presentan estos medicamentos es que pueden llegar a inhibir la replicación de DNA y afectar la modificación postraducciona de histonas, por lo que es necesario encontrar nuevos inhibidores de las DNMTs que no sean análogos de nucleósidos.

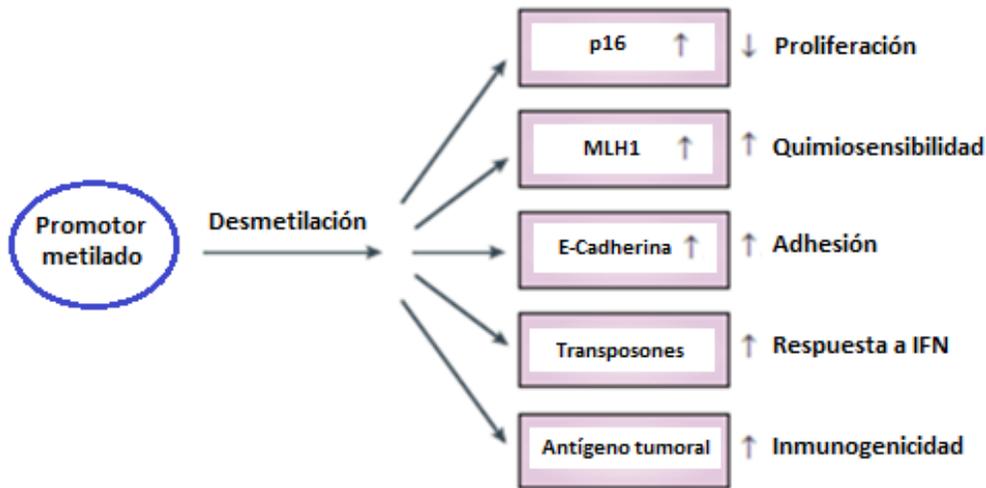


Figura 10. Función de los inhibidores de las DNMTs. Los inhibidores de las DNMTs generan una desmetilación de las citosinas de las islas CpG de las regiones promotoras, y esta desmetilación ha estado relacionada con una disminución de la proliferación, e incremento de la quimiosensibilidad, adhesión, respuesta a interferones e inmunogenicidad (tomado de C. Yoo & Jones, 2006).

La **hidralazina** también conocida como apresolina, ha sido utilizada para el manejo de desórdenes hipertensivos y problemas del corazón, y actualmente, su uso está limitado a los desórdenes hipertensivos durante el embarazo (Dueñas González et al., 2014). Uno de los primeros estudios relacionados con la posible inhibición de las DNMT mediante la hidralazina, fue realizado por (Deng et al., 2003) en donde se demostró que este fármaco fue capaz de disminuir los niveles de mRNA de la DNMT1 y DNMT3a e inducir autoinmunidad por inhibir la vía de señalización de cinasas reguladas por señales extracelulares. Paralelo a esto, nuestro grupo de investigación demostró que la hidralazina tenía efecto desmetilante sobre el DNA y su acción reactivaba los genes supresores de tumor ER (receptor de estrógeno), RAR β (receptor Beta del ácido retinoico) y p16 en un modelo *in vitro*, y en un modelo *in vivo* la hidralazina logró reactivar el gen ER. Se determinó también que el tratamiento con hidralazina oral desmetiló y re-expresó el gen RAR en pacientes con cáncer cervical y de cabeza (Segura Pacheco et al., 2003). Con base en lo anterior, con la ayuda del acoplamiento molecular, se demostró que la hidralazina era capaz de interactuar de una forma estable con los residuos de Lisina-162 y la Arginina-240 del sitio activo de la enzima DNMT (Angeles et al., 2005), reforzando la idea de usarlo como droga reposicionada para el tratamiento epigenético del cáncer. En estudios posteriores, de manera interesante, se demostró que la hidralazina fue capaz de revertir el fenotipo de resistente a la doxorubicina en un modelo de MCF-7, mediante la desmetilación del DNA (Segura Pacheco et al., 2006). Además, se ha demostrado que puede potencializar el efecto de los inhibidores de HDAC usándolos en combinación (ver terapia epigenética combinada).

Uno de los puntos importantes a destacar, es que la hidralazina al no ser análogo de nucleósido, es menos tóxica que los fármacos ya aprobados por la FDA, como azacitidina y decitabina.

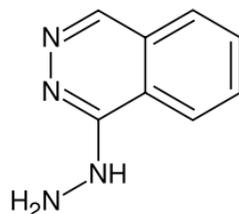


Figura 11. Estructura de la Hidralazina.

4.2 Inhibidores de las HDACs

En cuanto a los inhibidores de HDAC, hasta el momento la FDA ha aprobado el uso y comercialización de los medicamentos *Vorinostat* (linfoma cutáneo de células T), *Romidepsin* (linfoma cutáneo de células T y linfoma de células T periférico), *Belinostat* (linfoma de células T periférico) y *Panobinostat* (mieloma múltiple).

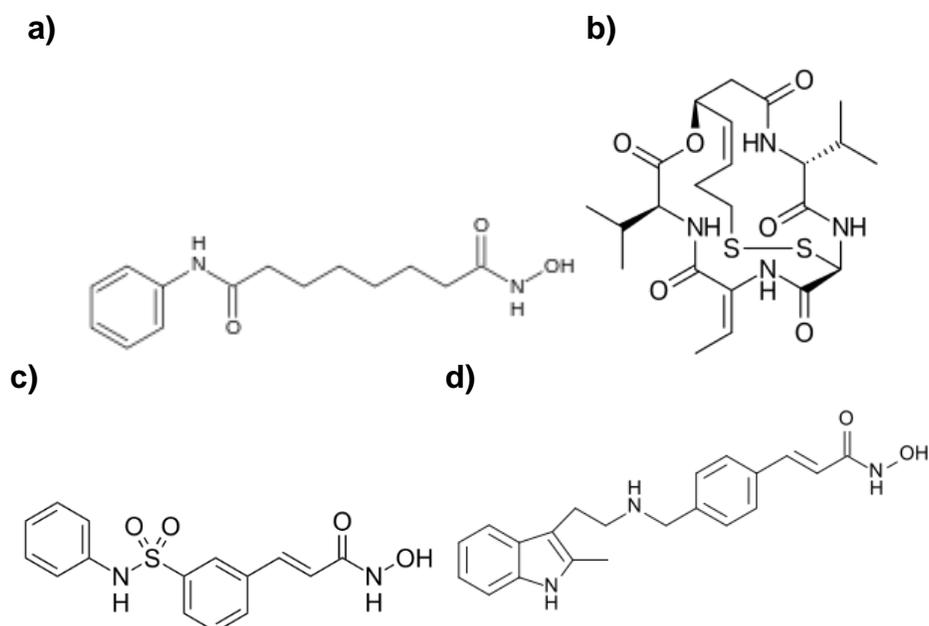


Figura 12. Inhibidores de las HDACs aprobados por la FDA: *Vorinostat* (a), *Belinostat* (c) y *Panobinostat* (d) son ácidos hidroxámicos, mientras que *Romidepsin* (b) es un tetrapéptido cíclico.

La función de esos fármacos es inducir la hiperacetilación de histonas, reactivar genes supresores de tumor e inhibir el crecimiento tumoral y la supervivencia mediante efectos pleiotrópicos (Johnstone, 2002). Varias investigaciones soportan que estos inhibidores son capaces de inducir el arresto del ciclo celular, diferenciación y/o apoptosis, inhibir la angiogénesis, incrementar la

inmunogenicidad y actuar como sensibilizantes de las células cancerígenas para el tratamiento con quimioterapia y radioterapia (Johnstone, 2002).

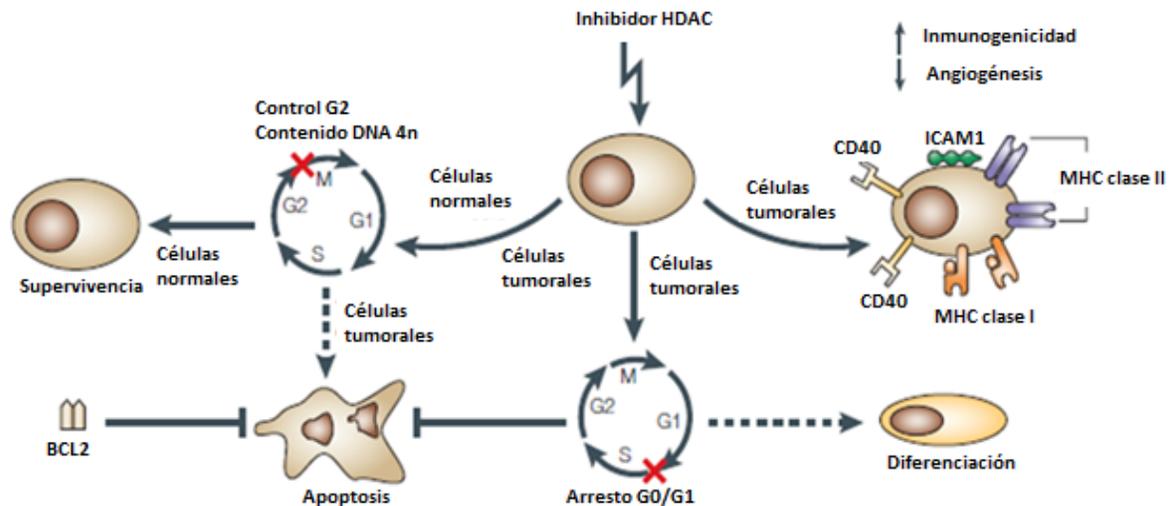


Figura 13. Esquema básico de la acción de los inhibidores de las HDAC. Los inhibidores de HDAC pueden inducir arresto del ciclo celular (en G0/G1 principalmente, o menos común en G2/M, apoptosis, diferenciación. Además, pueden incrementar la inmunogenicidad así como disminuir la angiogénesis (tomado de Johnstone, 2002).

Dentro de los inhibidores de HDAC, el **valproato de magnesio** conocido también como 2-propilpentanoato de magnesio, es un ácido graso de cadena corta que ha sido empleado como anticonvulsivo en el tratamiento contra la epilepsia (por más de 40 años) y desórdenes bipolares. En 2001, Göttlicher et al. descubrieron por primera vez que el ácido valproico tenía función inhibitoria sobre las HDAC y era capaz de inducir la hiperacetilación de los extremos amino-terminal de las histonas 3 y 4 de forma *in vitro* e *in vivo* (Göttlicher et al., 2001). Estudios posteriores demostraron que el valproato inhibe específicamente las HDAC Clase I: 1-3 y HDAC Clase II Subclase I: 4, 5 y 7 (Gurvich, Tsygankova, Meinkoth, & Klein, 2004). Esta inhibición de las HDAC ha hecho que de forma *in vitro* e *in vivo*, el valproato presente un potente efecto antitumoral por modular múltiples rutas, incluyendo el arresto del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, metástasis, diferenciación y senescencia (Blaheta, Michaelis, & Driever, 2005; Göttlicher et al., 2001) y sus efectos son específicos del tipo celular, nivel de diferenciación y alteraciones genéticas presentes (Göttlicher et al., 2001). En estudios posteriores se demostró que el valproato altera el estado de acetilación de genes responsables del crecimiento tumoral y metástasis, tales como el Merlanoma Antigen B2 Gene (MAGEB2), metaloproteínase (MMP2) y WIF1. En esta investigación, se sugirió que la acetilación de la cromatina y la metilación del DNA pueden estar interrelacionadas dinámicamente (Milutinovic, C.D' Alessio, Detich, & Szyf, 2007). En otros estudios, el valproato ha demostrado reducir en cáncer de mama una serie de proteínas estructurales de mantenimiento de la cromatina (SMC), proteínas asociadas a SMC, DNMT y proteínas de la heterocromatina, que conllevan a la descondensación de la cromatina, incrementando la sensibilidad del DNA a nucleasas y a la interacción del DNA con agentes intercaladores (Marchion, Bicaku, & Daud, 2005). En

neuroblastoma, el ácido valproico además de tener efecto antitumoral, tuvo la capacidad de revertir la metilación aberrante del DNA, incrementando así la metilación global (disminuyendo la expresión del oncogén MYCN) e hipometilando los promotores de los genes supresores de tumor THBS1 y RASSF1A, lo que indica que el valproato realiza una redistribución de los patrones de metilación favorables para la inhibición del tumor (Gu et al., 2012). Además, se ha visto que el valproato es capaz de inducir hiperacetilación de p53, la expresión de genes target para p53, y marcadores de la ruta intrínseca de apoptosis en un modelo murino. Observando de esta manera una disminución de Survivin/Birc5 y Bcl2, así como un incremento de p21/Cdkn1a, caspasa 9 y 3 (Paradis & Hales, 2015).

Respecto a los otros inhibidores de HDAC, el ácido valproico tiene buena tolerabilidad y su seguridad ha sido demostrada a lo largo de los 35 años que se ha usado para terapia crónica de desórdenes bipolares (Loscher, 2002).

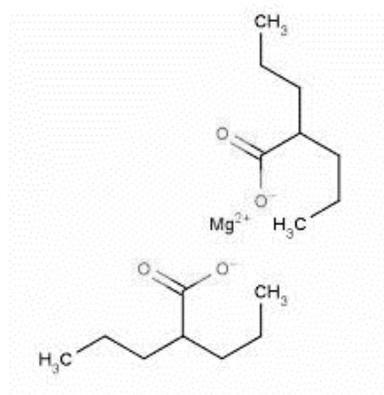


Figura 14. Estructura del Valproato de Magnesio. Este fármaco es un ácido graso de cadena corta.

4.3 Terapia epigenética combinada

Un problema que tienen los inhibidores de HDAC es que sólo afectan directamente la transcripción de un 10% de los genes, por esto, dichos inhibidores no son eficaces como agentes únicos para reactivar de forma significativa los genes supresores de tumor silenciados epigenéticamente, sino que necesitan de un colaborador como un inhibidor de las DNMT para incrementar su acción antitumoral (Johnstone, 2002). Esto se basa en la estricta relación que tienen las HDAC y las DNMT para fomentar el estado de heterocromatina y reprimir la expresión génica. Es por esta razón, que usando inhibidores de DNMT y HDAC en combinación ha tomado importancia en la terapia epigenética en los últimos años (C. Yoo & Jones, 2006).

Basándose en las propiedades de dicha combinación, nuestro laboratorio logró patentar el **Transkrip** como el primer fármaco epigenético que combina un inhibidor de HDAC y un inhibidor de las DNMT y ha demostrado tener efecto sinérgico antitumoral y la capacidad de reactivar genes supresores de tumor en varios sistemas modelo (Chávez et al., 2006). Este medicamento fue aprobado por la COFEPRIS para su comercialización y uso en el carcinoma cervicouterino

avanzado; y fue asignado por la FDA como droga huérfana para síndrome mielodisplásico y linfoma cutáneo de células T (Dueñas González et al., 2014; Santillán, 2012). Además, estudios preliminares fase II han demostrado que el Transkrip en combinación con quimioterapia y/o radioterapia presenta un prometedor efecto antitumoral en un número de tumores sólidos, entre ellos en cáncer cervical, de mama y de ovario (Dueñas González et al., 2014) (ver terapia epigenética contra los linfomas).

4.4 Terapia epigenética en linfomas

Existen varias investigaciones que soportan que los linfomas de tipo T, B, NK y linfoma de Hodgkin presentan genes supresores de tumor que fueron silenciados por hipermetilación en las islas CpG de sus regiones promotoras, tales como genes reguladores del ciclo celular (p15, p16, p57), genes pro-apoptóticos (p73, Caspasa 8, DAPK, Apaf 1), genes de reconocimiento y adhesión celular (CDH13), reparadores de errores de DNA (hMLH1), entre otros (CFHR, MGMT, TMS1 y DLCE1) (Baur et al., 1999; Clozel et al., 2013; Q. Huang, Ai, Zhang, Fan, & Weiss, 2004; Lue et al., 2015; Martin-Subero et al., 2009; O'Riain et al., 2009). Además, se han encontrado otros genes supresores de tumor tales como BCL7 α , PTPRG silenciados específicamente en linfoma cutáneo de células T (Van Doorn, Zoutman, & Dijkman, 2005).

Esta hipermetilación como se mencionó anteriormente, está sujeta a la sobre-expresión de las DNMT. En linfomas específicamente, las enzimas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b se han encontrado sobre-expresadas en pacientes con Linfoma no Hodgkin de células B (B-NHL), tal como Linfoma Burkitt y Linfoma Difuso de Células B Grandes (DLBCL), y de hecho, la sobre-expresión de DNMT3b fue relacionada con un menor tiempo de supervivencia global y supervivencia de libre progresión en pacientes con DLBCL (Amara et al., 2010; Robaina et al., 2015).

En cuanto a linfomas de células T, se ha demostrado que la enzima DNMT1 es clave para el desarrollo de la linfomagénesis y la proliferación celular en un modelo *in vivo*, ya que la inactivación de dicha enzima conllevó rápidamente a las células T a apoptosis, indicando que la DNMT1 es fundamental para el mantenimiento de dichos linfomas, y contribuye a la metilación aberrante tanto metilación de *ново* como de mantenimiento (Peters et al., 2013).

Respecto a las HDAC, las HDAC 1, -2 y -3 se han encontrado sobre-expresadas en CTCL y su presencia fue esencial para la proliferación celular y supervivencia (Rangwala, Zhang, & Duvic, 2012). Dentro de este grupo, la HDAC 2 estuvo relacionada con CTCL más agresivo que indolente (L Marquard et al., 2008). En otros estudios, las HDAC 1, -2, -6 se encontraron sobre-expresadas en PTCL y DLBCL en comparación con tejido linfoide normal (Lena Marquard et al., 2009). Respecto a la HDAC 9, se ha encontrado sobre-expresada en linfomas de células B, siendo un agente promotor de la linfomagénesis y relacionándose con un DLBCL más agresivo (Gil et al., 2016).

Basándose en lo anterior, se han realizado una serie de estudios empleando inhibidores de DNMT y HDAC como agentes únicos y en combinación. Entre los que destacan usando inhibidores de HDAC como agentes únicos, fue uno realizado por L Marquard et al. (2008), donde se demostró que los inhibidores: vorinostat, panobinostat, belinostat y romidepsin mostraron efecto antitumoral en pacientes con linfoma cutáneo de células T, teniendo respuestas parciales y completas, y presentando igual eficacia en etapas indolentes y avanzadas. Respecto a linfoma de células B, son menores los reportes de tratamientos epigenéticos a diferencia de linfomas de células T, y entre los pocos se ha visto que vorinostat ha demostrado tener un limitado efecto antitumoral en estudio fase II en DLBCL (Crump et al., 2008).

En cuanto a los estudios usando la combinación de inhibidores de HDAC y DNMT en linfomas, han mostrado resultados prometedores. Por ejemplo, se demostró que la combinación de decitabina (DNMTi) y vorinostat (HDACi) presentó un efecto sinérgico antitumoral en líneas de linfoma de células de manto (células B) (Leshechenko et al., 2010). En estudios complementarios, se observó que la combinación de decitabina + vorinostat, panobinostat, belinostat o romidepsin presentó un efecto sinérgico contra DLBCL, indujo significativamente apoptosis vía caspasa 3, y generó un perfil único de expresión con los fármacos en combinación (DNMTi + HDACi) que por separado, siendo los genes alterados únicamente por la combinación: VHL, TECB1, WT1 y DIRAS3. Este perfil único de expresión usando decitabina + panobinostat refleja el efecto sinérgico que presenta la combinación de HDACi + DNMTi (Kalac et al., 2011).

Además, en un estudio similar al anterior, se determinó que la combinación de un inhibidor de DNMT (decitabina) más un inhibidor de HDAC (panobinostat, belinostat, romidepsin o vorinostat) presentó un efecto sinérgico antitumoral contra CTCL *in vitro*, induciendo significativamente apoptosis; y en un modelo *in vivo*, se observó que la combinación de belinostat y decitabina fue sinérgica, disminuyendo significativamente el volumen tumoral (figura 16) (Enrica Marchi et al., 2015). En esta misma investigación, mediante análisis de microarreglos de expresión, se encontró que la combinación de romidepsin y decitabina induce la expresión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular, cascadas de proteína cinasas, respuesta de daño celular, morfogénesis, organogénesis; mientras que los genes que disminuyeron su expresión fueron involucrados en metabolismo y biosíntesis de lípidos y proteínas (Enrica Marchi et al., 2015). Además, se observó que la combinación de decitabina + romidepsin incrementó el número de genes target que cambiaron su expresión significativamente: decitabina como agente único (9 genes), romidepsin (15 genes), decitabina + romidepsin (390 genes). Mediante un estudio de metilación global, se determinó que la decitabina era el agente que inducía los cambios de metilación principalmente (175 genes), mientras que romidepsin como único agente no inducía dichos cambios, y en combinación, sólo hay una ligera diferencia respecto a decitabina sólo. Respecto a la correlación de los estudios de metilación y expresión global se encontraron 5 genes que cambiaron significativamente su expresión y su grado de metilación, aunque ninguno de ellos

está asociado con una actividad anti-proliferativa en la literatura (Enrica Marchi et al., 2015).

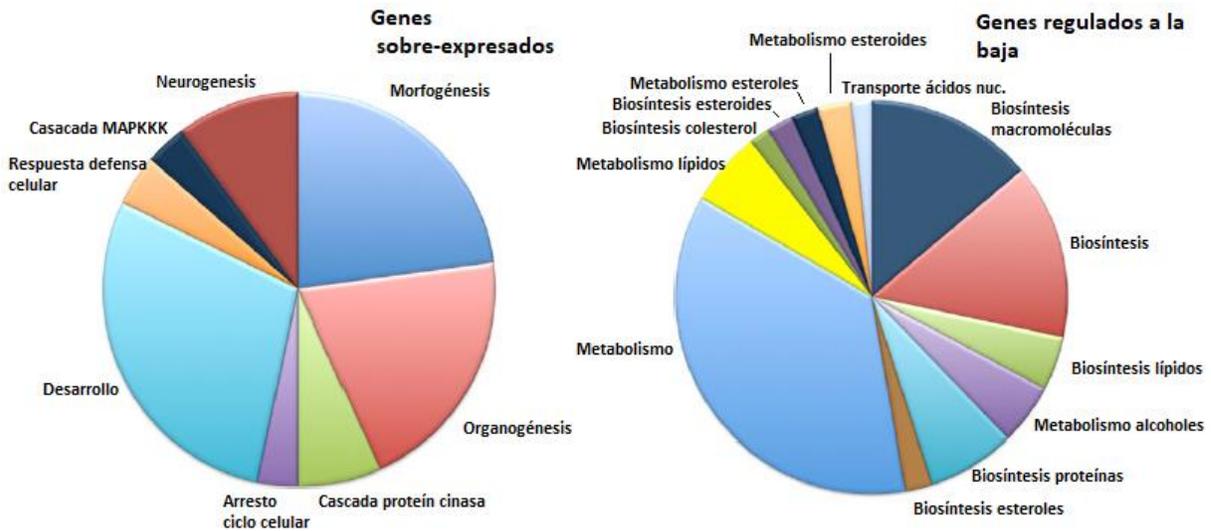


Figura 15. Genes diferencialmente expresados en CTCL post-tratamiento. Dentro de las vías involucradas en los genes sobre-expresados se destacan el arresto del ciclo celular, respuesta de defensa celular, cascadas MAPKKK y organogénesis. Por otro lado, los genes regulados a la baja involucraron vías tal como metabolismo de ácidos grasos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, tanto de rutas biosintéticas como catabólicas (tomado de Enrica Marchi et al., 2015)

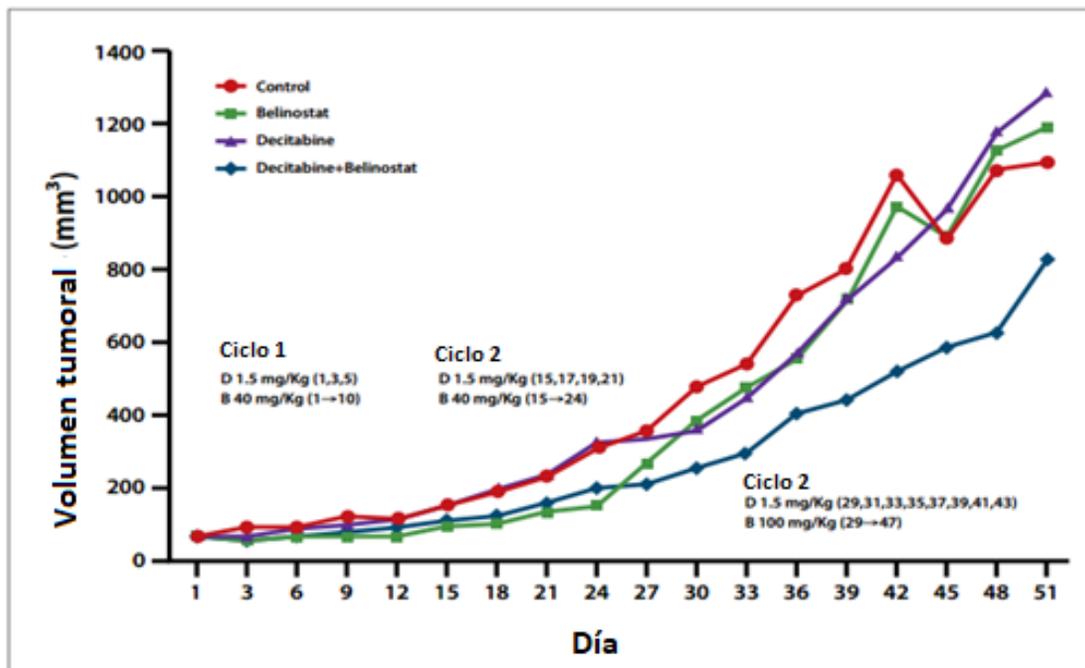


Figura 16. Efecto antitumoral de la combinación HDACi + DNMTi en CTCL in vivo. La combinación de Decitabina (DNMTi) y Belinostat (HDACi) tuvieron un efecto antitumoral aún mayor que los fármacos por separado (tomado de Enrica Marchi et al., 2015).

En nuestro laboratorio se realizó un estudio clínico fase I con un paciente refractario con CTCL al cual se le otorgó TRANSKRIP (valproato + hidralazina), y presentó una respuesta muy favorable al tratamiento, reduciendo también sus niveles de prurito.

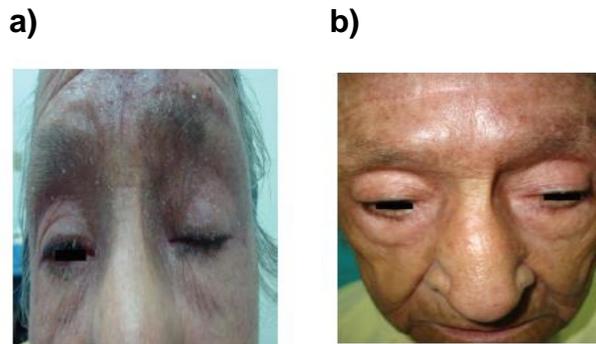


Figura 17. Estudio fase I del suministro de hidralazina-valproato a paciente con micosis fungoide (subtipo de CTCL). **a)** Pre-tratamiento. **b)** Post-tratamiento. La paciente presentó una mejora considerable debido al tratamiento, reduciendo sus niveles de prurito (tomado de Dueñas-González et al., 2010).

En un estudio fase II con 14 pacientes con micosis fungoide (CTCL), se determinó que la combinación de hidralazina – valproato fue segura (sin presencia de toxicidad nivel 3 o 4) y el 70 % de los pacientes presentaron respuesta positiva al tratamiento, 50 % tuvieron respuesta completa y 20 % remisión parcial. En cuanto a los niveles de prurito, 13 pacientes presentaron mejoras significantes en todo su cuerpo (figura 18) (Espinoza-Zamora et al., 2017). Estos resultados indican que esta combinación puede convertirse en un importante tratamiento contra CTCL, y es necesario tanto realizar un estudio fase III como comprender las bases moleculares de dicho efecto antitumoral.



Figura 18. Estudio Fase II de la combinación de hidralazina-valproato en pacientes con micosis fungoide. Arriba; pretratamiento. Abajo: post-tratamiento. Los pacientes presentaron una disminución significativa de los niveles de prurito (tomado de Espinoza-Zamora et al., 2017).

Con base en eso, en nuestro laboratorio se comenzó a indagar a nivel *in vitro* sobre el papel de la combinación de hidralazina y valproato sobre células HUT 78 (CTCL) y demostró tener un efecto antitumoral significativo, donde se observó que las dosis

1 mM de valproato – 10 μ M de hidralazina ampliamente utilizadas en estudios previos con estas drogas (Chavez-Blanco et al., 2006) fueron efectivas en la reducción de la viabilidad. De igual manera, a dosis incrementadas tal como 3 mM valproato – 35.45 μ M se potencializó aún más este efecto antitumoral observado (resultados no publicados). Por esta razón, en este proyecto de investigación, se va a indagar si esta combinación de fármacos presenta un efecto antitumoral en líneas de linfoma B (Raji y Toledo), así como elucidar los procesos celulares por los cuales se lleva a cabo este efecto.

5. JUSTIFICACIÓN

Los inhibidores de las DNMT y de HDAC en combinación han mostrado tener efecto sinérgico antitumoral en linfomas de células T y B a nivel preclínico y clínico. Específicamente, la hidralazina (DNMTi) y el valproato (HDACi) han sido efectivos y bien tolerados para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T, aunque los mecanismos moleculares permanecen desconocidos y su efecto aún no ha sido evaluado para Linfomas no Hodgkin de células B. Por esta razón, es importante ampliar su campo de estudio frente a líneas de linfoma B, así como elucidar los procesos celulares involucrados mediante la evaluación de apoptosis, arresto del ciclo celular, y cambios de expresión del genoma completo.

6. HIPÓTESIS

La hidralazina-valproato en combinación muestran eficacia antiproliferativa y se relaciona con los cambios de expresión en líneas celulares de linfoma.

7. OBJETIVOS

7.1 GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo de la combinación de hidralazina-valproato en líneas celulares de linfomas y correlacionar su eficacia con los cambios de expresión global.

7.2 ESPECÍFICOS

- a)** Evaluar la viabilidad celular de las líneas de linfoma (Hut 78, Raji, Toledo) post-tratamiento con valproato-hidralazina.
- b)** Determinar apoptosis y arresto del ciclo celular de las líneas mencionadas post-tratamiento por citometría de flujo.
- c)** Identificar los cambios de expresión global de las líneas Hut 78 y Raji post-tratamiento mediante microarreglos.
- d)** Validar los resultados de los microarreglos por qRT-PCR.

8. METODOLOGÍA

8.1 Cultivo Celular

Se realizó el cultivo de las líneas celulares de linfoma: Toledo (DLBCL), RAJI (Linfoma Burkitt) y HUT 78 (CTCL), las cuales fueron obtenidas de ATCC. Cada línea celular se descongeló, estabilizó a temperatura ambiente y se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. Se realizaron los respectivos cultivos a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂, empleando como medio de cultivo medio RPMI-1640 suplementado con 10% de Suero fetal bovino y 1 % de antibiótico-antimicótico (medio RPMI completo).

8.2 Ensayos de viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular de las líneas mencionadas con valproato de magnesio e hidrocloreuro de hidralazina, en combinaciones de 1 mM valproato – 10 µM hidralazina y 3 mM valproato – 35.4 µM hidralazina (previamente mencionadas, ver sección: terapia epigenética en linfomas) a tiempos de exposición de 24, 48, 72, 120 y 168 h; cambiando el medio de cultivo y los fármacos cada 24 h. Se hicieron los ensayos en placas de 6 pozos (3 controles y 3 tratados), sembrando 100,000 células para cada pozo en un volumen de 3 mL de medio RPMI completo. Se realizó el conteo celular usando Azul de tripano mediante un contador automático T10 Automated Cell Counter (Referencia:145-010).

El procedimiento se realizó por triplicado interno y en tres experimentos independientes.

8.3 Apoptosis

Este ensayo se realizó con Anexina V FITC para las 3 líneas celulares. Para cada línea celular se sembraron 1X10⁶ células en 5 mL, en cajas de 25 mL. Todos los experimentos fueron realizados empleando la combinación de 1 mM valproato – 10 µM hidralazina -la cual es la dosis ampliamente utilizada en estudios previos con varias líneas tumorales (Chavez-Blanco et al., 2006) y usando un tiempo de exposición de 72 h para Hut 78 (con el fin de completar un ciclo completo de esta línea, que es de 65 h), y de 48 h para Toledo y Raji (los cuales tienen tiempos de división celular de 24-30 h).

Después del tratamiento, se obtuvieron los pellets por centrifugación a 1200 rpm por 5 min y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, se resuspendieron en Binding Buffer 1X a una concentración de 1X10⁶ células/mL. Se transfirieron 100 µL de la suspensión (1X10⁵ células) a un tubo de cultivo 5 mL. Se añadieron 5 µL de FITC Anexina V y 5 µL de IP (yoduro de propidio). Se agitó suavemente y se incubó por 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron 400 µL de Binding Buffer 1X a cada tubo. Se analizó por citometría de flujo (citómetro BD FACSCanto II). Se capturaron 10,000 eventos.

Para el análisis de los datos, se empleó el programa GraphPad Prism6, utilizando t-student no apareada para el análisis estadístico. Se consideró como significativo una $p \leq 0.05$. El procedimiento se realizó por triplicado interno y en tres experimentos independientes.

Notas:

- Para el control positivo de apoptosis se empleó luz UV, a un tiempo de exposición de 20 min.
- Se utilizaron controles de la siguiente manera: Control sin teñir, Control + Anexina, Control + IP, Control positivo: UV + Anexina + IP.

8.4 Ciclo celular

Al igual que para los ensayos de apoptosis, para cada línea celular se sembraron 1×10^6 células en 5 mL, en cajas de cultivo de 25 mL. Las dosis empleadas fueron 1 mM valproato – 10 μ M hidralazina, y se trataron por 72 h para las células Hut 78 y 48 h para las células Raji y Toledo.

Una vez pasado el tiempo de exposición, se recolectaron los pellets y se les agregó 200 μ L de solución A. Se mezclaron por inversión suave por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ L de solución B y de nuevo se mezclaron por inversión. Después de 10 minutos, se adicionaron 200 μ L de solución C en hielo y oscuridad. Se mezclaron las soluciones y se cubrieron con aluminio para la protección del yoduro de propidio. Se incubaron por 15 minutos y se analizaron por citómetro de flujo (citómetro BD FACSCanto II). Se capturaron 20,000 eventos.

Para el análisis de los datos, se empleó el programa GraphPad Prism6, utilizando t-student no apareada para el análisis estadístico. Se consideró como significativo una $p \leq 0.05$. El procedimiento se realizó por triplicado interno y en tres experimentos independientes.

Materiales:

- Buffer de citrato: Sacarosa (250 mM), Citrato trisodio dihidratado (40 mM), DMSO. pH:7.6.
- Solución Stock: Citrato de sodio dihidratado (3.4 mM), NP40 (0.1% v/v), Tetrahidrocloreuro de spermina (1.5 mM), Tris (0.5 mM) y agua destilada para volumen final de 250 mL.
- Solución A: Solución stock (50 mL), tripsina (1.5 mg). pH 7.6.
- Solución B: Solución stock (50 mL), inhibidor de tripsina (25 mg), Ribonucleasa A (5 mg). pH 7.6.
- Solución C: Solución stock (50 mL), yoduro de propidio (20.8 mg), tetrahidrocloreuro de spermina (58 mg). pH 7.6.

8.5 Extracción de RNA.

Con el fin de realizar los microarreglos de expresión para las células Raji y Hut 78, se realizó la extracción de RNA empleando el reactivo TRIzol. Para cada línea celular se sembraron 1×10^6 células en 5 mL, en cajas de 25 mL. Los tratamientos fueron realizados empleando la combinación de 0.45 mM valproato – 29.94 μ M hidralazina (dosis que tuvieron un efecto sinérgico contra la línea celular Hut 78, las cuales fueron recién identificadas en un proyecto paralelo a éste, por lo que se decidió usarlas para potenciar el efecto antiproliferativo de estos fármacos), con un tiempo de exposición de 72 h para las células Hut 78 y 48 h para las células Raji. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Pasado el tiempo de exposición, se recolectaron los botones celulares y se lisaron con 1 mL de TRIzol. Se incubaron las muestras por 5 minutos en hielo y se le agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó e incubó en hielo por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 11000 rpm por 15 min a 4°C. Las fases acuosas fueron transferidas a un tubo nuevo y se le agregaron 500 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron a 11000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantaron los sobrenadantes, y se lavaron con 1 mL de etanol al 70 %. Se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente y finalmente se disolvieron en agua libre de RNAsas (el volumen dependió del tamaño del botón celular). Las muestras de RNA fueron almacenados a -70°C.

8.6 Microarreglos de expresión

Los microarreglos de expresión fueron realizados empleando el kit Human Gene 2.0 de Affymetrix, en la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para las líneas celulares Raji y Hut 78. Se realizaron los microarreglos con los mRNAs extraídos en el paso anterior, donde cada muestra fue realizada por triplicado, en total se entregaron 12 muestras al INMEGEN, 6 muestras (3 controles y 3 tratados, de un mismo tipo de tratamiento) para cada línea celular. La calidad de los RNAs fue evaluada por electroforesis capilar (Agilent2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). A partir de 200 ng de RNA se realizó su respectiva síntesis de cDNA, amplificación, y perfiles de expresión génica utilizando el kit WT PLUS Reagent para las muestras frescas (Affymetrix, Santa Clara, EEUU). Los procesos de lavado y teñido fueron realizados con el kit GeneChip Hybridization en el GeneChip Fluid Station 450. Los arreglos de sondas fueron escaneados usando el GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, USA). Las intensidades de las señales de los arreglos fueron analizadas con Transcryptome Analysis Console de Affymetrix (TAC, versión 4.0). Para ello, las sondas de los datos crudos fueron normalizados usando Robust Multichip Analysis (RMA) para la corrección del background y el algoritmo quantile.

Para el análisis de los datos, las condiciones en las cuales se realizaron los filtros de selección de genes fueron: veces de cambio (o fold change): < -1.4 y > 1.4 . $p <$

0.05. FDR $p < 0.05$. Mediante el mismo programa TAC, versión 4.0 se obtuvieron los volcano plot, hierarchical clustering, y empleando la herramienta wikipathways se obtuvieron las vías involucradas en los procesos, con los respectivos genes sobre-expresados y regulados a la baja, así como los valores de significancia y valor de p .

Para la obtención de las tablas 5 y 6, donde se clasificaron los genes sobre-expresados y regulados a la baja, acorde a su ruta, valor de significancia y valor de p , se tomó como criterio de clasificación aquellas rutas que tenían un valor de $p < 0.05$ y tenían un # total de genes > 5 , con el fin de representar sólo las rutas estadísticamente significativas y que tengan un número considerable de genes participantes. Posteriormente, se realizó una comparación de los genes sobre-expresados y regulados a la baja para las células Raji y Hut 78 utilizando el programa online Venny (figura 31, tabla 7, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>, 2017)

8.7 Validación de los microarreglos mediante qRT-PCR

Se volvieron a extraer nuevos mRNA realizando las mismas condiciones de los ensayos explicados anteriormente para cada línea celular. Se sintetizaron los respectivos cDNA utilizando el kit: “GeneAmp RNA PCR Core Kit”, (Applied Biosystems, USA)” siguiendo las indicaciones del protocolo. Para el diseño de los primers, se utilizó el programa online IDT (Integrated DNA Technologies), mediante la herramienta PrimerQuest. <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>

Los genes que se validaron fueron tres en total. FASN (Sense: 5'-GTT CTG GGA CAA CCT CAT C-3'; Antisense: 5'-CGA AGA AGG AGG CAT CAA-3') y SCD (Sense: 5'-GGG ATC CTT CAG CAC AGG AA-3'; Antisense: 5'-CAC CGC TTC TCC AAT GGA TT-3') para la línea celular Hut 78. STAT1 (Sense: 5'-ATG CTG GCA CCA GAA CGA AT-3'; Antisense: 5'-GCT GGC TGA CGT TGG AGA TC-3') para la línea celular Raji.

Las relaciones relativas de mRNA para el gen 18S housekeeping fue calculado para la estandarización de los niveles de expresión génica. Hprt fue amplificado usando los siguientes primers: Sense: 5'-GAA CCT CTC GGC TTT CCC G-3'; Antisense: 5'-CAC TAA TCA CGA CGC CAG GG-3'. Las reacciones SYBR Green fueron llevadas a cabo usando: “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) Reagents kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las indicaciones del protocolo. Antes de realizar la qRT-PCR, se realizó una reacción de optimización para el par específico de primers para confirmar la especificidad de la señal de amplificación. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo/10min/95°C; 40 ciclos/30s/95°C, 30s/60°C u 30s/72°C. Los cambios de fluorescencia fueron grabados cuando la temperatura fue incrementada de 65 a 95°C a la tasa de 0.2°C/s, para obtener la curva de fusión. Se realizó el análisis de los datos utilizando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrita por Livak de la siguiente manera: Cantidad de gen blanco = $2^{-\Delta\Delta CT}$. El análisis estadístico se realizó utilizando t-student. $p < 0.05$ se consideró significativo.

9. RESULTADOS

Los resultados de viabilidad del tratamiento combinado de valproato-hidralazina para las líneas celulares Hut 78, Raji y Toledo se muestran en las figuras 19 y 20, en donde se emplearon dos combinaciones de dosis: valproato 1 mM – hidralazina 10 μ M y valproato 3 mM – hidralazina 35.4 μ M, respectivamente. Se puede observar que las dos combinaciones de dosis presentaron un efecto antiproliferativo en las tres líneas de linfoma seleccionadas, siendo su efecto tiempo-dependiente y dosis-dependiente en cada una de ellas. En la figura 19 podemos observar que las líneas celulares Raji y Toledo lograron una completa reducción de su viabilidad a las 168 h, a diferencia de la línea celular Hut 78, la cual fue más resistente y sostuvo su viabilidad en 32 %.

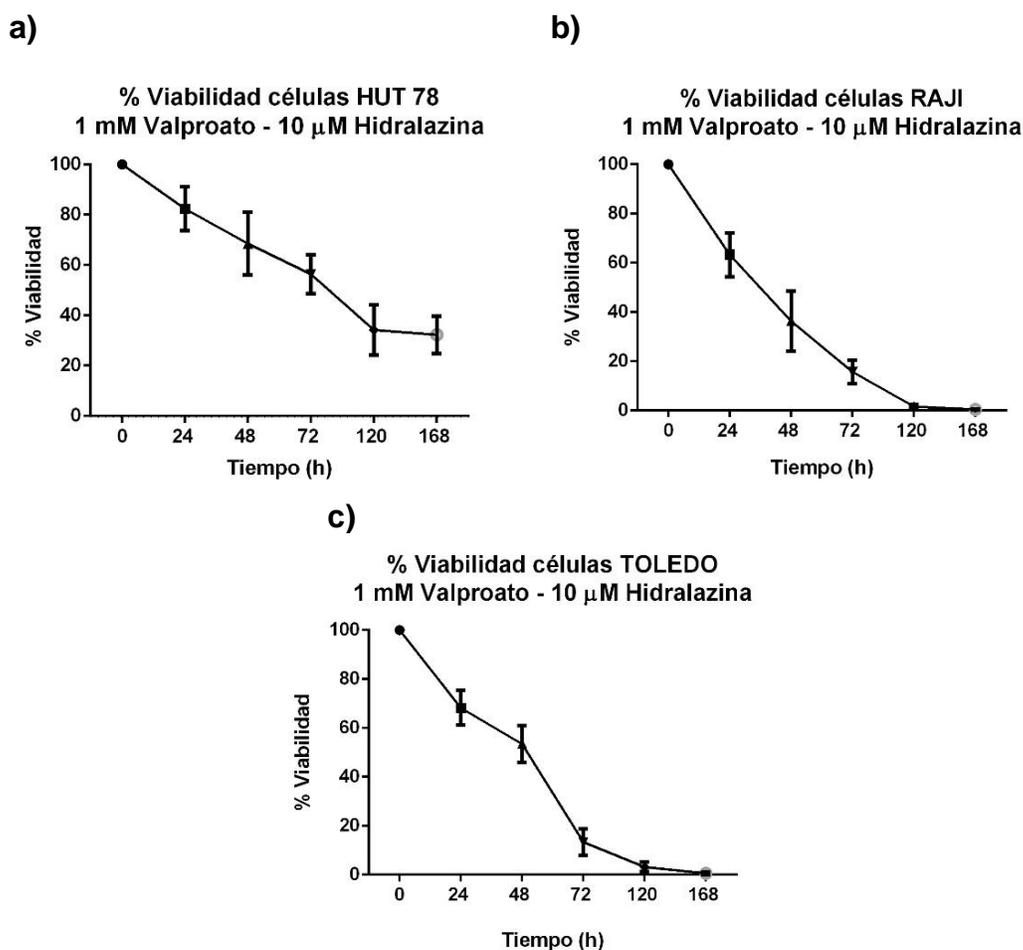


Figura 19. Resultados de viabilidad para las líneas celulares tratadas con valproato 1 mM e hidralazina 10 μ M. **a)** Hut 78. **b)** Raji. **c)** Toledo. Los tratamientos están normalizados con respecto a su control. Se observa una disminución en el porcentaje de células vivas del tratamiento respecto a su control, debido a la acción de los fármacos a lo largo del tiempo. Las líneas de linfoma B fueron más sensibles al tratamiento que la línea de linfoma T. Las gráficas indican que el efecto de los fármacos fue tiempo dependiente.

A pesar de que la línea celular Hut 78 fue más resistente, a una dosis tres veces mayor (figura 20) se logró una completa reducción de su viabilidad a 120 h. Además, a estas dosis, las células Toledo fueron ligeramente más sensibles que las células Raji, logrando una completa reducción de la viabilidad a 72 y 120 h, respectivamente.

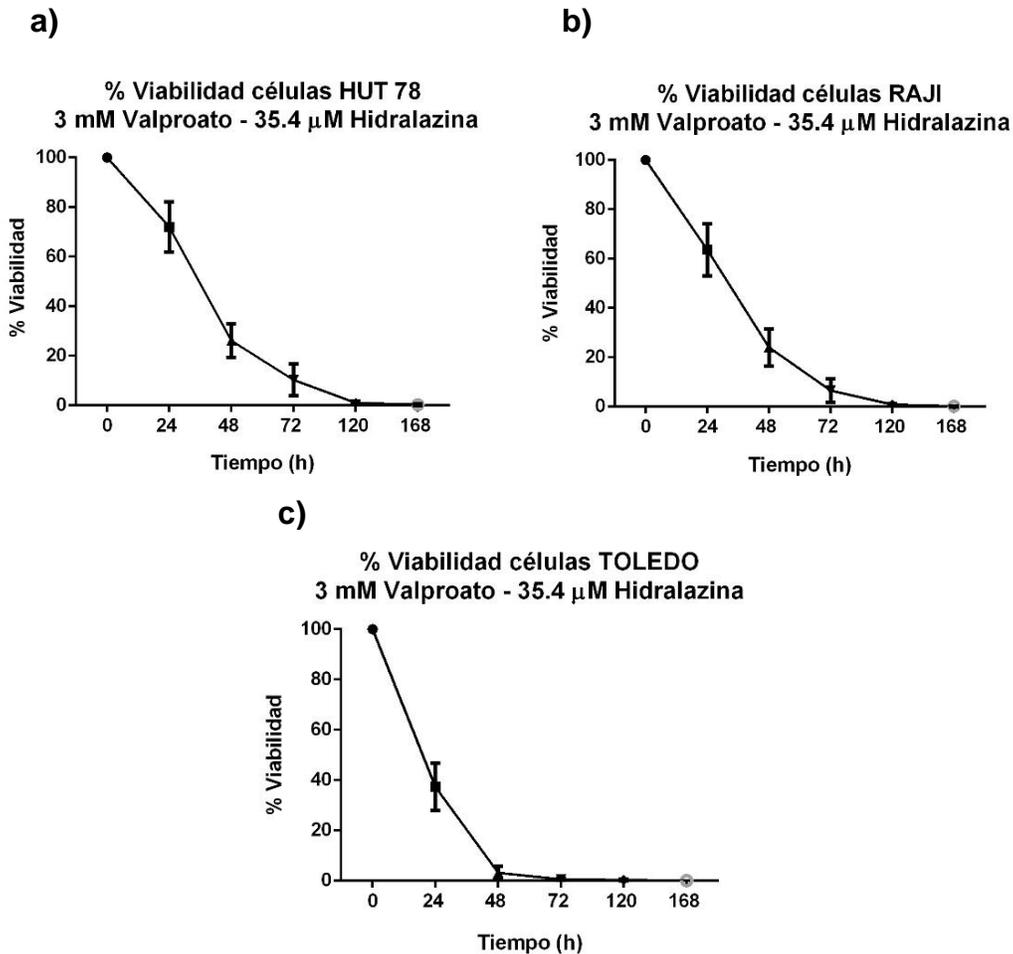


Figura 20. Resultados de viabilidad para las líneas celulares tratadas con valproato 3 mM e hidralazina 35.4 μM. **a)** Hut 78. **b)** Raji. **c)** Toledo. Los tratamientos están normalizados con respecto a su control. Se observa un mayor efecto antiproliferativo en las tres líneas celulares a estas dosis. Al igual que en la figura anterior, las líneas de linfoma de células B fueron más sensibles al tratamiento que la línea de linfoma de células T. Se demuestra que el efecto de los fármacos fue dosis-dependiente.

De esta manera, por un lado, corroboramos que la combinación de hidralazina-valproato presentaba un efecto antiproliferativo en la línea celular Hut 78 (la cual había sido previamente estudiada con esta combinación), así como determinamos por primera vez que la combinación también era efectiva contra las líneas de linfoma no Hodgkin de células B (Raji y Toledo); y que, de manera interesante, estas líneas fueron aún más sensibles que Hut 78.

En cuanto a los ensayos de ciclo celular, en la figura 21 se muestran los resultados para Hut 78. Se puede observar que el tratamiento con hidralazina-valproato fue capaz de inducir arresto del ciclo celular en G2/M para esta línea celular ($p=0.0024$). Así mismo, se observa que hubo un incremento significativo de células apoptóticas en las células tratadas respecto las células control ($p=0.03689$); aunque es importante tener en cuenta que este ensayo no diferencia entre células apoptóticas o necróticas, por lo que fue necesario realizar los ensayos con Anexina V para corroborar dichos resultados.

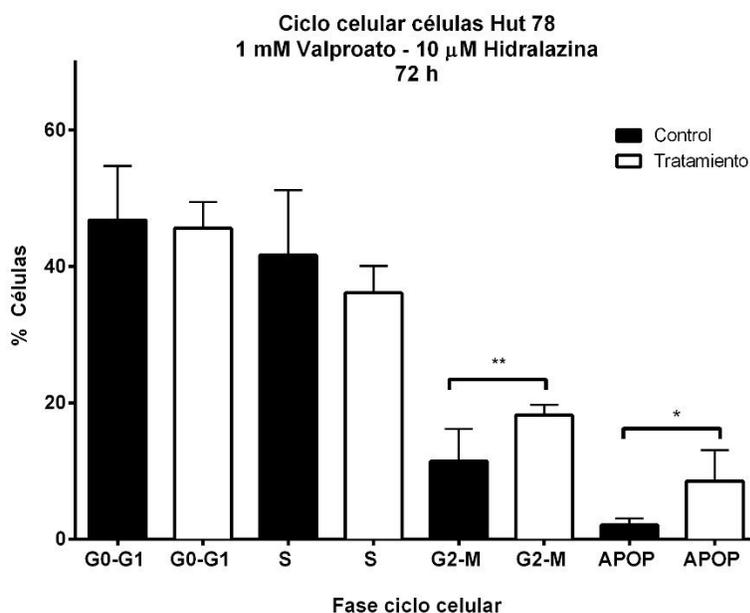


Figura 21. Arresto de ciclo celular en G2/M para las células HUT 78 por la acción de valproato (1 mM) e hidralazina (10 μ M). Se observa un arresto significativo en G2/M, así como un incremento en las células apoptóticas-necróticas de las células tratadas respecto a las células control.

En cuanto a los resultados del ensayo con Anexina V para Hut 78 (figura 22) se demostró que la combinación de los fármacos efectivamente fue capaz de inducir apoptosis de una manera significativa ($p=0.0264$).

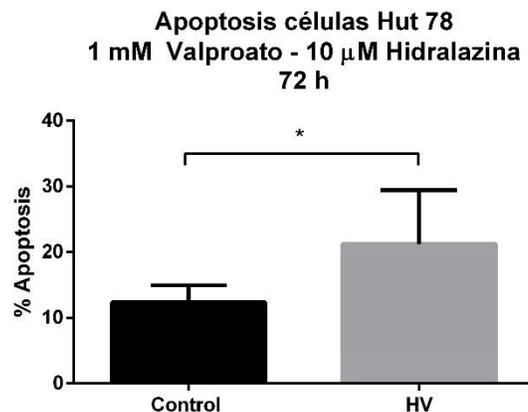


Figura 22. Inducción de apoptosis para las células HUT 78 tratadas con valproato (1 mM) e hidralazina (10 μ M). Se observa un incremento significativo de células apoptóticas del tratamiento respecto a su control.

Respecto a las células Raji, la combinación de hidralazina-valproato produjo un arresto del ciclo celular en G0/G1 ($p < 0.0001$), presentando una respuesta muy diferente a la observada con Hut 78 (arresto en G2/M). En este caso, no hubo una diferencia significativa en la apoptosis-necrosis entre las células tratadas respecto al control ($p = 0.945$).

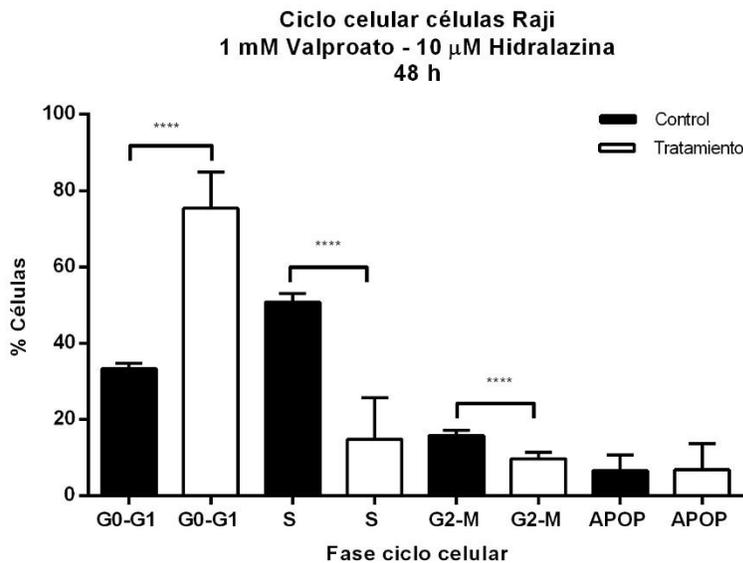


Figura 23. Arresto de ciclo celular en G0/G1 para las células Raji por la acción de valproato (1 mM) e hidralazina (10 μ M). Se observa un notable arresto significativo en G0/G1.

A pesar de que en los resultados de ciclo celular no hubo una diferencia significativa para las células apoptóticas-necróticas, con el ensayo de Anexina V se logró determinar que la combinación de estos fármacos sí induce apoptosis para las células Raji de manera significativa ($p = 0.0004$).

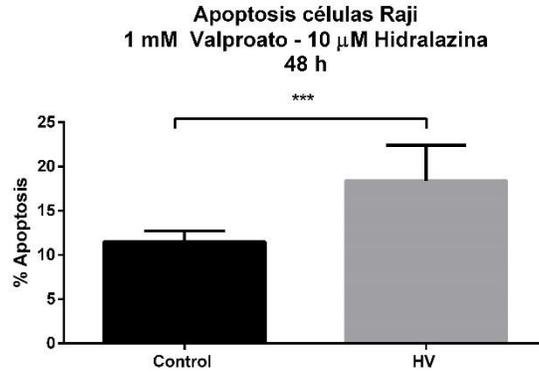


Figura 24. Inducción de apoptosis para las células Raji tratadas (HV) con valproato (1 mM) e hidralazina (10 μ M). Se observa un incremento significativo de células apoptóticas del tratamiento respecto a su control.

En cuanto a las células Toledo, al igual que las células Raji (linfoma no Hodgkin de células B), hubo un arresto significativo del ciclo celular en G0/G1 ($p < 0.0001$). En este caso, se observó que algunas células arrestaron en G2/M ($p = 0.0004$), y, además, hubo un incremento significativo de células apoptóticas-necróticas ($p < 0.0001$) respecto al control.

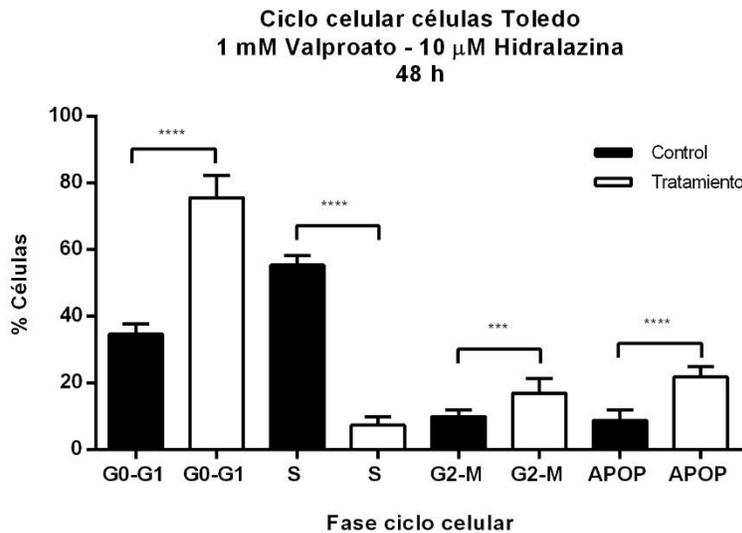


Figura 25. Arresto de ciclo celular en G0/G1 para las células Toledo por la acción de valproato (1 mM) e hidralazina (10 μ M). Se observa un notable arresto significativo en G0/G1, muy similar al observado en las células Raji, así como un ligero arresto en G2/M e incremento de células apoptóticas-necróticas del tratamiento respecto al control.

Esta posible inducción de apoptosis observada en la figura anterior, fue corroborada con el ensayo de Anexina V (figura 26), donde se demostró que dichos fármacos fueron capaces de inducir a apoptosis de forma significativa para esta línea celular ($p < 0.0001$).

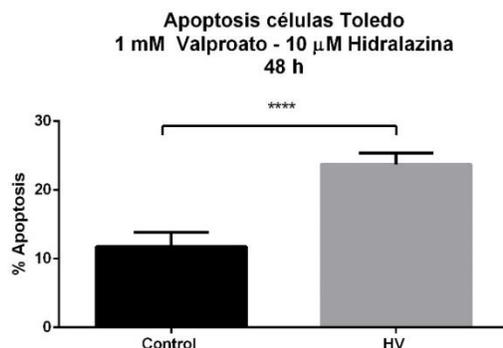


Figura 26. Inducción de apoptosis para las células Toledo tratadas (HV) con valproato (1 mM) e hidralazina (10 μ M). Se observa un incremento significativo de células apoptóticas del tratamiento respecto a su control.

De esta manera, el tipo de arresto del ciclo celular que presentaron las líneas celulares a la combinación de fármacos dependió del tipo celular, siendo para Hut 78 (células T) un arresto en G2/M y para Raji y Toledo (células B) un arresto en G0/G1. Además, el efecto antiproliferativo de los fármacos también fue parcialmente modulado por una significativa inducción de apoptosis en todas las líneas celulares.

Por otro lado, respecto a la extracción de RNA para los microarreglos de expresión, en la tabla 3 se muestran los resultados de la cuantificación. Como se puede observar, todas las muestras estuvieron dentro del rango de pureza aceptable de $260/280=1.8-2.0$ y se obtuvieron cantidades suficientes para realizar los microarreglos.

Tabla 3. Resultados de la cuantificación del RNA para las células Raji y Hut 78 post-tratamiento. C: Control; HV: Tratamiento con Hidralazina y Valproato.

Línea	Muestra	260/280	260/230	RIN	μ g totales
HUT 78	1C	1.95	2.08	8.10	163.9
	2C	1.89	2.00	7.90	85.2
	3C	1.90	1.92	8.10	138.5
	1HV	1.92	1.70	7.60	52.9
	2HV	1.96	1.12	7.10	40.6
	3HV	1.90	1.48	8.00	71.8
RAJI	1C	1.91	1.77	7.90	55.8
	2C	1.95	1.32	7.90	48.8
	3C	1.94	1.50	7.00	47.3
	1HV	1.94	0.88	5.80	27.7
	2HV	1.97	0.73	4.90	16.6
	3HV	1.96	1.15	6.20	24.1

En cuanto a la calidad del RNA extraído, en la figura 27 se muestra el resultado de la electroforesis capilar analizada mediante Bioanizador. Se puede observar que todas las muestras de Hut 78 presentaron una muy buena calidad, al igual que los controles para las células Raji, mientras que para los tratamientos de esta última

línea presentaron una menor calidad, pero aún suficiente para correr los microarreglos.

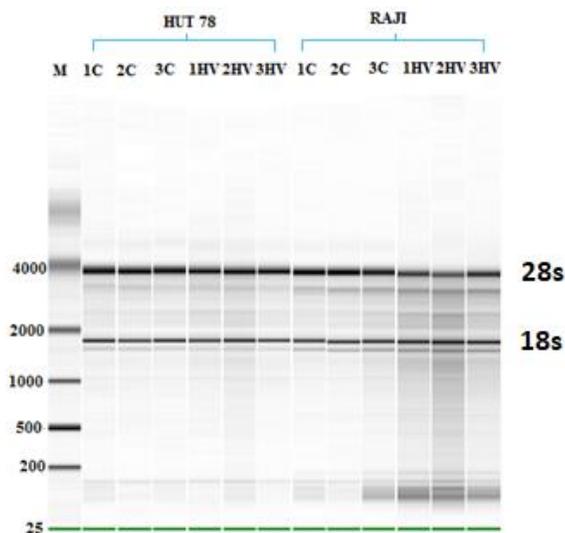


Figura 27. Calidad de las muestras de RNA de Hut 78 y Raji mediante Bioanalizador. M: Marcador de peso; C: Control; HV: Tratamiento con Hidralazina y Valproato. Se observa que todas las muestras de RNA presentaron una calidad suficiente para los microarreglos.

A partir de estas muestras de RNA se sintetizaron los respectivos cDNA y se realizaron los microarreglos de expresión empleando el kit de Human Gene 2.0 de Affymetrix, el cual brinda la posibilidad de analizar la expresión de más de 30.000 transcritos codificantes y más de 11.000 transcritos no codificantes largos intergénicos. En la tabla 4 se muestra un resumen de los resultados de microarreglos para ambas líneas. Se puede observar que fue mayor el número de genes que cambió su expresión en las células Raji, que en las de Hut 78, siendo predominante en ambas, la sobre-expresión de genes, respecto a los genes regulados a la baja.

Tabla 4. Número de genes sobre-expresados y regulados a la baja obtenido de los microarreglos de expresión para las líneas celulares Hut 78 y Raji.

Línea celular	Genes sobre-expresados		Genes regulados a la baja		% Genes sin cambio	# total genes
	#	%	#	%		
Hut 78	494	1.02	108	0.22	98.75	48226
Raji	739	1.53	486	1.01	97.46	

En las figuras 28 y 29 se muestran los diagramas de mapa de calor de los microarreglos para las dos líneas. Se observa que hubo cambios de coloración en las columnas de la izquierda (muestras control) respecto a la derecha (muestras tratadas), lo cual indica que hubo un cambio de los perfiles de expresión, y que efectivamente, la combinación de hidralazina y valproato está alterando los patrones de expresión de las dos líneas celulares, donde dicho cambio debe estar asociado al efecto antiproliferativo que presentó esta combinación.

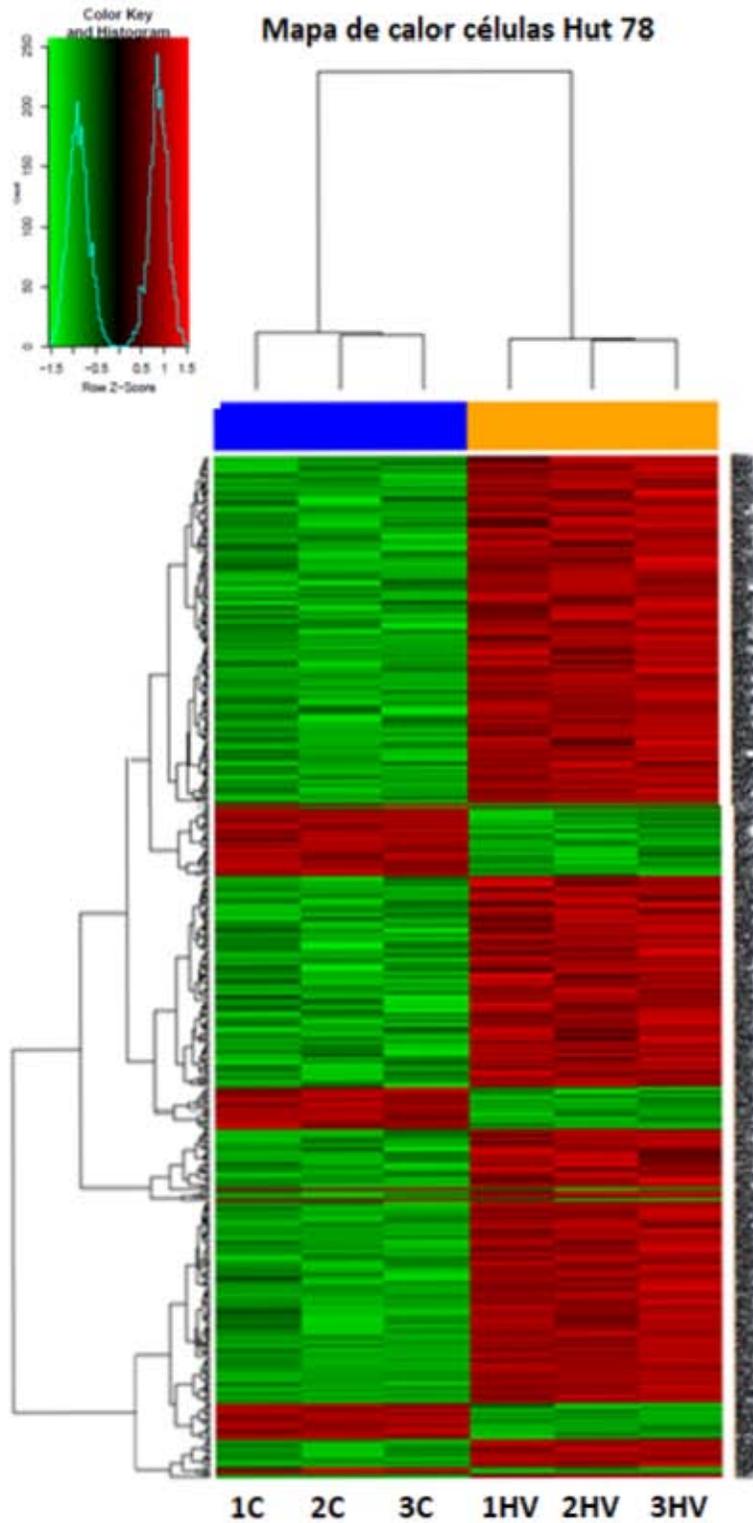


Figura 28. Mapa de calor de la línea HUT 78. Muestras control (1C, 2C y 3C) columna izquierda. Muestras tratadas (1HV, 2HV y 3HV) columna derecha. Se observa un cambio de coloración de la columna de genes de las células tratadas respecto a las células control, lo cual indica que hubo un cambio en los valores de expresión de esos genes.

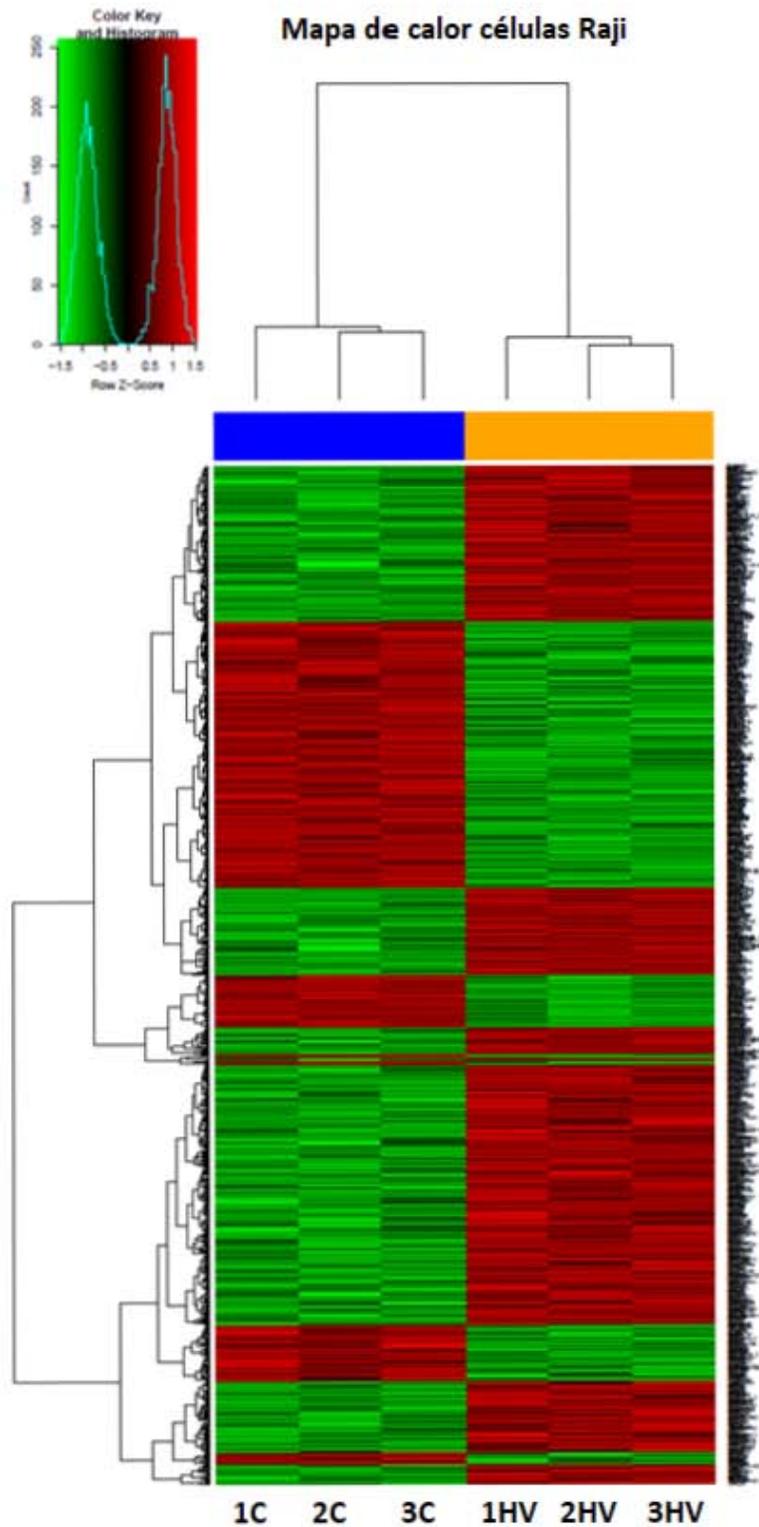
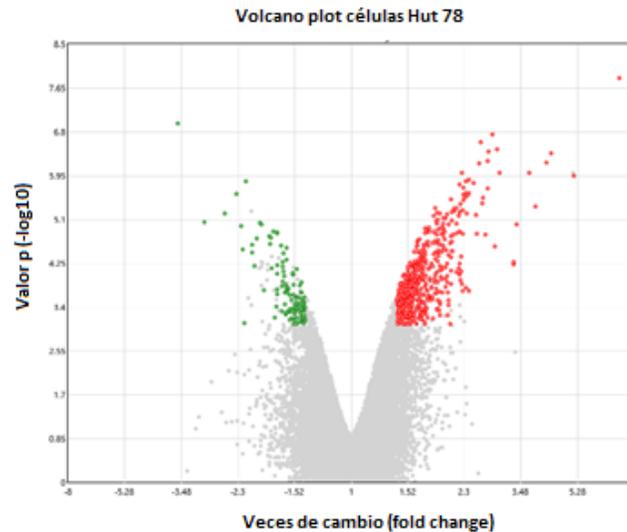


Figura 29. Mapa de calor de la línea Raji. Muestras control (1C, 2C y 3C) columna izquierda. Muestras tratadas (1HV, 2HV y 3HV) columna derecha. Se observa un cambio de coloración de la columna de genes de las células tratadas respecto a las células control, lo cual indica que hubo un cambio en los valores de expresión de esos genes.

En la figura 31 se presentan los resultados de Volcano plot para Hut 78 y Raji. Estos diagramas permiten visualizar los genes que cambiaron de expresión mediante sus veces de cambio (o conocido como fold change, eje x) y su valor de p (eje y). De esta manera, se puede diferenciar cómo se representan los genes sobre-expresados (en rojo) y regulados a la baja (en verde). En gris se muestran los genes restantes, que no están dentro de los filtros aplicados (Fold change: <-1.4 y >1.4 , $p < 0.05$ y $FDR-p < 0.05$).

a)



b)

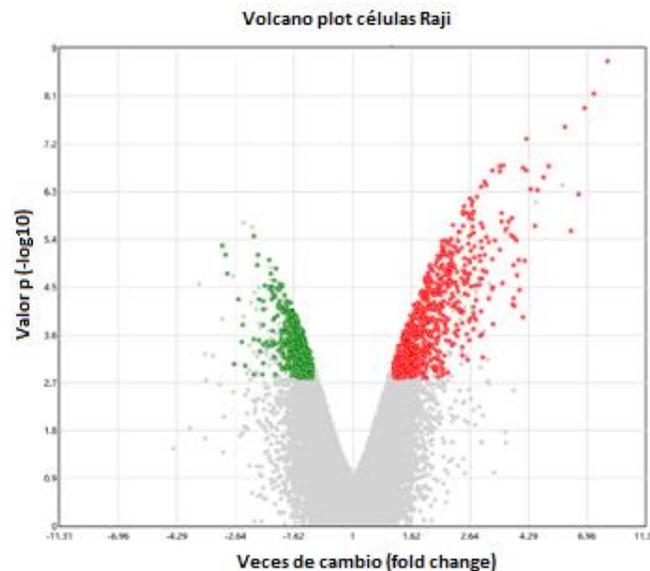


Figura 30. Volcano plot obtenido de los microarreglos. **a)** Células Hut 78. **b)** Células Raji. Se observa un mayor número de genes sobre-expresados que regulados a la baja en las dos líneas celulares. Hubo un mayor número de genes que cambiaron su expresión en las células Raji que las células Hut 78.

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados de los microarreglos de acuerdo a las rutas involucradas. Se presentan los genes que se sobre-expresaron y regularon a la baja para cada ruta, así como sus respectivos valores de significancia y valor de p. Es importante tener en cuenta que se tomó como criterio de clasificación aquellas rutas que tenían un valor de $p < 0.05$ y tenían un # total de genes > 5 , con el fin de representar sólo las rutas con valores de significancia mayores y que tengan un número considerable de genes participantes (exceptuando las rutas de ciclo celular y apoptosis para Hut 78, los cuales presentaron un número menor de genes involucrados y un valor de p mayor para el caso de apoptosis).

Tabla 5. Rutas involucradas en los cambios de expresión para Raji.

Ruta	#Total	Lista sobre-expresados	Lista regulados a la baja	Signific.	Valor p
Genes blanco de miR en linfocitos	44	FMNL2,NOTCH2,BCKDHB,PDCD4,RB1,VCAM1,SLC12A4,MET,WDFY1,SLC38A2,KCNN4,LAMC1,BCL2,P4HA2,GALNT1,TP53INP1,MIR155,MIR21	CHORDC1,RFT1,GNL3L,IPO4,POLA2,TERT,PLK1,DDX5,E2F3,RQCD1,AURKB,AKAP8,ABHD11,TDG,SLC4A7,TRIP13,SLC25A32,DHX15,EIF4E,ANAPC1,NCL,MAT2A,BRI3BP,SFXN1, MATR3, BCL6	4.98	0.00001
Genes blanco de miR en células músculo	32	FMNL2,MET,WDFY1,LAMC1,NOTCH2,GALNT1,P4HA2,SLC12A4,SLC38A2,RB1,BCL2,TP53INP1,PDCD4,MIR155,MIR21	ANAPC1,IPO4,SLC25A32,CHORDC1,EIF4E,GNL3L,PLK1,RFT1,DHX15,POLA2,SFXN1,NCL,RQCD1,SLC4A7,MATR3,TDG,E2F3	2.84	0.001459
Genes blanco de miR en epitelio	26	MET,WDFY1,LAMC1,NOTCH2,BCKDHB,GALNT1,P4HA2,SLC12A4,SLC38A2,RB1, TP53INP1, MIR155,MIR21	AURKB,IPO4,TRIP13,PLK1,BRI3BP,DDX5,DHX15,MAT2A,NCL,BCL6,TERT,MATR3,TDG	2.14	0.007323
Vía señalización VEGFA-VEGFR2	21	NCF2,TCEB3,FAS,SMARCA2,GAB1,STAT1,MAPKAPK2,ITPR1,NFKBIA,TXNIP,PTPN1,JUN,ICAM1,EP515,VCAM1,CDKN1B,BCL2	RHOA,NCL,ACACA,EIF4E	2.75	0.001798
Retinoblastoma (RB) en Cancer	20	RB1,CDKN1B,CCNE1,SMARCA2,MIR21	TFDP1,SKP2,CCNA2,MCM7,SUV39H1,CCNB1,MCM6,RFC4,CDC45,MCM4,POLE,ORC1,SMC2,H2AFZ, E2F3	9	0
Regulación de la Vía de señalización de los receptores toll-like	19	LY96,CD80,JUN,STAT1,CCL5,CYLD,NFKBIA,IFNB1,CCL3,CXCL10,TLR7,IRF7,CD86,TNFAIP3,CXCL9,NFKB2,CXCL11	IRAK1,PLK1	4.7	0.00002
Ciclo celular	17	CCNE1,MPEG1	BUB1B,CCNA2,CCNB1,TFDP1,CDC45,CDC6,SKP2,E2F3,PLK1,CDC20,MCM4,MCM6,MCM7,ORC1,ORC6	5.73	0.000002
Vía señalización receptores Toll-like	16	LY96,CD80,JUN,STAT1,CCL5,NFKBIA,IFNB1,CCL3,CXCL10,TLR7,IRF7,CD86,CXCL9,NFKB2, CXCL11	IRAK1	5.19	0.000006
Vía señalización apoptosis	16	PMAIP1,IRF1,FAS,NFKBIA,IRF2,TRAF1,CFLAR,JUN,BCL2,IRF7,NFKBIE, TNFSF10,MAP3K1, TP63	BIRC5,HELLS	6.13	0.000001
Vía señalización de quimiocinas	15	CCR7,CXCL10,CXCL9,CCL22,CCL3,CCL5,CXCL13,CXCL11,JAK2,LYN,STAT1,STAT2,NFKBIA,PREX1,SOS2		2.24	0.005758
Señalización interferones alfa/beta	15	STAT2,STAT1,USP18,PTPN1,IFITM1,IFIT2,IFI27,IFIT3,IFIT1,ISG15,XAF1,IFITM2,IFI6,IFI35,BST2		2.57	0.002675
Procesamiento mRNA	14	SNRPN	SNRPA1,SNRPD1,SF3B3,U2AF1,PRPF4B,PRPF3,CPSF4,NUDT21,SF3A3,U2AF2,DHX9,SNRPA,DHX15	2.98	0.001058
Vía señalización EGF/EGF	13	CAV1,JUN,STAT1,EP515,GAB1,JAK2,MAP3K1,SOS2,REPS2,IQSEC1,CBLB	ELK4,MYBL2	1.54	0.028549
Genes blanco de miR células escamosas	13	FMNL2,MET,LAMC1,GALNT1,P4HA2,SLC38A2,VCAM1,PDCD4,MIR155,MIR21	AKAP8,NCL,E2F3	1.54	0.028549
Vía señalización TGF-beta	12	SMAD7,SPTBN1,CAV1,MET,ZEB2,JUN,KLF6, ATF3	TRAP1,RHOA,TERT,TFDP1	1.81	0.015635
Rechazo aloinjerto	12	C5,LRRK2,STAT1,CXCL11,CXCL9,CXCL13, HLA-G,HLA-F,FAS,IL2RA,CD80,CD86		3.28	0.000531

Vía señalización TNF alfa	12	JUN,KSR1,CFLAR,NFKBIA,NFKBIE,NFKB2,MAP3K1,TANK,TRAF1,TNFAIP3	TRAP1,PLK1	3.23	0.000586
Respuesta daño DNA	11	FAS,PMAIP1,RB1,CDKN1B,GADD45B,SESN1, CCNE1	FANCD2,CCNB1,HUS1,RAD1	3.88	0.000132
Señalización interferones tipo II (IFNG)	11	JAK2,STAT1,STAT2,IFNB1,OAS1,CXCL10,IFIT2,IRF1,ICAM1,CXCL9,IRF2		6.11	0.000001
Senescencia y autofagia en cáncer	11	RB1,IFNB1,IRF7,CDKN1B,IRF1,BMI1,JUN,BCL2,PIK3C3,CCL3,IL6ST		2	0.010086
Control ciclo celular G1 a S	11	CDKN1B,RB1,CCNE1	E2F3,TFDP1,POLE,MCM4,MCM6,MCM7,POLA2,CCNB1	3.82	0.000152
Metabolismo pirimidinas	11	DPYD,ENPP1,ENPP3	CTPS1,DHODH,DTYMK,DCTPP1,UCK2,POLR3E,POLR3G,POLA2	3.02	0.000955
Señalización receptores RIG-I-like	11	CYLD,DDX58,ISG15,IFIH1,TANK,IRF7,NFKBIA,MAP3K1,IFNB1,CXCL10	DDX3X	4.39	0.00004
Regulación de miRNA de respuesta daño DNA	11	FAS,PMAIP1,RB1,CDKN1B,GADD45B,SESN1, CCNE1	FANCD2,CCNB1,HUS1,RAD1	2.52	0.003041
Respuesta daño DNA (sólo ATM dependiente)	10	NFKB2,SOS2,CDKN1B,MAP3K1,BCL2,PMAIP1, JUN,PIK3C3	BCL6,RHOA	1.35	0.044257
JAK/STAT	10	JAK2,STAT1,PTPN1,JUN,PDE3B,IRF1,TIMP1	EIF4E,ACACA,RHOA	1.38	0.041641
Daño DNA y respuesta celular vía ATR	9		BLM,BCL6,PLK1,FANCD2,RAD1,HUS1,BRCC3,CDC45,RMI1	1.6	0.025038
Terapia fotodinámica Señalización supervivencia AP-1 inducida	9	TNFSF10,CCNE1,FAS,RB1,BCL2,CFLAR,BMF, JUN	CCNA2	3.63	0.000233
Red relacionada a apoptosis debido a Notch3 alterado en cáncer de ovario	9	TRAF1,CDKN1B,SMAD7,IL7R	SERBP1,HSPD1,HELLS,NQO1, BIRC5	3.44	0.000367
Vía señalización receptores de células B (BCR)	9	GAB1,LYN,JUN,NFKBIA,DAPP1	E2F3,BCL6,CD79A,GTF2I	1.4	0.039686
Vía señalización receptor de andrógenos	9	RB1,BMF,CAV1,JUN,CCNE1	RHOA,PAK6,PATZ1,RAN	1.87	0.013544
Replicación DNA	8		POLE,MCM6,MCM4,MCM7,RFC4,RFC2,CDC6,POLA2	3.46	0.000344
Vía señalización IL-6	8	STAT1,GAB1,IL6ST,JAK2,TYK2,PRDM1,IRF1, TIMP1		3.39	0.000407
Vía Fas Ligando (FasL) e inducción de estrés de la regulación de las proteínas choque térmico (HSP)	8	FAS,MAPKAPK2,BCL2,CFLAR,RB1,MAP3K1, JUN	LMNB1	3.39	0.000407
Vía receptores glucocorticoides	8	JUN,NFKB2,PDE4B,RGS2,GADD45B,TNFAIP3, SRGN,CPEB4		1.98	0.010506
Vía señalización IL-11	8	IL6ST,JAK2,STAT1,BCL2,ICAM1,TYK2	BIRC5,BGLAP	3.32	0.00048
Vía señalización Leptin	8	STAT1,JAK2,TIMP1,PTPN1,PDE3B	EIF4E,ACACA,RHOA	1.32	0.048399
Vía señalización RANKL/RANK (Receptor activador de NFKB (ligando))	8	LYN,TRAF1,STAT1,NFKBIA,JUN,ICAM1,VCAM1,NFKB2		2.66	0.00218

Red causal de TYROBP	7	DPYD,NCKAP1L,NPC2,NCF2,GAPT,IL10RA,RGS1		1.87	0.013545
Vía señalización IL-3	7	LYN,BCL2,CD69,CD86,ENPP3,JAK2,JUN		2.35	0.004504
Red 2 de cáncer gástrico	7	PLAC8	UBE2C,DSCC1,LBR,CACYBP,BRIX1,RF C4	3.48	0.000331
Vía señalización LinfoProteína Estromal Tímica (TLSP)	7	STAT1,JAK2,IL7R,NFKBIA,NFKB2,IL2RA,LYN		2.4	0.004005
Vía señalización de la hormona estimulante de la tiroides humana (TSH)	7	JUN,RB1,JAK2,CCNE1,CDKN1B	RHOA,APEX1	1.66	0.02197
Vía señalización interferones tipo I	6	TYK2,STAT1,STAT2,MAP3K1,PDCD4	EIF4E	1.44	0.036438
Señalización familia IL-12	6	EBI3,IL6ST,TYK2,JAK2,STAT1	CANX	1.61	0.024665
Daño oxidativo	6	C5,BCL2,CDKN1B,TRAF1,NFKBIE,MAP3K1		2.18	0.006561
Terapia fotodinámica-señalización supervivencia inducida NF-kB	6	NFKB2,ICAM1,VCAM1,CFLAR,BCL2A1	BIRC5	2.48	0.003322
Actividad del receptor olfativo	6	OR10G3,OR2A25,OR2T10,OR10AB1P,OR2T3,OR52N4		2.32	0.004835
Enlace ligando GPCR	6	CCR7,CXCL13,P2RY10,HCAR3,ECE1,GPR183		6.02	0.000001
Vía señalización IL-5	6	JAK2,LYN,JUN,BCL2,STAT1,PIM1		2.13	0.007414
Vía serotonina grupo HTR1 y FOS	5	ITPR1,MAP3K1,MAPKAPK2	RHOA,ELK4	1.91	0.012252
Vía señalización IL-2	5	STAT1,IL2RA,JUN,BCL2,NMI		1.49	0.032144
Vía respuesta inflamación	5	LAMC1,IL2RA,CD86,CD80,IGHA1		1.97	0.010765
Imatinib y leukemia mieloide crónica	5	CDKN1B,SPRED2,PIM1	SKP2,NOP2	2.8	0.001602
Terapia fotodinámica señalización supervivencia HIF-1 inducida	5	BCL2A1,PMAIP1	SLC16A1,PGK1,BIRC5	1.71	0.019579
Vía señalización del Inductor débil de apoptosis relacionado a TNF (TWEAK)	5	TRAF1,NFKB2,NFKBIA,CCL5,JUN		1.45	0.035142
Interacciones inmunoregulatorias entre células linfoides y no linfoides	5	VCAM1,SELL,HLA-G,SLAMF6,SLAMF7		2.2	0.006329

Tabla 6. Rutas involucradas en los cambios de expresión para Hut 78.

Vía	#Total	Lista sobre-expresados	Lista regulados a la baja	Signific.	Valor p
Receptores nucleares Meta-vía	22	NCOA1,NR3C1,JUN,CYP1A1,PTGS2,SERPINB9,SPRY1,CPEB4,SRGN, BLVRB,SLC7A11,GSTA4,SLC2A13,EPHA3,TGFBR2,AHR,NRIP1	RXRA,SREBF1,FASN,SLC 5A6,SCD	6.18	0.000001
Genes blanco de miR en células músculo	18	ATP6V0A1,NEDD4,SLC25A24,FMNL2,PRKCI,PTPRJ,SDCBP, FNDC3B,I TGA2,LAMC1,CPOX,SLC7A11,TGFBR2,CDK6,MIR16- 2,MIR181B1,MIR21,MIR221		2.63	0.00235
Genes blanco de miR en linfocitos	18	FMNL2,MAP3K8,MIR221,SLC25A24, FNDC3B,CDK6,PTPRJ,ATP6V0A1, LAMC1,TGFBR2,ITGA2,SDCBP,CPOX,NEDD4,PRKCI,MIR16- 2,MIR181B1,MIR21		1.64	0.022717
Vía señalización Adhesión focal-PI3K-Akt-mTOR	16	IL3RA,ITGA2,ITGA3,LAMC1,AKT3,ITGA4,F2R,PHLPP1,CDKN1A,CREB 3L2,CREB3L3,TBC1D1	COL6A2,ITGAL,SREBF1,A CACA	3.38	0.000417
Vía señalización VEGFA- VEGFR2	16	NCF2,PRKCI,PRKCB,PLA2G4A,HSPB1,MLLT4,WASF1,PTPRJ,CTNNA 1,MYO6,JUN,ANXA1,PTGS2,PLAUR	PTPN6,ACACA	4.55	0.000028
Genes blanco de miR en epitelio	13	NEDD4,SLC25A24,PRKCI,SDCBP, FNDC3B,LAMC1,TGFBR2,CDK6,MA P3K8,MIR21,MIR221,MIR16-2,MIR181B1		1.49	0.032473
Vía señalización MAPK	12	AKT3,MAPT,RASGRP1,HSPB1,MAP3K8,JUN,RASGRP3,PRKACB,TGF BR2,PLA2G4A,DUSP6	MKNK2	2.4	0.003993
Adhesión focal	12	ITGA2,JUN,ITGA4,ARHGAP5,LAMC1,ITGA3,AKT3,PRKCB,VAV3	COL6A2,ITGAL,TXK	3.01	0.000986
Esteatosis Hígado AOP	10	NCOA1,CYP1A1,NRIP1,DECR1,PRKAR2B,PRKACB	SCD,SREBF1,FASN,ACA CA	4.35	0.000045
Adipogénesis	10	NR3C1,CDKN1A,NCOA1,NRIP1,KLF6,AHR	RXRA,SREBF1,SERPINE1 ,SCD	3.51	0.000308
Vía señalización EGFR1	9	PRKCI,PRKCB,VAV3,PTPN12,REPS2,JUN,HIP1,STXBP1	PTPN6	2.1	0.00788
Genes blanco de miR de células escamosas	9	NEDD4,FMNL2,SDCBP, FNDC3B,LAMC1,TGFBR2,MAP3K8,MIR16- 2,MIR21		2.27	0.005391
Regulación de calcio en células cardíacas	8	RGS1,PRKACB,GJB6,RGS18,PRKAR2B,GNAO1,RGS9,ATP1B1		1.94	0.011513
Vía señalización EGF/EGFR	8	JUN,VAV3,PRKCI,NEDD4,REPS2,STXBP1,PTPN12,PRKCB2		1.79	0.016363
Vía contracción y relajación miometrial	8	PRKACB,PRKAR2B,RGS1,RGS18,JUN,RGS9	ETS2,ATF5	1.88	0.013305
Vía NRF2	8	BLVRB,SLC7A11,SLC2A13,EPHA3,GSTA4,TGFBR2	RXRA,SLC5A6	2.09	0.008139
Vía receptores glucocorticoides	8	JUN,NR3C1,SERPINB9,PTGS2,SPRY1,SRGN,CPEB4	RXRA	4.07	0.000084
Regulación de la vía de señalización de los receptores toll-like	8	JUN,TLR1,TLR6,AKT3,MAP3K8	TLR5,CISH,PTPN6	1.99	0.010291
Red causal TYROBP	7	DPYD,NPC2,APBB1IP,CREB3L2,NCF2,RNASE6,RGS1		3.73	0.000188
Vía señalización de quimiocinas	7	CCR1,VAV3,PRKCB,TIAM1,PRKACB,AKT3	CXCR3	1.31	0.049425

Vía señalización proteínas G	7	PDE8A,PDE8B,GNAO1,PRKCI,PRKAR2B,PRKACB	GNA15	2.61	0.002465
Red de apoptosis debida a Notch3 alterado en cáncer de ovario	7	CDKN1A,HSPB1,CTNNA1,F2R,VAV3	BCL3,IER3	4.07	0.000084
Vía compromiso mesodermal	7	BCORL1,EXT1,ATP8B2,ARID5B,CCDC88A,VAV3	ACACA	1.45	0.035284
Diferenciación endodermo	7	LAMC1,EXT1,BCORL1,ATP8B2,VAV3,NR3C1	ACACA	1.57	0.026646
Diferenciación de células madre hematopoyéticas	7	HMG5,MIR221,MED12L,F2R	CDH1,MUC1,TXK	2.61	0.002465
Cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénico	7	SGCB,PKP2,ITGA2,ITGA3,ITGA4,CTNNA1,TCF7L2		3.16	0.000688
Vía señalización receptores toll-like	6	JUN,TLR1,TLR6,AKT3,MAP3K8	TLR5	1.78	0.016543
Vía de carcinoma de células renales claras	6	MIR21,PHGDH,TOX2	ACACA,FASN,ALDOC	2.1	0.007945
Vía señalización en glioblastoma	6	MIR21,AKT3,PRKCI,PRKCB,CDKN1A,CDK6		2.17	0.006721
Adhesión celular mediada por integrinas	6	VAV3,AKT3,ITGA2,ITGA3,ITGA4	ITGAL	1.8	0.015828
Síntesis prostaglandinas y regulación	5	PTGS1,PTGS2,ANXA1,PLA2G4A,PTGER2		3.46	0.000344
Cáncer endometrial	5	AKT3,CTNNA1,TCF7L2,CDKN1A	CDH1	2.22	0.005965
Síndrome de Angelman y Prader-Willi	5	IPW,SNRPN,SNORD109A,SNORD109B,CDK6		1.34	0.045261
Vía metabolismo de lípidos	5	AKT3,PRKAR2B,PRKACB	ACACA,FASN	3.76	0.000174
Vía fagocitosis patógeno microglia	5	VAV3,NCF2	TREM2,PTPN6,LAT	2.94	0.001148
Homeostasis Copper	5	MT1F,MAPT,ATP7A,JUN	MT1JP	2.32	0.004754
Vía señalización IL-3	5	IL3RA,CD69,JUN	CSF2RB,PTPN6	2.54	0.002873
Vía señalización hormona liberadora Corticotropina	5	JUN,PRKCI,PRKCB,GNAO1	ACACA	1.38	0.041704
Apoptosis	3	PMAIP1,APAF1,JUN		0.6	0.251317
Cell Cycle Checkpoints	1	CDKN1A		1.6	0.025199

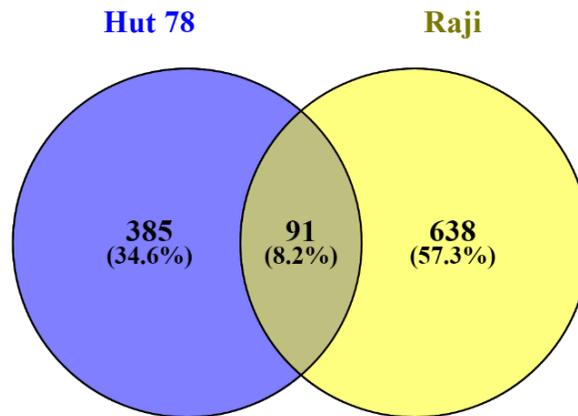
A partir de las tablas 5 y 6, se extrajeron los genes (y sus respectivas vías) más relevantes obtenidos de los microarreglos (tabla 7), los cuales podrían estar produciendo el efecto antiproliferativo observado en las dos líneas celulares. Estos genes fueron seleccionados debido a hay una variedad de estudios que demuestran su participación en los procesos de proliferación celular y cáncer, siendo potenciales genes blanco para la terapia contra el cáncer (sección que se explicará en detalle en la discusión).

Tabla 7. Resultados más relevantes de los microarreglos para las líneas celulares Hut 78 y Raji.

Línea celular	Vía	Genes sobre-expresados	Genes regulados a la baja
Hut 78	Ciclo celular	<i>CDKN1A, CDK6</i>	
	Apoptosis	<i>APAF-1, TP53I11, PMAIP1, JUN</i>	<i>BCL3</i>
	Biosíntesis de ácidos grasos		<i>FASN, SCD, ACACA, SREBF1</i>
	PI3K/AKT/mTOR	<i>AKT3, PHLPP1</i>	
	Receptores Toll like	<i>TLR6</i>	
	MAPK	<i>MAP3K8</i>	
Raji	Ciclo celular	<i>CDKN1B</i>	<i>MCM4, MCM6, MCM7, ORC1, ORC6, CDC6, CDC45, POLE, POLA2, CCNA2, CCNB1</i>
	Retinoblastoma	<i>RB1</i>	<i>E2F3, TFDP1, SKP2</i>
	Apoptosis	<i>TNFSF10, FAS, XAF1, PMAIP1, TP53INP1, JUN, BCL2, CFLAR</i>	<i>BIRC5, HELLS</i>
	IFN α/β	<i>STAT1, IFNB1</i>	
	Respuesta daño DNA	<i>GADD45B</i>	
	Receptor de células B	<i>NFKBIA, LYN</i>	<i>BCL6, CD79A</i>
	Biosíntesis		Proteínas: <i>EIF4E, EIF1AX, EIF5A</i> Ácidos grasos: <i>ACACA</i> Pirimidinas: <i>CTPS1</i>
	Procesamiento mRNA		<i>DHX9</i>
	Metilación DNA	<i>TET2</i>	

En la figura 31 se muestran los resultados de la comparación de los genes sobre-expresados y regulados a la baja entre la línea Hut 78 y Raji. Se puede observar que, entre las dos líneas celulares, hubo 91 genes que compartieron la sobre-expresión inducidas por la combinación de hidralazina y valproato. Por el contrario, hubo 9 genes que compartieron la regulación a la baja (para mayor información, favor ir a la tabla 8 en anexos).

a)



b)

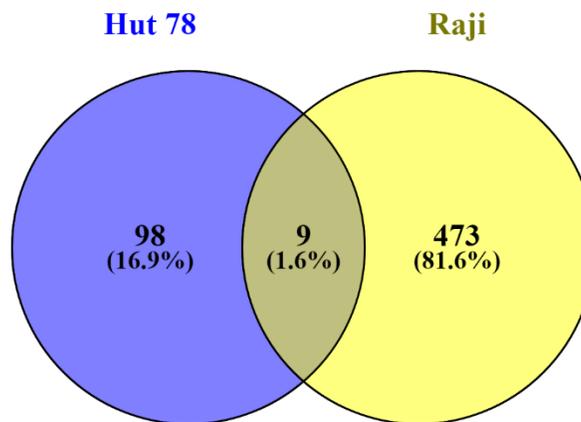
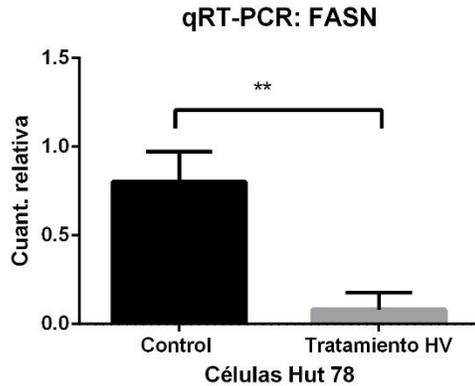


Figura 31. Comparación de los genes **(a)** sobre-expresados y **(b)** regulados a la baja entre la línea celular Hut 78 y Raji. Hubo 91 genes que fueron sobre-expresados en ambas líneas celulares, mientras que hubo 9 genes que compartieron una regulación a la baja.

A partir de la lista de genes obtenida de los microarreglos, se validaron 3 genes en total (FASN y SCD para Hut 78; STAT1 para Raji) mediante qRT-PCR (figura 32). Se puede observar que para los genes FASN y SCD (involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos), efectivamente hubo una disminución significativa del tratamiento respecto a su control. Teniendo en cuenta que las veces de cambio de estos genes fueron de -1.44 y -1.41 para FASN y SCD respectivamente, y los filtros aplicados para los microarreglos fueron de <-1.4 y >1.4 , se puede inferir que posiblemente los demás genes también presentarían una diferencia de expresión significativa, al presentar valores de veces de cambio con una magnitud mayor.

a)



b)

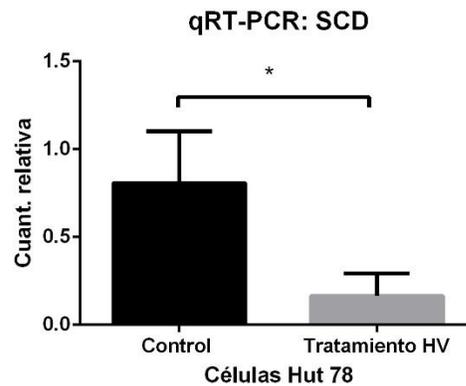


Figura 32. Resultados de la validación de los microarreglos de Hut 78 mediante qRT-PCR. **a)** FASN ($p=0.0032$). **b)** SCD ($p=0.0256$). Se observa una menor cuantificación relativa de los genes FASN y SCD de las células tratadas respecto al control, comprobando su regulación a la baja obtenida en los microarreglos.

En el caso de los microarreglos de las células Raji, STAT1 (involucrado en varias vías, incluyendo receptores Toll-like, TGF beta, EGF/EGFR, MAPK, JAK/STAT) presentó un incremento altamente significativo de las células tratadas respecto a su control; siendo su valor de veces de cambio de 4.21.

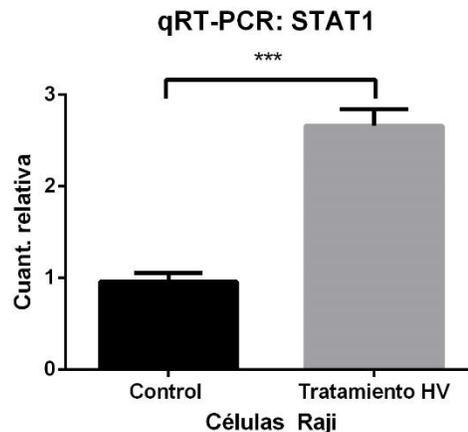


Figura 33. Resultados de la validación de los microarreglos de Raji mediante qRT-PCR para el gen STAT1 ($p=0.0001$). Se observa un incremento significativo de los niveles de cDNA para el gen STAT1 de las células tratadas respecto al control, comprobando su sobre-expresión.

De esta manera, se corroboró que los resultados de los microarreglos para estos genes sí fueron válidos, donde se observó que el grado de expresión diferencial observado en los microarreglos (veces de cambio o fold change) correlacionó con lo obtenido mediante qRT-PCR.

10. DISCUSIÓN

En la actualidad, una de las maneras emergentes de tratar los linfomas ha sido desde un punto de vista epigenético. Dentro de esta rama, las enzimas blanco más conocidas son las Histonas Desacetilasas (HDAC) y las DNA Metiltransferasas (DNMT), las cuales hacen parte de un complejo de represión transcripcional, regulando la expresión de una gran variedad de genes, incluyendo genes supresores de tumor. La sobre-expresión de ambas enzimas ha sido relacionada con una pobre prognosis y progresión tumoral en linfomas no Hodgkin (Amara et al., 2010; Rangwala et al., 2012), por tanto, encontrar inhibidores contra esas enzimas ha sido uno de los objetivos de la terapia epigenética en los últimos años.

La combinación de hidralazina (inhibidor de DNMT) y valproato (inhibidor de HDAC) ha mostrado tener eficacia antitumoral en pacientes con linfoma cutáneo de células T (Duenas-Gonzalez et al., 2010; Espinoza-Zamora et al., 2017) en estudios fase I y fase II, aunque estos estudios aún no han elucidado los mecanismos moleculares por los cuales estos fármacos actúan, ni se ha ampliado su campo de estudio hacia linfomas de células B. Es por esta razón que, en esta investigación, nosotros nos enfocamos en evaluar el efecto antiproliferativo de esta combinación de fármacos en líneas celulares de linfoma de células T y B, así como elucidar los procesos celulares involucrados.

De manera interesante, encontramos que los linfomas de células B fueron más sensibles al tratamiento que los linfomas de células T. En contraste, usando solamente inhibidores de HDAC, en estudios previos se ha visto que, por razones desconocidas, los linfomas de células B han sido más resistentes al tratamiento que los linfomas de células T (Crump et al., 2008; Lena Marquard et al., 2009; O'Connor et al., 2006). Tal vez, se podría sugerir que los perfiles de expresión de la combinación de inhibidores de HDAC y DNMT son diferentes a los perfiles de expresión de los inhibidores por separado (Kalac et al., 2011), por lo que la respuesta en este caso podría ser diferente, donde el inhibidor de las DNMTs puede potencializar el efecto de los inhibidores de HDAC (Chávez et al., 2006) y activar un diferente patrón de genes blanco. Además, este fenómeno también puede deberse a que la hidralazina, al ser inhibidor de la DNMT1, tiene un efecto dependiente del ciclo celular (ya que la DNMT1 actúa una vez el DNA es replicado), y teniendo en cuenta que los tiempos de doblaje para Hut 78 y Toledo son de 65 y 24-30 h respectivamente (el de Raji no está reportado por ATCC, pero según lo observado es de ~24h), el efecto de la hidralazina se verá mejor reflejado en las líneas de linfocitos B al tener tiempos de doblaje más cortos; por lo que a una misma hora de tratamiento (72 h) tanto Raji como Toledo presentaron una reducción de la viabilidad de dos a tres veces mayor que Hut 78 (figura 20).

Mediante los resultados de microarreglos, podemos observar múltiples vías que están alteradas en la línea celular Raji y Hut 78 por la acción de la hidralazina y el valproato. Respecto a la línea celular Raji, se muestran interesantes cambios de expresión en genes involucrados en las vías de ciclo celular (G1 a S), replicación de DNA, apoptosis, TNF alfa, FASL, retinoblastoma, IFN alfa/beta, IFN tipo I y II, JAK/STAT, respuesta al daño DNA, procesamiento mRNA, receptores de células B

(BCR), biosíntesis de pirimidinas, ácidos grasos y proteínas. Mientras que la línea celular Hut 78 involucra principalmente las vías de MAPK, PI3K/AKT/mTOR, receptores toll-like y biosíntesis de lípidos, así como cambios de expresión en genes claves del ciclo celular y apoptosis.

En cuanto a los resultados de ciclo celular, de manera interesante observamos que el efecto fue diferente entre los linfomas de células T y B (G2/M y G0/G1, respectivamente), lo que sugiere que el efecto de estos fármacos epigenéticos es específico del tipo celular. El fuerte arresto del ciclo celular en G0/G1 observado para Raji ($p < 0.0001$), estuvo mediado por varios factores, acorde a los resultados del microarreglo. El primero de ellos, es la fuerte sobre-expresión de CDKN1B (p27), el cual previene la activación de los complejos ciclina E/CDK2 o ciclina D/CDK4/6, correspondientes a la transición G1 a S. Es bien sabido que la inducción de los inhibidores de las CDK, tal como p27, puede inducir el arresto del ciclo celular en G0/G1 (J. Li et al., 2000), y de hecho, la regulación a la baja del gen *SKP2* también observada, inhibe la ubiquitinación de p27, fomentando su acumulación, y de esta manera, conllevando al arresto en G0/G1 (Shibahara, Onishi, Franco, Arima, & Sugimura, 2005); por lo que la inducción de p27, junto con la regulación a la baja de *SKP2*, pudo haber modulado en gran parte el arresto observado para esta línea celular. Es importante tener en cuenta que en linfomas no Hodgkin de células B, se ha demostrado que la pérdida de expresión de CDKN1B está asociado con un grado mayor de agresividad (Moreira Junior et al., 2003), por lo que su inducción podría ser fundamental para contrarrestar el avance de esta enfermedad. Además de la inducción de CDKN1B, otro factor importante que pudimos observar fue la inducción del gen *RB1*, el cual codifica a la proteína retinoblastoma (RB), encargada de reprimir la transcripción de los genes involucrados en la transición de G1 a S en su estado fosforilado (pRB). Esto lo hace debido a que se une directamente e inhibe a E2F, impidiendo que active la transcripción de los genes involucrados con la transición a la fase S (Giacinti & Giordano, 2006). No solamente observamos inducción de *RB1*, sino que, además, observamos tanto una disminución en *TFDP1*, (el cual heterodimeriza con E2F para mejorar el enlace con el DNA y promover la transcripción de los genes blanco de E2F), así como observamos una disminución de *E2F3* (uno de los subtipos de E2F). Esto, nos sugiere que la inducción de *RB1* junto con la disminución de *TFDP1* y *E2F3*, pudo también haber modulado el arresto del ciclo celular en G0/G1 observado en las células Raji (Dyson, 1998). Adicionalmente, observamos una disminución de los genes involucrados en la fase de síntesis y replicación de DNA, tal como *MCM 4*, *-6*, *-7*, *ORC1*, *-6*, *CDC6*, *CDC45*, y *CCNA2* (ciclina A2). *CDC6*, *ORC* y *MCM* hacen parte del complejo de pre-replicación de DNA, y estas junto con *CDC45* hacen parte del complejo de pre-iniciación. También se redujo la expresión de genes involucrados en la DNA polimerasa, como *POLE* y *POLA2*. En cuanto a la fase G2, también hubo una disminución de *CCNB1* (ciclina B1), además de *CCNA2*. Cabe anotar que aunque se indujo *CCNE1* (ciclina E1), el cual se une con *CDK2* para inducir la transición a la fase S, debido a los cambios de expresión ya mencionados, se corrobora que efectivamente hubo un arresto del ciclo celular en G0/G1 observado mediante citometría de flujo (figura 24); tal como lo han demostrado estudios previos, donde el valproato y la hidralazina de manera independiente, han sido capaces de inducir

el arresto del ciclo celular en G0/G1 en otros sistemas modelo de cáncer (I. Graca et al., 2014; Z. Sang et al., 2016). Respecto al arresto del ciclo celular en G0/G1 ($p < 0.0001$) observado en las células Toledo (figuras 26), estas al ser linfoma difuso de células B grandes, y originarse dentro del centro germinal al igual que el linfoma de Burkitt (Raji), posiblemente hayan compartido ciertas características de cambios de expresión en esta vía, lo cual hizo que el comportamiento del arresto del ciclo celular fuera muy similar entre ambas líneas.

En cuanto al arresto del ciclo celular en G2/M observado en la línea celular Hut 78 ($p: 0.0004$, figura 22), su efecto se debe principalmente a la sobre-expresión de *CDKN1A*. *CDKN1A* codifica a una proteína inhibidora de las CDKs (p21), la cual es capaz de inducir el arresto del ciclo celular en G0/G1 o en G2/M. Este arresto en G2/M se debe a la inactivación del complejo CDK1/ciclina B, lo cual impide que la célula entre a la fase mitótica (Bunz et al., 1998; Niculescu et al., 1998). El hecho de que no hayamos visto un arresto en G0/G1, en parte tal vez se deba a la inducción de CDK6, el cual hace parte del complejo CDK6/ciclina D, fomentando así la transición de G1 a S; por lo que, en este caso, como observamos en la figura 22, las células Hut 78 alcanzaron la fase de síntesis, pero debido a la acción de p21, hay un porcentaje considerable de células que son arrestadas en G2/M. Estos resultados corroboran lo que se ha observado utilizando hidralazina y valproato como agentes únicos, ya que ambos han sido capaces de inducir a p21 en otros modelos de cáncer (Gilardini et al., 2017; I. Graca et al., 2014).

Respecto a la evaluación de la apoptosis, realizada para las tres líneas celulares: Hut 78, Raji y Toledo, todas presentaron una inducción significativa de apoptosis ($p: 0.0264$, $p: 0.0237$ y $p < 0.0001$, respectivamente), y acorde a los resultados de los microarreglos, hubo notables diferencias en los cambios de expresión de los genes involucrados en esta vía entre Raji y Hut 78. En cuanto a las células Raji, los factores pro-apoptóticos que se indujeron fueron: *TNFSF10*, *FAS*, *PMAIP1*, *XAF1* y *TP53INP1*. *TNFSF10* (también conocido como TRAIL) es un gen que codifica para una proteína que pertenece a la familia de ligandos TNF. Esta proteína ha demostrado ser capaz de inducir apoptosis en una variedad de líneas celulares transformadas (Carlo-Stella et al., 2007), lo cual lo hace un interesante blanco para el desarrollo de agonistas en la terapia contra el cáncer. *FAS* codifica para un miembro de la superfamilia de los receptores TNF. La interacción de este receptor con su ligando permite la formación del complejo de señalización de muerte inducida (incluye FADD, casp8, casp10), desencadenando así la activación de las caspasas 3 y 7, llevando a cabo la apoptosis por la vía extrínseca (D. C. Huang et al., 1999). *PMAIP1* (también conocido como NOXA) promueve la activación de caspasas y apoptosis. Actúa como sensibilizador de la proteína BH3, probablemente por inhibir la proteína anti-apoptótica *mcl1* (Dengler et al., 2014). *XAF1* codifica para una proteína que se une y contrarresta el efecto inhibitorio de las IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis), los cuales se unen e inhiben a las caspasas. De hecho, se ha demostrado que la sobre-expresión de este gen, puede reprimir la expresión de *BIRC4* (inhibidor de apoptosis), inhibiendo la invasión y promoviendo el arresto del ciclo celular y apoptosis (Zhao, Deng, Wang, Miao, & Wang, 2015). *TP53INP1* es un gen target de p53, considerado un supresor de tumor, ya que su proteína tiene

propiedades anti-proliferativas y pro-apoptóticas, involucradas en la respuesta al estrés celular. Esta proteína además ha demostrado que puede inducir la muerte celular por autofagia dependiente de caspasas (Seillier et al., 2012).

En cuanto a los genes anti-apoptóticos que disminuyeron su expresión para Raji fueron: *BIRC5* y *HELLS*. *BIRC5* es un miembro de las IAP, interacciona con *BIRC4* y *DIABLO* con el fin de inactivar las caspasas 3 y 9. El silenciamiento de este gen fue capaz de fomentar de forma masiva la apoptosis en un modelo de neuroblastoma (Lamers et al., 2011). *HELLS* codifica para una helicasa específica de células linfoides. Es un miembro de la familia SNF2, proteínas remodeladoras de la cromatina que utilizan ATP para alterar la estructura y empaquetamiento de la cromatina (Jarvis et al., 1996). Su pérdida conlleva a cambios de metilación del DNA global. Su sobre-expresión ha sido encontrada en varios tumores humanos, y ha sido involucrada en la regulación de la expansión o supervivencia de las células linfoides. Se ha demostrado que puede interactuar con *E2F3* (previamente explicado, el cual también está reducido) para cooperar con su función oncogénica (Xu & Orkin, 2011). De esta manera, la inducción de dichos genes pro-apoptóticos y la regulación a la baja de los genes anti-apoptóticos mencionados anteriormente, pueden estar modulando la apoptosis inducida por la hidralazina y el valproato en esta línea de linfoma.

Es importante tener en cuenta, que, de manera contradictoria, hubo una inducción de genes anti-apoptóticos tales como *BCL2*, *BCL2A1*, *CFLAR*. *BCL2* y *BCL2A1* son conocidos inhibidores de la apoptosis intrínseca, los cuales reducen la liberación de los citocromos c de la mitocondria y bloquean la activación de las caspasas. Una de las razones por las cuales quizás estos genes no impidieron la apoptosis en nuestro experimento, es porque tal vez la inducción de los genes *FAS* y *TNFSF10* podrían estar modulando una apoptosis vía extrínseca, y previamente se ha demostrado, que la activación de la familia de *BCL2* no es capaz de bloquear la apoptosis inducida por *FASL* en linfocitos, puesto que pertenece a la vía intrínseca. (D. C. Huang et al., 1999). Otra de las posibles razones de esta contradicción, puede deberse a que los inhibidores de HDAC además de inducir apoptosis, pueden también inducir muerte celular por autofagia, independientemente de la inactivación de las caspasas y de la sobre-expresión de la familia de *BCL2*, por lo que la muerte celular observada puede deberse a un conjunto de ambos fenómenos (Shao, Gao, Marks, & Jiang, 2004). *CFLAR* (conocido como C-FLIP) codifica para una proteína reguladora anti-apoptótica, que puede inhibir la apoptosis inducida por *TNF-alfa*, *FASL* y *TRAIL*. Puede interactuar con *DISC*, bloqueando el posterior reclutamiento y procesamiento de *casp8* (Safa, 2012), lo cual nos estaría dando un indicativo de que estaría generando resistencia hacia la apoptosis extrínseca. Este tipo de contradicciones pueden ser explicados en parte, porque los fármacos epigenéticos tal como los inhibidores de HDAC y DNMT, no son completamente específicos para los genes que queremos cambiar su expresión, sino que está sujeto a la alteración de la expresión de una gran variedad de genes, y lo que observamos al final, es que a pesar de este tipo de sobre-expresiones, el balance se inclina hacia la muerte celular.

Para ampliar en mayor medida el panorama de lo que podría estar ocurriendo en la apoptosis de la línea celular Raji, es importante tener en cuenta la fuerte inducción que hubo de STAT1 y de la vía de señalización de interferones alfa/beta. Los STAT son conocidos como traductores de señales desde un receptor celular hacia el núcleo y modulan la transcripción de genes específicos. Se ha visto que STAT1 media la inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en varios sistemas modelo, sugiriéndose como posible mediador indirecto de la apoptosis (Stephanou & Latchman, 2005). En linfomas específicamente, tal como en linfoma de Hodgkin, se ha demostrado que la sobre-expresión de STAT1 fue capaz de inducir a apoptosis (Baus et al., 2009). Además, se ha demostrado que la acetilación de STAT1 modula su actividad, y solamente en este estado, puede enlazarse a NF- κ B p65; reduciendo así la señalización anti-apoptótica de NF- κ B en líneas celulares de melanoma (H. S. Kim & Lee, 2007; O. H. Kramer et al., 2006). Esto, sugiere que usando inhibidores de HDAC se puede inducir la acetilación de STAT1 y, por tanto, fomentar su efecto pro-apoptótico. Adicionalmente, este importante rol de STAT1 en la promoción de apoptosis ha sido apoyada por los efectos pro-apoptóticos de los interferones mediados por la señalización de STAT1. Se ha observado que los interferones tipo I pueden inducir apoptosis de manera extrínseca o intrínseca. Por un lado, se ha visto que los IFN pueden sensibilizar a las células a varias señales de muerte como TNF- α , Fas, o TRAIL (H. S. Kim & Lee, 2007); y por otro lado, se ha visto también que los interferones pueden inducir la expresión de los receptores de muerte celular (DRs), y ligandos inductores de apoptosis relacionados a TNF (tal como TNFSF10 o conocido como TRAIL) (Bernardo, Cosgaya, Aranda, & Jimenez-Lara, 2013). Esto, nos podría dar un indicio de que la sobre-expresión de STAT1, IFNB1 (IFN- β) y TNFSF10 de manera conjunta podrían estar modulando la apoptosis extrínseca observada con Anexina V en la línea celular Raji (figura 25); idea que es reforzada por el descubrimiento de que la inducción de apoptosis por IFN- β y TRAIL es dependiente de STAT1 (Choi et al., 2003). Por lo que, a pesar de la sobre-expresión de C-FLAR mencionado previamente, se podría deducir que debido a la expresión de todos estos genes pro-apoptóticos inclinarían la balanza hacia la muerte celular.

Adicionalmente, la vía de apoptosis para la línea celular Raji puede estar influenciada por la vía de respuesta al daño de DNA, al haber una sobre-expresión del gen *GADD45B*. La expresión de este gen ha estado asociado a las condiciones de estrés del arresto de crecimiento y al tratamiento con agentes que dañan el DNA. Este gen ha demostrado ser un regulador positivo de apoptosis. Por un lado, se ha visto que actúa como un efector de la apoptosis inducida por Fas, mejorando la interacción entre p38 y Retinoblastoma (Cho et al., 2010); y por otro lado, también ha demostrado ser necesario para la inducción de apoptosis mediada por TFG- β , siendo activada por las SMAD (2, 3 y 4) y actuando como un regulador positivo de esta vía (J. Yoo et al., 2003). Aunque, es importante mencionar que en la vía de TFG- β , SMAD7 fue inducido, el cual actúa como un regulador negativo de esta vía e inhibidor de las proteínas SMAD. Sin embargo, este gen también ha demostrado ser un co-activador transcripcional para la caspasa 8, a través de la interacción con IRF1 (el cual también está inducido) (Hong et al., 2013), por lo que la presencia de

estos genes nos podría dar un panorama aún más amplio, de los posibles caminos por los cuales se está llevando a cabo este tipo de muerte celular.

Respecto a la apoptosis observada para Hut 78 (figura 23), los factores pro-apoptóticos observados fueron: APAF-1, TP53I11, PMAIP1. *APAF-1* es un conocido inductor de la apoptosis. Mediante la activación con los citocromos c liberados de la mitocondria, se oligomeriza y forma el apoptosoma, conllevando a la activación de la casp9 y la apoptosis por la vía intrínseca (Cain, 2003). Como se explicó en los antecedentes, este gen se ha visto silenciado en linfomas no Hodgkin de células B y T, específicamente por la hipermetilación de las citosinas de las islas CpG de su región promotora, por lo que mediante el uso de inhibidores de DNMT y HDAC, hemos podido reactivar la expresión de este importante gen en el proceso de apoptosis. *TP53I11* (también conocido como PIG11) es un gen target de p53 considerado como un gen candidato a supresor de tumor. La sobre-expresión de este gen ha estado relacionado con inducción de apoptosis en carcinoma hepatocelular, y ha demostrado sensibilizar a las células cancerígenas a agentes quimioterapéuticos (Liang, Cao, Zhang, & Qin, 2004; Wu et al., 2009). *PMAIP1* mencionado anteriormente, puede sensibilizar a la célula a la acción de la proteína BH3, fomentando así la apoptosis intrínseca.

Solo hubo un gen anti-apoptótico que fue regulado a la baja para Hut 78: BCL3. BCL3 codifica para una proteína I κ B, la cual ha sido capaz de estimular la proliferación celular por activar la vía de NF- κ B y el factor de transcripción mitogénico AP-1 (Na et al., 1999). Específicamente en células Hut 78 (CTCL) se ha demostrado que suprimiendo BCL3 se disminuyen los genes que fomentan la supervivencia tal como cIAP1 (BIRC2) y cIAP2 (BIRC3), se reduce la viabilidad celular, e incrementa la apoptosis en CTCL (T. P. Chang & Vancurova, 2014), por lo que su disminución pudo haber modulado en cierta parte el efecto antiproliferativo de esta línea, al reducir la activación de la vía de señalización de NF- κ B e inducir apoptosis. De esta manera, debido a la inducción principalmente de APAF-1 así como la disminución de BCL3, probablemente la combinación de valproato e hidralazina moduló la apoptosis vía intrínseca para Hut 78.

Es importante mencionar, que la apoptosis inducida por estos fármacos puede deberse tanto a la acción de valproato como de la hidralazina, ya que se ha demostrado que ambos fármacos actuando como agentes únicos, han sido capaces de inducir apoptosis en varios sistemas modelo (Achachi et al., 2005; Gilardini et al., 2017; Ines Graca et al., 2014; Hao et al., 2017; Ruiz et al., 2016; Zhijian Sang et al., 2016). En una de las investigaciones más destacadas, se demostró que la hidralazina fue capaz de inducir apoptosis a través de la vía intrínseca, causando daño al DNA en células T leucémicas, e induciendo tanto la activación de Bak, como la producción de especies reactivas de oxígeno (Ruiz et al., 2016). Mientras que el valproato, en un modelo in vitro de linfoma de células T periférico, se descubrió que podía disminuir la expresión de c-FLIP y producir apoptosis extrínseca, a través de la inhibición de la ruta NF- κ B e interrumpiendo la interacción de p50 con el promotor c-FLIP (Zheng et al., 2014).

Por otro lado, en cuanto a las demás vías aún no mencionadas que se observaron para Raji, es importante recalcar la vía de señalización de los receptores de células B (BCR). En esta vía pudimos observar una disminución de los genes *CD79A*, *BCL6* y un incremento de *NFKBIA* y *LYN*. Una de las terapias emergentes contra los linfomas es precisamente inhibir la activación de la vía BCR, ya que esta vía fomenta la activación de los linfocitos B, NF- κ B y MYC (X. Huang et al., 2011), por lo que la regulación a la baja de *CD79A* y *BCL6*, y el incremento de *NFKBIA* (I κ B- α , el cual mantiene inhibido a NF- κ B) podrían atenuar en cierta medida la proliferación de las células B. Sin embargo, hubo un incremento de *LYN*, el cual fosforila a varias proteínas de esta vía, fomentando su activación (A. Kim, Seong, Kang, Park, & Lee, 2015). Dentro de este grupo de genes, es importante resaltar el papel de *BCL6*, como un factor fundamental de la promoción de la linfomagénesis y progresión tumoral. En células B del centro germinal (GCB), este oncogén reprime la transcripción de genes involucrados en diferenciación, inflamación, apoptosis y control del ciclo celular. Por tanto, es considerado como uno de los responsables de la proliferación de las GCB y, además, permite las hipermutaciones somáticas en el DNA sin inducir apoptosis dependiente de p53. Este gen se encuentra expresado de forma constitutiva en los linfomas de células GCB (debido a translocaciones con genes Ig), siendo uno de los responsables de la linfomagénesis (Cardenas et al., 2017; Crump et al., 2008; Cherchietti et al., 2010). Su regulación es controlada a diferentes niveles, mediada en parte por la acetilación/desacetilación de histonas, y en parte a través de la acetiltransferasa de histonas p300 (O'Connor et al., 2006). Este represor recluta a las HDAC y a SMRT/NCoR formando un complejo desacetilador-represor, y esto, sumado a que CREBBP / EP300 (complejo histona acetiltransferasa) se encuentra mutado en varios tipos de linfoma, hay una inclinación hacia la desacetilación e incremento de la represión transcripcional. Por esta razón, usando inhibidores de HDAC se puede disminuir la actividad de *BCL6* por fomentar su propia acetilación, así como la acetilación de sus genes blanco, lo cual puede causar el arresto del ciclo celular y la apoptosis en líneas de linfoma B (O'Connor et al., 2006; Zain, Rotter, Goldan, & al., 2007).

Adicionalmente, en la línea celular Raji se observó un número considerable de genes que fueron regulados a la baja en el metabolismo de las pirimidinas, y en menor medida, en la biosíntesis de proteínas. En el primer caso, es interesante resaltar la regulación a la baja del gen *CTPS1*, involucrado en el proceso de síntesis de DNA en linfocitos, ya que se ha demostrado que su proteína (la CTP sintasa) fomenta la proliferación de los linfocitos T y B activados durante la respuesta inmune, siendo un interesante blanco para el desarrollo de drogas inmunosupresoras (Martin et al., 2014). Respecto a la biosíntesis de proteínas, los genes que se disminuyeron fueron EIF4E (complejo EIF4F), EIF1AX (subunidad 40s), EIF5A (subunidad 60s), y ETF1, los tres primeros, pertenecientes a la fase de iniciación, y el último a la fase de terminación. Entre ellos, es importante recalcar el papel de EIF4E, el cual codifica para un miembro del complejo eIF4F (junto con eIF4E y eIF4A), siendo el encargado de enlazar al grupo m⁷G del cap del mRNA en la fase de iniciación de la síntesis de proteínas. Cambios en los niveles de esta proteína afecta en gran medida la traducción de una gran variedad de mRNA codificantes para proteínas de los procesos de proliferación, supervivencia y

promoción del tumor. De esta manera, la sobre-expresión de este gen ha sido relacionada con la disminución de la supervivencia de varios tipos de cáncer y correlaciona con la progresión de la enfermedad y subtipos agresivos del cáncer, convirtiéndolo en un interesante blanco para la terapia metabólica del cáncer (Bhat et al., 2015).

En cuanto a la vía de procesamiento de mRNA en las células Raji, también hubo un número significativo de genes regulados a la baja, entre los cuales es importante resaltar la función de *DHX9*. Este gen codifica para una helicasa (DExH-Box Helicase 9), la cual es capaz de desenrollar RNA y DNA, así como estructuras polinucleótidas aberrantes. Este gen ha demostrado sensibilizar células de linfoma (con BCL2 sobre-expresado) a inhibidores de BCL2 (tal como ABT-737). De hecho, la supresión de este gen es letal para la progresión de los linfomas a nivel *in vitro* e *in vivo*, por lo que puede ser considerado como un posible blanco para el tratamiento de linfomas (T. Lee, Paquet, Larsson, & Pelletier, 2016). Además de las vías mencionadas, es importante resaltar la inducción observada de TET2 para esta línea celular. Las enzimas TET (TET1, 2 y 3) son encargadas de desmetilar de forma directa al DNA, mediante oxidaciones consecutivas del grupo metilo de la 5 metilcitosina (Kohli & Zhang, 2013). Entre estas enzimas, TET2 se ha encontrado frecuentemente mutado dentro de su región codificante (pérdida de función) en cánceres hematopoyéticos, causando una falla en la oxidación de 5 metilcitosina, y por tanto, alterando el proceso de desmetilación (Chiba, 2017; Langemeijer et al., 2009; Tefferi, Lim, & Levine, 2009). En linfomas se ha visto que estas mutaciones de TET2 puede ocurrir tanto en etapas tempranas como tardías del desarrollo linfóide y su inactivación puede predisponer el desarrollo de enfermedades hematológicas. De esta manera, la inducción de TET2 podría reactivar su función como desmetilante de DNA, reduciendo los niveles de hipermetilación de las islas CpG observado en diferentes genes supresores de tumor, conllevándolos a su reactivación. De hecho, una de las proyecciones de las terapias epigenéticas es no solamente el desarrollo de inhibidores de DNMT y HDAC, sino la posible inducción de TET. Este incremento observado correlaciona con estudios previos de hidralazina, donde se ha visto que este fármaco puede inducir TET3 y atenuar la progresión de la enfermedad de riñón crónica (Tampe et al., 2015).

Por otro lado, respecto a las vías aún no mencionadas con interesantes cambios de expresión en la línea celular Hut 78, fueron: PI3K/AKT/mTOR, las vías de MAPK, receptores Toll-like y metabolismo de lípidos. En cuanto a la vía de PI3K/AKT/mTOR, lo más destacable es que a pesar de que *AKT3* fue inducido y, por tanto, podría inducir la proliferación celular, también se indujo *PHLPP1*, el cual desfosforila e inactiva a *AKT3*, considerado como un supresor de tumor (Dong et al., 2014); por lo que a pesar de que se podría estar induciendo éste último, la acción de *PHLPP1* podría contrarrestar la activación de la vía. Respecto a las vías de MAPK, es interesante discutir la inducción del gen *MAP3K8*. *MAP3K8* (también conocido como TPI-2) codifica para un miembro de la familia de MAP3K, el cual, ha tenido un rol contradictorio en cáncer, puesto que se ha demostrado que puede promover el desarrollo de tumores (por ejemplo: activar la vía de NF- κ B), pero

también puede actuar como supresor de tumor (H. W. Lee, Choi, Joo, & Nam, 2015). De hecho, entre los estudios que se destacan como supresor de tumor, se ha visto que participa en la transducción de señales de receptores de células T anti-proliferativos e inhibe la transformación de células T estimuladas crónicamente (Tsatsanis et al., 2008), por lo que su función en el efecto observado en Hut 78, podría inclinarse como supresor de tumor, pero hacen falta aún más estudios que aclaren el mecanismo de acción de este gen. En cuanto a la vía de receptores Toll-like, hubo una fuerte inducción de los genes *TLR1* y *TLR6*. Los TLR son una familia de receptores transmembranales que reconocen patrones moleculares de origen microbiano, siendo muy importantes para la respuesta inmune (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). Estos, han presentado también un rol contradictorio en cáncer, puesto que, por un lado, han demostrado estimular la proliferación, angiogénesis y quimioresistencia de las células cancerígenas, pero por otro lado, también han demostrado que pueden fomentar la apoptosis, quimiosensibilidad, citotoxicidad y suprimir la angiogénesis, por lo que su función aún permanece en investigación (Shcheblyakov et al., 2010). Sin embargo, entre estas posibles funciones sobresale la inducción de apoptosis que ha demostrado tener TLR2 (la cual está asociada a TLR6) a través de MYD88, involucrando la ruta de FADD y casp 8 (Aliprantis, Yang, Weiss, Godowski, & Zychlinsky, 2000), así como la inmunidad de células T antitumoral inducida por TLR4, donde se demostró que los pacientes con cáncer de mama que presentaban una mutación de pérdida de función en el gen TLR4, recaían más rápidamente después de radioterapia y quimioterapia, que aquellos que tenían el alelo TLR4 normal (Apetoh et al., 2007). De hecho, una de las terapias inmunológicas del cáncer que actualmente se están desarrollando es buscar agonistas de las TLR. Este efecto de las TLR nos podría ampliar aún más el panorama de los posibles efectos antiproliferativos que la combinación de hidralazina y valproato estarían generando en la línea celular Hut 78.

Adicionalmente, respecto a las vías metabólicas en Hut 78, observamos una notable regulación a la baja de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos, tales como *ACACA*, *SREBF1*, *FASN* y *SCD*. Es bien sabido que las células cancerígenas presentan un metabolismo acelerado para su rápido crecimiento, y en consecuencia de ello, han demostrado tener un incremento en la lipogénesis en células de diferentes tipos tumorales. Entre esos genes, queremos destacar el rol de *FASN*, *SCD* y *ACACA* (el cual se discutirá más adelante). *FASN*, codifica para una enzima (sintetasa de ácidos grasos) la cual cataliza la síntesis de palmitato a partir de acetil-coA, malonil-coA y NADPH. Esta enzima se ha encontrado sobre-expresada en varios tipos de cáncer, y su sobre-expresión ha sido asociada con crecimiento tumoral, supervivencia y pobre pronóstico. De hecho, uno de los principales blancos para la terapia metabólica del cáncer ha sido *FASN*, donde se han desarrollado inhibidores tales como Orlistat, o C75, los cuales han demostrado inducir apoptosis y retrasar el crecimiento tumoral a nivel *in vitro* e *in vivo*, aunque sus mecanismos moleculares no están bien comprendidos (Flavin, Peluso, Nguyen, & Loda, 2010). *SCD* codifica para la enzima esteroil-CoA desaturasa, la cual participa en la biosíntesis de novo de ácidos grasos insaturados (principalmente ácido oleico). Su función en las células cancerígenas, es precisamente proveer a la célula de ácidos grasos insaturados para generar membranas y mantener la fluidez membranal. Al

igual que para FASN, para esta enzima se están desarrollando una variedad de fármacos en la terapia metabólica del cáncer, aunque han presentado toxicidad considerable (Paton & Ntambi, 2009; Theodoropoulos et al., 2016). Lo anterior, nos da una perspectiva aún más amplia de la acción de los inhibidores de HDAC y DNMT, donde no solamente están activando genes supresores de tumor, sino también, están involucrando a procesos metabólicos de las células cancerígenas, para reducir su proliferación. Esto ha sido previamente demostrado, que la combinación de inhibidores de HDAC y DNMT regula a la baja a genes en las vías catabólicas y metabólicas más importantes, tal como el metabolismo de proteínas, lípidos, entre otros, en un modelo de CTCL (E. Marchi et al., 2015).

Finalmente, respecto a los genes que se sobre-expresaron y regularon a la baja entre las dos líneas celulares (figura 32, tabla 7: anexos), en primer lugar, es interesante destacar el gen sobre-expresado Jun, el cual fue el gen que mayor número de vías estuvo involucrado. *JUN* codifica para un miembro de los factores de transcripción de la familia AP-1, los cuales controlan la transcripción cuando se enlazan a secuencias específicas de DNA. Se ha visto que la activación de la ruta JNK-AP-1 (Cinasas N-Terminal c-Jun – Proteína Activadora 1) induce la activación de genes pro-apoptóticos tales como TNF- α , Fas-L y Bak, así como puede disminuir la expresión de genes que fomentan la supervivencia, siendo la trans-activación de *JUN* requerida para su actividad apoptótica (Dhanasekaran & Reddy, 2008). En un estudio realizado por Chue (2017), utilizando varios inhibidores de HDAC en diferentes líneas celulares (tumores sólidos y hematológicos), así como en pacientes con CTCL, se observó que el gen *JUN* se sobre-expresó en todos los casos. De hecho, ellos determinaron que la magnitud de la inducción de este gen (junto con *FOS*, y *ATF3*) correlacionó con la apoptosis inducida por vorinostat (HDACi) en 50 líneas celulares, independientemente del tipo de tumor; aunque determinaron que solamente la inducción de *ATF3* (el cual fue sobre-expresado sólo en Raji) fue requerida para la apoptosis inducida por HDACi, al reprimir la expresión de la familia de BCL2-XL. Esto nos podría dar un indicio que la sobre-expresión de *JUN* puede estar asociada con el efecto antitumoral que presentan los inhibidores de HDAC, pero hacen falta estudios que precisen sobre cuál es realmente su función. En segundo lugar, en cuanto a los genes que se regularon a la baja entre ambas líneas, es interesante destacar la función de ACACA. *ACACA* codifica para la Acetil-CoA-carboxilasa α , la cual cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, el paso limitante de la síntesis de ácidos grasos. Esta enzima se ha encontrado sobre-expresada en cáncer de mama principalmente, y su presencia ha sido esencial para su supervivencia (Chajes, Cambot, Moreau, Lenoir, & Joulin, 2006). De hecho, haciendo knockdown de este gen, se ha inhibido el crecimiento e inducido apoptosis en un modelo de cáncer de próstata (Brusselmans, De Schrijver, Verhoeven, & Swinnen, 2005). Adicionalmente, este gen, junto con *FASN* y *SCD* (las otras enzimas blanco en la biosíntesis de ácidos grasos) son altamente inducidos por *MYC* (un potencial oncogén) (Dang, 2013). De esta manera, ya que este gen fue reducido en las dos líneas, así como *FASN* y *SCD* para Hut 78, podemos sugerir que la acción de valproato e hidralazina efectivamente si está alterando los procesos metabólicos de las células cancerígenas, especialmente se

está reduciendo la biosíntesis de ácidos grasos, y así, atenuando su rápido crecimiento.

De esta manera, hemos podido observar que la combinación de hidralazina y valproato ha presentado efecto antiproliferativo en las líneas de linfoma T y B, mediante la reactivación de genes supresores de tumor y silenciamiento de oncogenes. Principalmente, hemos podido observar los genes responsables del arresto del ciclo celular y apoptosis observados en Hut 78 y Raji, así como la reactivación y silenciamiento de otros posibles genes que estén apoyando el efecto anti-proliferativo de estos fármacos; por lo que es necesario, comenzar nuevas investigaciones que se enfoquen en el rol de los genes más importantes encontrados con los microarreglos, para analizar a mayor profundidad cuál ha sido su relación con el efecto observado, y así, poder identificar posibles genes blanco para la terapia epigenética del cáncer.

CONCLUSIONES

- La combinación de hidralazina-valproato presentó un efecto antiproliferativo en las líneas celulares Hut 78, Raji y Toledo, el cual fue dosis-dependiente y tiempo-dependiente.
- Las líneas celulares de linfoma de células B fueron más sensibles al tratamiento con hidralazina-valproato que la línea celular de linfoma de células T.
- La combinación de hidralazina-valproato indujo arresto del ciclo celular en G2/M en la línea celular Hut 78, y en G0/G1 en las líneas celulares Toledo y Raji. El arresto observado en Hut 78, se sugiere que fue modulado por la inducción de CDKN1A; mientras que el arresto en Raji, se sugiere que fue llevado a cabo por la inducción de CDKN1B y RB1, así como por la regulación a la baja de los genes involucrados en la fase de síntesis de DNA.
- La combinación de hidralazina-valproato fue capaz de inducir apoptosis a las líneas Hut 78, Raji y Toledo. En cuanto a la línea celular Hut 78, hubo una inducción de genes pro-apoptóticos y silenciamiento de genes anti-apoptóticos involucrados en la vía intrínseca de la apoptosis; mientras que para la línea celular Raji, estos genes fueron involucrados principalmente en la vía extrínseca, así como podría estar apoyado por la inducción de STAT1 e IFNB1.
- El efecto antiproliferativo observado en Hut 78 mediante microarreglos, además del arresto del ciclo celular y apoptosis, también podría estar mediado por los interesantes cambios de expresión observados en genes de las vías de PI3K/AKT/mTOR, MAPK, receptores Toll-like y biosíntesis de ácidos grasos. En cuanto a las células Raji, este efecto estuvo también podría haber sido modulado por alteraciones en la vía de retinoblastoma, JAK/STAT, IFN alfa/beta, respuesta al daño de DNA, receptores de células B, biosíntesis de ácidos grasos, proteínas y pirimidinas, así como el procesamiento de mRNA.
- La validación de los genes *FASN*, *SCD* y *STAT1* nos comprueba que los resultados obtenidos en los microarreglos para estos genes son verídicos.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto antitumoral de la combinación de hidralazina y valproato en un modelo in vivo de linfoma no Hodgkin de células B.
- Elucidar los cambios de metilación global del DNA inducidos por la combinación de hidralazina y valproato mediante methyl-seq.
- Evaluar la función del gen JUN el cual fue sobre-expresado en ambas líneas celulares, y su expresión ha estado asociada por la acción de los inhibidores de HDAC.

- Profundizar sobre la inducción observada en TET2 para la línea celular Raji, con el fin de determinar si la inhibición de la metilación no solamente fue modulada por la inhibición de las DNMT y HDAC, sino también por la inducción del efecto desmetilante de las TET.
- Validar los genes seleccionados de los resultados de microarreglos mediante Western blot.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achachi, A., Florins, A., Gillet, N., Debacq, C., Urbain, P., Manfouo, G., . . . Willems, L. (2005). *PNAS*, *102*(29), 10309-10314.
- Adult Non-Hodgkin Lymphoma Treatment–Patient Version (PDQ®). (2016, Marzo 3). Retrieved from <http://www.cancer.gov/types/lymphoma/patient/adult-nhl-treatment-pdq>
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P., & Zychlinsky, A. (2000). The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J*, *19*(13), 3325-3336. doi: 10.1093/emboj/19.13.3325
- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, *17*(8), 487-500. doi: 10.1038/nrg.2016.59
- Amara, K., Ziadi, S., Hachana, M., Soltani, N., Korbi, S., & Trimeche, M. (2010). DNA methyltransferase DNMT3b protein overexpression as a prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Sci*, *101*(7), 1722-1730. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01569.x
- Angeles, E., Vázquez, V., Vázquez, O., Velazquez, M., Ramirez, A., Martinez, L., . . . Dueñas, A. (2005). Computational studies of 1-hydrazinophtalazine (hydralazine) as antineoplastic agent. Docking studies on methyltransferase. *Lett Drug Design Discov*, *2*, 282-286.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., . . . Zitvogel, L. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, *13*(9), 1050-1059. doi: 10.1038/nm1622
- Bai, X., Song, Z., Fu, Y., Yu, Z., Zhao, L., Zhao, H., . . . Wei, M. (2012). Clinicopathological significance and prognostic value of DNA methyltransferase 1, 3a, and 3b expressions in sporadic epithelial ovarian cancer. *PLoS One*, *7*(6), e40024. doi: 10.1371/journal.pone.0040024
- Ballestar, E., & Esteller, M. (2005). Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochem. Cell. Biol.*, *83*, 374-384.
- Baur, A. S., Shaw, P., Burri, N., Delacretaz, F., Bosman, F. T., & Chaubert, P. (1999). Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood*, *94*(5), 1773-1781.
- Baus, D., Nonnenmacher, F., Jankowski, S., Doring, C., Brautigam, C., Frank, M., . . . Pfitzner, E. (2009). STAT6 and STAT1 are essential antagonistic regulators of cell survival in classical Hodgkin lymphoma cell line. *Leukemia*, *23*(10), 1885-1893. doi: 10.1038/leu.2009.103
- Bellas Menéndez, C. (2004). Linfoma Hodgkin. *Revista española de patología*, *37*(2).
- Bender, C., Pao, M., & Jones, P. (1998). Inhibition of DNA methylation by 5-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res*, *58*, 95-101.
- Bernardo, A. R., Cosgaya, J. M., Aranda, A., & Jimenez-Lara, A. M. (2013). Synergy between RA and TLR3 promotes type I IFN-dependent apoptosis through upregulation of TRAIL pathway in breast cancer cells. *Cell Death Dis*, *4*, e479. doi: 10.1038/cddis.2013.5

- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., & Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *14*(4), 261-278. doi: 10.1038/nrd4505
- Blaheta, R., Michaelis, M., & Driever, P. (2005). Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* *25*, 383-397.
- Brauninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renne, C., Hansmann, M.-L., & Kuppers, R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Cancer*, *118*, 1853-1861.
- Brusselmans, K., De Schrijver, E., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*, *65*(15), 6719-6725. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0571
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., . . . Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, *282*(5393), 1497-1501.
- Cain, K. (2003). Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev*, *35*(4), 337-363. doi: 10.1081/DMR-120026497
- Cardenas, M., Oswald, E., Yu, W., Xue, F., Mackerell, A., & Melnick, A. (2017). The expanding role of the BCL6 oncoprotein as a cancer therapeutic target. *Clinical cancer research*, *23*(4), 885-893.
- Carlo-Stella, C., Lavazza, C., Locatelli, A., Vigano, L., Gianni, A. M., & Gianni, L. (2007). Targeting TRAIL agonistic receptors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, *13*(8), 2313-2317. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2774
- Clozel, T., Yang, S., Elstrom, R. L., Tam, W., Martin, P., Kormaksson, M., . . . Cerchietti, L. (2013). Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Discov*, *3*(9), 1002-1019. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0117
- Crump, M., Coiffier, B., Jacobsen, E., Sun, L., Ricker, L., Xie, H., . . . Cheson, B. (2008). Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Annals of oncology*, *19*, 964-969.
- Chajes, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., & Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res*, *66*(10), 5287-5294. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1489
- Chang, H. H., Chiang, C. P., Hung, H. C., Lin, C. Y., Deng, Y. T., & Kuo, M. Y. (2009). Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol*, *45*(7), 610-614. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.08.011
- Chang, T. P., & Vancurova, I. (2014). Bcl3 regulates pro-survival and pro-inflammatory gene expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(11), 2620-2630. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.07.012
- Chavez-Blanco, A., Perez-Plasencia, C., Perez-Cardenas, E., Carrasco-Legleu, C., Rangel-Lopez, E., Segura-Pacheco, B., . . . Duenas-Gonzalez, A. (2006). Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int*, *6*, 2. doi: 10.1186/1475-2867-6-2
- Chávez, A., Perez, C., Perez, E., Carrasco, C., Rangel, E., Segura, B., . . . Dueñas, A. (2006). Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell International*, *6*(2).
- Cerchietti, L., Hatzi, K., Caldas, E., Ning, S., Figueroa, M., Morin, R., . . . Melnick, A. (2010). BCL6 repression of EP300 in human diffuse large B cell lymphoma cells provides a basis for rational combinatorial therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(12), 4569-4582.

- Chiba, S. (2017). Dysregulation of TET2 in hematologic malignancies. *Int J Hematol*, 105(1), 17-22. doi: 10.1007/s12185-016-2122-z
- Childhood Hodgkin Lymphoma Treatment–Health Professional Version (PDQ®). (2016, February 3). Retrieved from <http://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/child-hodgkin-treatment-pdq>
- Cho, H. J., Park, S. M., Hwang, E. M., Baek, K. E., Kim, I. K., Nam, I. K., . . . Yoo, J. (2010). Gadd45b mediates Fas-induced apoptosis by enhancing the interaction between p38 and retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem*, 285(33), 25500-25505. doi: 10.1074/jbc.M109.091413
- Choi, E. A., Lei, H., Maron, D. J., Wilson, J. M., Barsoum, J., Fraker, D. L., . . . Spitz, F. R. (2003). Stat1-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the cell-surface death signaling pathway by interferon beta in human cancer cells. *Cancer Res*, 63(17), 5299-5307.
- Dang, C. V. (2013). MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(8). doi: 10.1101/cshperspect.a014217
- Deng, C., Lu, Q., Zhang, Z., Rao, T., Attwood, J., Yung, R., & Richardson, B. (2003). Hydralazine May Induce Autoimmunity by Inhibiting Extracellular Signal–Regulated Kinase Pathway Signaling. *Arthritis and rheumatism*, 48(3), 746-756.
- Dengler, M. A., Weilbacher, A., Gutekunst, M., Staiger, A. M., Vohringer, M. C., Horn, H., . . . van der Kuip, H. (2014). Discrepant NOXA (PMAIP1) transcript and NOXA protein levels: a potential Achilles' heel in mantle cell lymphoma. *Cell Death Dis*, 5, e1013. doi: 10.1038/cddis.2013.552
- Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245-6251. doi: 10.1038/onc.2008.301
- Different types of non Hodgkin lymphoma. (2014, Septiembre 1). Retrieved from <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/non-hodgkins-lymphoma/about/types/the-most-common-types-of-non-hodgkins-lymphoma>
- Dong, L., Jin, L., Tseng, H. Y., Wang, C. Y., Wilmott, J. S., Yosufi, B., . . . Guo, S. T. (2014). Oncogenic suppression of PHLPP1 in human melanoma. *Oncogene*, 33(39), 4756-4766. doi: 10.1038/onc.2013.420
- Duenas-Gonzalez, A., Vega, M. T., Martinez-Banos, D., Garcia-Hidalgo, L., & Sobrevilla, P. (2010). Response to hydralazine-valproate in a patient with mycosis fungoides. *Case Rep Med*, 2010, 657579. doi: 10.1155/2010/657579
- Dueñas González, A., Coronel, J., Cetina, L., González Fierro, A., Chavez Blanco, A., & Taja Chayeb, L. (2014). Hidralazine--valproate: a repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. *Expert opin. Drug Metab. Toxicol*, 10(10).
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 12(15), 2245-2262.
- Enfermedad de Hodgkin. (2016, 02 16). Retrieved from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/enfermedaddehodgkin/guiadetallada/enfermedad-de-hodgkin-what-is-what-is-hodgkin-disease>
- Epigenetics. (2016). Retrieved from <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>
- Espinoza-Zamora, J. R., Labardini-Mendez, J., Sosa-Espinoza, A., Lopez-Gonzalez, C., Vieyra-Garcia, M., Candelaria, M., . . . Duenas-Gonzalez, A. (2017). Efficacy of hydralazine and valproate in cutaneous T-cell lymphoma, a phase II study. *Expert Opin Investig Drugs*, 26(4), 481-487. doi: 10.1080/13543784.2017.1291630
- Esteller, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 50-59.
- Falkenberg, K., & Johnstone, R. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 673-691.

- Flaus, A., & Owen-Hughes, T. (2001). Mechanisms for ATP dependent chromatin remodeling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, *11*, 148-154.
- Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*, *6*(4), 551-562. doi: 10.2217/fon.10.11
- Freedman, A., & Nadler, L. (2000). Chapter 130: Non-Hodgkin's Lymphomas *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton: BC Decker Inc.
- Fritzsche, F. R., Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., . . . Kristiansen, G. (2008). Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer*, *8*, 381. doi: 10.1186/1471-2407-8-381
- Gao, J., Wang, L., Xu, J., Zheng, J., Man, X., Wu, H., . . . Li, Z. (2013). Aberrant DNA methyltransferase expression in pancreatic ductal adenocarcinoma development and progression. *J Exp Clin Cancer Res*, *32*, 86. doi: 10.1186/1756-9966-32-86
- Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, *25*(38), 5220-5227. doi: 10.1038/sj.onc.1209615
- Gibney, E., & Nolan, C. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, *105*, 4-13.
- Gil, V. S., Bhagat, G., Howell, L., Zhang, J., Kim, C. H., Stengel, S., . . . Petrie, K. (2016). Deregulated expression of HDAC9 in B cells promotes development of lymphoproliferative disease and lymphoma in mice. *Dis Model Mech*, *9*(12), 1483-1495. doi: 10.1242/dmm.023366
- Gilardini, M., Granato, M., Santoni, C., Del Porto, P., Merendino, N., D'Orazi, G., . . . Cirone, M. (2017). Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. *Cellular Oncology*, *40*(2), 167-180.
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O., Schimpf, A., Giavara, S., . . . Heinzl, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal*, *20*(24), 6969-6978.
- Graca, I., Sousa, E., Costa, P., Vieira, F., Torres, J., Gabriela, M., . . . Jerónimo, C. (2014). Anti-neoplastic properties of hydralazine in prostate cancer. *Oncotarget*, *5*(15), 5950-5964.
- Graca, I., Sousa, E. J., Costa-Pinheiro, P., Vieira, F. Q., Torres-Ferreira, J., Martins, M. G., . . . Jeronimo, C. (2014). Anti-neoplastic properties of hydralazine in prostate cancer. *Oncotarget*, *5*(15), 5950-5964. doi: 10.18632/oncotarget.1909
- Gu, S., Tian, Y., Chlenski, A., Salwen, H., Lu, Z., Raj, U., & Yang, Q. (2012). Valproic acid shows potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anticancer Drugs*, *23*(10), 1054-1066.
- Gurvich, N., Tsygankova, O., Meinkoth, J., & Klein, P. (2004). Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* *64*, 1079-1086.
- Hao, Y., Wang, G., Lin, C., Li, D., Ji, Z., Gao, F., . . . Wang, D. (2017). Valproic Acid Induces Decreased Expression of H19 Promoting Cell Apoptosis in A549 Cells. *DNA and cell biology*, *36*(6), 1-8.
- Hayashi, A., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Hayashi, T., Fuseya, C., Suzuki, A., . . . Shiozawa, T. (2010). Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. *Int J Cancer*, *127*(6), 1332-1346. doi: 10.1002/ijc.25151
- Hayette, S., Thomas, X., Jallades, L., Chabane, K., Charlot, C., Tigaud, I., . . . Michallet, M. (2012). High DNA methyltransferase DNMT3B levels: a poor prognostic marker in acute myeloid leukemia. *PLoS One*, *7*(12), e51527. doi: 10.1371/journal.pone.0051527
- Hong, S., Kim, H. Y., Kim, J., Ha, H. T., Kim, Y. M., Bae, E., . . . Kim, S. J. (2013). Smad7 protein induces interferon regulatory factor 1-dependent transcriptional activation of caspase 8 to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, *288*(5), 3560-3570. doi: 10.1074/jbc.M112.400408

- Huang, D. C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., . . . Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(26), 14871-14876.
- Huang, Q., Ai, L., Zhang, Z. Y., Fan, C. Y., & Weiss, L. M. (2004). Promoter hypermethylation and protein expression of the p16 gene: analysis of 43 cases of B-cell primary gastric lymphomas from China. *Mod Pathol*, *17*(4), 416-422. doi: 10.1038/modpathol.3800072
- Huang, X., Takata, K., Sato, Y., Tanaka, T., Ichimura, K., Tamura, M., . . . Yoshino, T. (2011). Downregulation of the B-cell receptor signaling component CD79b in plasma cell myeloma: a possible post transcriptional regulation. *Pathol Int*, *61*(3), 122-129. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02634.x
- Jarvis, C. D., Geiman, T., Vila-Storm, M. P., Osipovich, O., Akella, U., Candeias, S., . . . Muegge, K. (1996). A novel putative helicase produced in early murine lymphocytes. *Gene*, *169*(2), 203-207.
- Johnstone, R. W. (2002). Histone-Desacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*, 287-299.
- Kalac, M., Scotto, L., Marchi, E., Amengual, J., Seshan, V., Bhagat, G., . . . O'Connor, O. (2011). HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLCL. *Blood*, *118*(20).
- Karlic, R., Chung, H. R., Lasserre, J., Vlahovicek, K., & Vingrom, M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*, *107*, 2926-2931.
- Kim, A., Seong, K. M., Kang, H. J., Park, S., & Lee, S. S. (2015). Inhibition of Lyn is a promising treatment for mantle cell lymphoma with bortezomib resistance. *Oncotarget*, *6*(35), 38225-38238. doi: 10.18632/oncotarget.5425
- Kim, H. S., & Lee, M. S. (2007). STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal*, *19*(3), 454-465. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.09.003
- King, R. J. B., & Robins, M. W. (2006). *Cancer biology*. Harlow: PEARSON.
- Kobayashi, Y., Absher, D. M., Gulzar, Z. G., Young, S. R., McKenney, J. K., Peehl, D. M., . . . Sherlock, G. (2011). DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res*, *21*(7), 1017-1027. doi: 10.1101/gr.119487.110
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, *502*(7472), 472-479. doi: 10.1038/nature12750
- Kramer, O. H., Baus, D., Knauer, S. K., Stein, S., Jager, E., Stauber, R. H., . . . Heinzl, T. (2006). Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev*, *20*(4), 473-485. doi: 10.1101/gad.364306
- Kramer, S., Hikel, S., Adams, K., Hinds, D., & Moon, K. (2012). Current Status of the Epidemiologic Evidence Linking Polychlorinated Biphenyls and Non-Hodgkin Lymphoma, and the Role of Immune Dysregulation. *Environmental Health Perspectives*, *120*(8), 1067-1075.
- Lamers, F., van der Ploeg, I., Schild, L., Ebus, M. E., Koster, J., Hansen, B. R., . . . Molenaar, J. J. (2011). Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr Relat Cancer*, *18*(6), 657-668. doi: 10.1530/ERC-11-0207
- Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., . . . Jansen, J. H. (2009). Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, *41*(7), 838-842. doi: 10.1038/ng.391
- Lee, H. W., Choi, H. Y., Joo, K. M., & Nam, D. H. (2015). Tumor progression locus 2 (Tpl2) kinase as a novel therapeutic target for cancer: double-sided effects of Tpl2 on cancer. *Int J Mol Sci*, *16*(3), 4471-4491. doi: 10.3390/ijms16034471

- Lee, T., Paquet, M., Larsson, O., & Pelletier, J. (2016). Tumor cell survival dependence on the DHX9 DExH-box helicase. *Oncogene*, *35*(39), 5093-5105. doi: 10.1038/onc.2016.52
- Leshechenko, V., Kuo, P., Shaknovich, R., Yang, D., Gellen, T., Petrich, A., . . . Parekh, S. (2010). Genomewide DNA methylation analysis reveals novel targets for drug development in mantle cell lymphoma. *Blood*, *116*(7), 1025-1034.
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, *128*, 707-719.
- Li, J., Yang, X. K., Yu, X. X., Ge, M. L., Wang, W. L., Zhang, J., & Hou, Y. D. (2000). Overexpression of p27(KIP1) induced cell cycle arrest in G(1) phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol*, *6*(4), 513-521.
- Liang, X. Q., Cao, E. H., Zhang, Y., & Qin, J. F. (2004). A P53 target gene, PIG11, contributes to chemosensitivity of cells to arsenic trioxide. *FEBS Lett*, *569*(1-3), 94-98. doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.057
- Lin, R. K., Hsu, H. S., Chang, J. W., Chen, C. Y., Chen, J. T., & Wang, Y. C. (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer*, *55*(2), 205-213. doi: 10.1016/j.lungcan.2006.10.022
- Linfoma de Hodgkin: Panorama general. (2015, 10). Retrieved from <http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/linfoma-de-hodgkin/panorama-general>
- Liu, Y., Sun, L., Fong, P., Yang, J., Zhang, Z., Yin, S., . . . Shao, G. (2017). An association between overexpression of DNA methyltransferase 3B4 and clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*, *8*(12), 19712-19722. doi: 10.18632/oncotarget.14966
- Loscher, W. (2002). Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*, *16*, 669-669.
- Lue, J. K., Amengual, J. E., & O'Connor, O. A. (2015). Epigenetics and Lymphoma: Can We Use Epigenetics to Prime or Reset Chemoresistant Lymphoma Programs? *Curr Oncol Rep*, *17*(9), 40. doi: 10.1007/s11912-015-0464-y
- Maeda, E., Akahane, M., Kiryu, S., Kato, N., Yoshikawa, T., Hayashi, N., . . . Ohtomo, K. (2009). Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: A pictorial review. *Japanese Journal of Radiology*, *27*(1), 4-19.
- Marchi, E., Zullo, K., Amengual, J., Kalac, M., Bongero, D., McIntosh, C., . . . O'Connor, O. (2015). The combination of hypomethylating agents and histone deacetylase inhibitors produce marked synergy in preclinical models of T-cell lymphoma. *British Journal of Hematology*, *171*, 215-226.
- Marchi, E., Zullo, K. M., Amengual, J. E., Kalac, M., Bongero, D., McIntosh, C. M., . . . O'Connor, O. A. (2015). The combination of hypomethylating agents and histone deacetylase inhibitors produce marked synergy in preclinical models of T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. doi: 10.1111/bjh.13566
- Marchion, D., Bicaku, E., & Daud, A. (2005). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res*, *65*, 3815-3822.
- Marquard, L., Gjerdrum, L., Christensen, I., Jensen, P., Sehested, M., & Ralfkiaer, E. (2008). Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology*, *53*, 267-277.
- Marquard, L., Poulsen, C., Gjerdrum, L., Brown, P., Christensen, I., Jensen, P., . . . Ralfkiaer, E. (2009). Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. *Histopathology*, *54*, 688-698.
- Martin-Subero, J. I., Ammerpohl, O., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Agirre, X., Alvarez, S., . . . Siebert, R. (2009). A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One*, *4*(9), e6986. doi: 10.1371/journal.pone.0006986

- Martin de Civetta, M. T., & Domingo Civetta, J. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública Méx*, 53(5), 405-414.
- Martin, E., Palmic, N., Sanquer, S., Lenoir, C., Hauck, F., Mongellaz, C., . . . Latour, S. (2014). CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation. *Nature*, 510(7504), 288-292. doi: 10.1038/nature13386
- Milutinovic, S., C.D' Alessio, A., Detich, N., & Szyf, M. (2007). Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*, 28(3), 560-571.
- Moreira Junior, G., Colleoni, G. W., Cangi, M. G., Murphy, M., Sherburne, B., Bordin, J. O., & Loda, M. (2003). Reciprocal Cdc25A and p27 expression in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol*, 12(3), 128-132.
- Na, S. Y., Choi, J. E., Kim, H. J., Jhun, B. H., Lee, Y. C., & Lee, J. W. (1999). Bcl3, an I kappa B protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *J Biol Chem*, 274(40), 28491-28496.
- Nan, X., Ng, H., Johnson, C., Turner, B., Eisenman, R., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393, 386-389.
- Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., & Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, 18(1), 629-643.
- O'Connor, O., Heany, M., Schwartz, L., Richardson, S., Willim, R., MacGregor-Cortelli, Barbara, . . . Kelly, W. (2006). Clinical Experience With Intravenous and Oral Formulations of the Novel Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid in Patients With Advanced Hematologic Malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 24(1), 166-173.
- O'Riain, C., O'Shea, D. M., Yang, Y., Le Dieu, R., Gribben, J. G., Summers, K., . . . Fitzgibbon, J. (2009). Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia*, 23(10), 1858-1866. doi: 10.1038/leu.2009.114
- Oh, B. K., Kim, H., Park, H. J., Shim, Y. H., Choi, J., Park, C., & Park, Y. N. (2007). DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med*, 20(1), 65-73.
- Paradis, F. H., & Hales, B. F. (2015). Valproic Acid Induces the Hyperacetylation of P53, Expression of P53 Target Genes, and Markers of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Midorganogenesis Murine Limbs. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 104(5), 177-183. doi: 10.1002/bdrb.21149
- Paton, C. M., & Ntambi, J. M. (2009). Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1), E28-37. doi: 10.1152/ajpendo.90897.2008
- Patra, S. K., Patra, A., & Dahiya, R. (2001). Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 287(3), 705-713. doi: 10.1006/bbrc.2001.5639
- Peters, S., Hlady, R., Opavska, J., Klindebiel, D., Novakova, S., Smith, L., . . . Opavsky, R. (2013). Essential Role for Dnmt1 in the Prevention and Maintenance of MYC-Induced T-Cell Lymphomas. *Mol Cell Biol*, 33(21), 4321-4333.
- Peveling-Oberhag, J., Arcaini, L., Hansmann, M., & Zeuzem, S. (2013). Hepatitis C-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas. Epidemiology, molecular signature and clinical management. *Journal of Hepatology*, 59(1), 169-177.

- Pinzone, M., Fiorica, F., Di Rosa, M., Malaguarnera, G., Malaguarnera, L., Capocardo, B., . . . Nunnari, G. (2012). Non-AIDS-defining cancers among HIV-infected people. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *16*(10), 1377–1388.
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, *28*(10), 1057-1068.
- Press, O. W., & Lichtman, M. A. (2016). *Hematología* (Vol. 9). USA: Mc Graw Hill.
- Purkait, S., Sharma, V., Kumar, A., Pathak, P., Mallick, S., Jha, P., . . . Sarkar, C. (2016). Expression of DNA methyltransferases 1 and 3B correlates with EZH2 and this 3-marker epigenetic signature predicts outcome in glioblastomas. *Exp Mol Pathol*, *100*(2), 312-320. doi: 10.1016/j.yexmp.2016.02.002
- Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*, *9*(1), 57-63. doi: 10.1038/nrc2541
- Rangwala, S., Zhang, C., & Duvic, M. (2012). HDAC inhibitors for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas. *Future Med Chem*, *4*(4), 471-486. doi: 10.4155/fmc.12.6
- Robaina, M. C., Mazzoccoli, L., Arruda, V. O., Reis, F. R., Apa, A. G., de Rezende, L. M., & Klumb, C. E. (2015). Deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis. *Exp Mol Pathol*, *98*(2), 200-207. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.03.006
- Rountree, M., Bachman, K., & Baylin, S. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication. *Nature Genet*, *25*, 269-277.
- Ruiz, M., Martínez, R., Lucendo, E., Campillo, D., Schulze, K., & Ruiz, C. (2016). The antihypertensive drug hydralazine activates the intrinsic pathway of apoptosis and causes DNA damage in leukemic T cells. *Oncotarget*, *7*(16), 21875-21886.
- Safa, A. R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol*, *34*(3), 176-184.
- Sang, Z., Sun, Y., Ruan, H., Cheng, Y., Ding, X., & Yu, Y. (2016). Anticancer effects of valproic acid on oral squamous cell carcinoma via SUMOylation in vivo and in vitro. *Exp Ther Med*, *12*(6), 3979-3987. doi: 10.3892/etm.2016.3907
- Sang, Z., Sun, Y., Ruan, H., Cheng, Y., Ding, X., & Yu, Y. (2016). Anticancer effects of valproic acid on oral squamous cell carcinoma via SUMOylation in vivo and in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, *12*, 3979-3987.
- Santillán, M. (2012). Transkrip®: Primer caso en el mundo de un medicamento aprobado como terapia epigenética dual. http://ciencia.unam.mx/leer/60/Transkrip_Primer_caso_en_el_mundo_de_un_medicamente_aprobado_como_terapia_epigenetica_dual
- Segura Pacheco, B., Perez Cardenas, E., Taja Chayeb, L., Chavez Blanco, A., Revilla Vazquez, A., Benitez Bribiesca, L., & Dueñas Gonzalez, A. (2006). Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with demethylating agent hydralazine. *Journal of translational medicine*, *4*(32).
- Segura Pacheco, B., Trejo Becerril, C., Perez Cardenas, E., Taja Chayeb, L., Mariscal, I., Chavez, A., . . . Dueñas Gonzalez, A. (2003). Reactivation of Tumor Suppressor Genes by the Cardiovascular Drugs Hydralazine and Procainamide and Their Potential Use in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, *9*, 1956-1903.
- Seillier, M., Peugeot, S., Gayet, O., Gauthier, C., N'Guessan, P., Monte, M., . . . Dusetti, N. J. (2012). TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, *19*(9), 1525-1535. doi: 10.1038/cdd.2012.30

- Shan, W., Jiang, Y., Yu, H., Huang, Q., Liu, L., Guo, X., . . . Yang, Z. (2017). HDAC2 overexpression correlates with aggressive clinicopathological features and DNA-damage response pathway of breast cancer. *Am J Cancer Res*, 7(5), 1213-1226.
- Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A., & Jiang, X. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(52), 18030-18035. doi: 10.1073/pnas.0408345102
- Shcheblyakov, D. V., Logunov, D. Y., Tukhvatulin, A. I., Shmarov, M. M., Naroditsky, B. S., & Gintsburg, A. L. (2010). Toll-Like Receptors (TLRs): The Role in Tumor Progression. *Acta Naturae*, 2(3), 21-29.
- Shibahara, T., Onishi, T., Franco, O. E., Arima, K., & Sugimura, Y. (2005). Down-regulation of Skp2 is correlated with p27-associated cell cycle arrest induced by phenylacetate in human prostate cancer cells. *Anticancer Res*, 25(3B), 1881-1888.
- Song, J., Noh, J. H., Lee, J. H., Eun, J. W., Ahn, Y. M., Kim, S. Y., . . . Nam, S. W. (2005). Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113(4), 264-268. doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm_04.x
- Spurling, C. C., Godman, C. A., Noonan, E. J., Rasmussen, T. P., Rosenberg, D. W., & Giardina, C. (2008). HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog*, 47(2), 137-147. doi: 10.1002/mc.20373
- Stephanou, A., & Latchman, D. S. (2005). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors*, 23(3), 177-182. doi: 10.1080/08977190500178745
- Supic, G., Kozomara, R., Zeljic, K., Jovic, N., & Magic, Z. (2017). Prognostic value of the DNMTs mRNA expression and genetic polymorphisms on the clinical outcome in oral cancer patients. *Clin Oral Investig*, 21(1), 173-182. doi: 10.1007/s00784-016-1772-9
- Tampe, B., Tampe, D., Zeisberg, E. M., Muller, G. A., Bechtel-Walz, W., Koziolk, M., . . . Zeisberg, M. (2015). Induction of Tet3-dependent Epigenetic Remodeling by Low-dose Hydralazine Attenuates Progression of Chronic Kidney Disease. *EBioMedicine*, 2(1), 19-36. doi: 10.1016/j.ebiom.2014.11.005
- Tefferi, A., Lim, K. H., & Levine, R. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, 361(11), 1117; author reply 1117-1118. doi: 10.1056/NEJMc091348
- Theodoropoulos, P. C., Gonzales, S. S., Winterton, S. E., Rodriguez-Navas, C., McKnight, J. S., Morlock, L. K., . . . Nijhawan, D. (2016). Discovery of tumor-specific irreversible inhibitors of stearoyl CoA desaturase. *Nat Chem Biol*, 12(4), 218-225. doi: 10.1038/nchembio.2016
- Tollefsbol, T. (2009). *Cancer epigenetics*. Boca Raton: CRS Press.
- Tsatsanis, C., Vaporidi, K., Zacharioudaki, V., Androulidaki, A., Sykulev, Y., Margioris, A. N., & Tsihchlis, P. N. (2008). Tpl2 and ERK transduce antiproliferative T cell receptor signals and inhibit transformation of chronically stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8), 2987-2992. doi: 10.1073/pnas.0708381104
- Van Damme, M., Crompton, E., Meuleman, N., Mineur, P., Bron, D., Lagneaux, L., & Stamatopoulos, B. (2012). HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics*, 7(12), 1403-1412. doi: 10.4161/epi.22674
- Van Doorn, R., Zoutman, W., & Dijkman, R. (2005). Epigenetic Profiling of Cutaneous T-Cell Lymphoma: Promoter Hypermethylation of Multiple Tumor Suppressor Genes Including BCL7a, PTPRG, and p73. *Journal of Clinical Oncology*, 23(17), 3886-3896.
- Von Vasielewski, R., Mengel, M., & Fischer, R. (1997). Classical Hodgkin's disease: clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol*, 151, 1123-1130.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., Losick, R., & Harrison, S. (2013). *Molecular biology of the gen*. New York: Pearson.

- ¿What is cancer? (2015, 02 09). Retrieved from <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., & Searson, P. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *11*, 512-522.
- Wu, Y., Liu, X. M., Wang, X. J., Zhang, Y., Liang, X. Q., & Cao, E. H. (2009). PIG11 is involved in hepatocellular carcinogenesis and its over-expression promotes Hepg2 cell apoptosis. *Pathol Oncol Res*, *15*(3), 411-416. doi: 10.1007/s12253-008-9138-5
- Xu, J., & Orkin, S. H. (2011). The erythroid/myeloid lineage fate paradigm takes a new player. *EMBO J*, *30*(6), 983-985. doi: 10.1038/emboj.2011.45
- Yang, J., Wei, X., Wu, Q., Xu, Z., Gu, D., Jin, Y., . . . Chen, J. (2011). Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. *Mol Med Rep*, *4*(6), 1139-1143. doi: 10.3892/mmr.2011.578
- Yoo, C., & Jones, P. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews, drug discovery*, *5*, 37-50.
- Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace, A. J., Jr., . . . Roberts, A. B. (2003). Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem*, *278*(44), 43001-43007. doi: 10.1074/jbc.M307869200
- Yu, Z., Xiao, Q., Zhao, L., Ren, J., Bai, X., Sun, M., . . . Wei, M. (2015). DNA methyltransferase 1/3a overexpression in sporadic breast cancer is associated with reduced expression of estrogen receptor-alpha/breast cancer susceptibility gene 1 and poor prognosis. *Mol Carcinog*, *54*(9), 707-719. doi: 10.1002/mc.22133
- Zain, J., Rotter, M., Goldan, B., & al., e. (2007). Valproic acid monotherapy leads to CR in a patient with refractory diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, *48*, 1216-1218.
- Zhao, W. J., Deng, B. Y., Wang, X. M., Miao, Y., & Wang, J. N. (2015). XIAP associated factor 1 (XAF1) represses expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and regulates invasion, cell cycle, apoptosis, and cisplatin sensitivity of ovarian carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(6), 2453-2458.
- Zheng, Z., Cheng, S., Wu, W., Wang, L., Zhao, Y., Shen, Y., . . . Zhao, W.-I. (2014). c-FLIP is involved in tumor progression of peripheral T-cell lymphoma and targeted by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*, *7*(88).

ANEXOS

Calidad de las muestras de RNA para microarreglos.

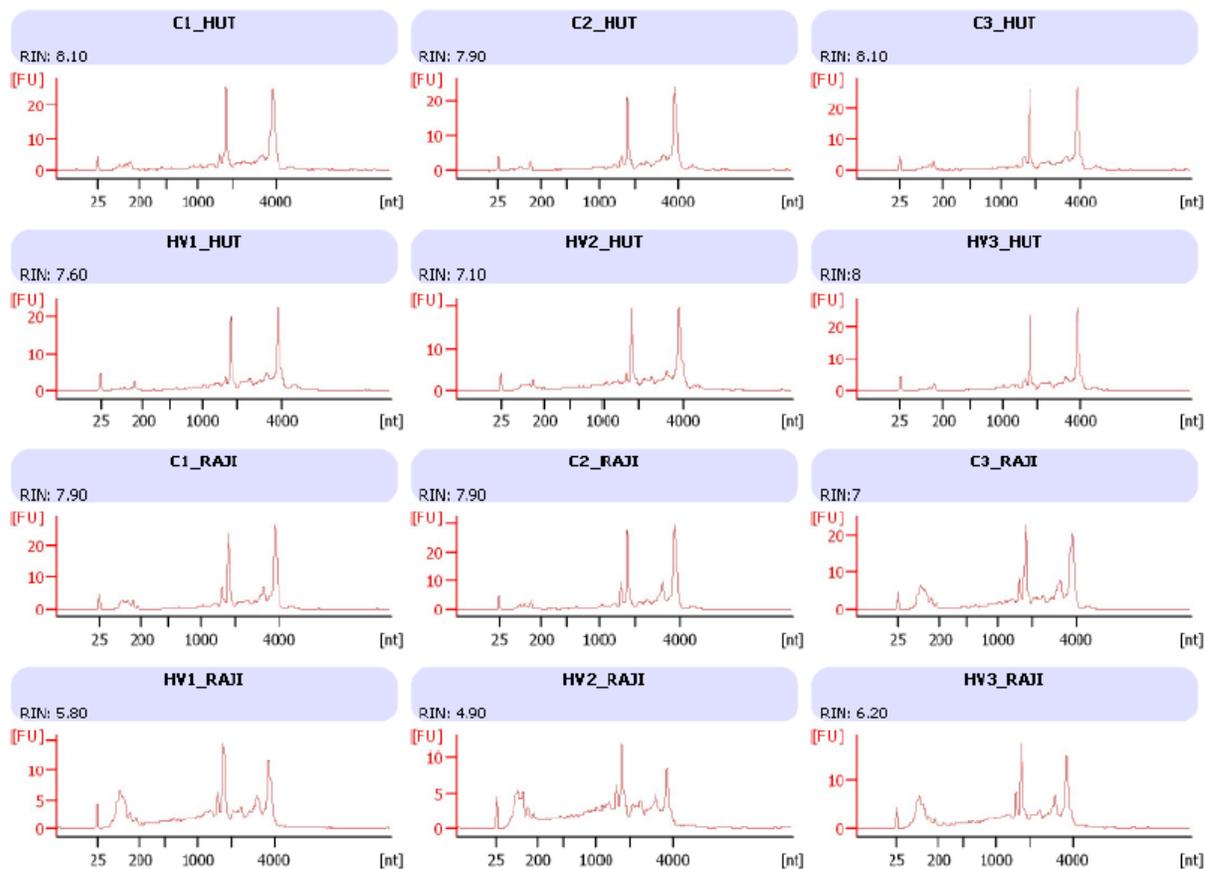


Figura 34. Electroferograma del Bioanalizador. Muestras de RNA de Hut 78 (arriba) y Raji (abajo). C: Controles. HV: Tratamiento con Hidralazina y Valproato.

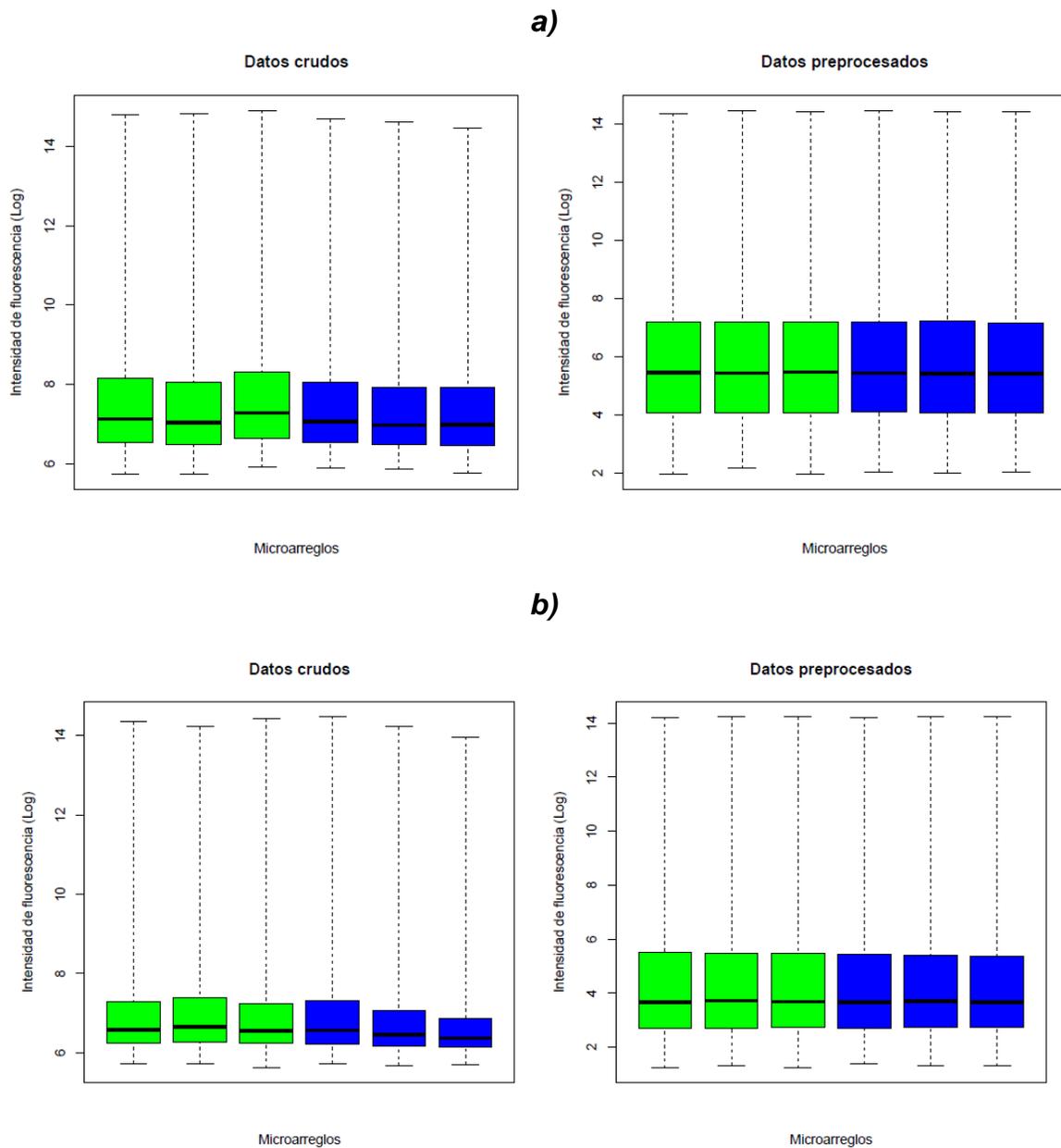


Figura 35. Pre-procesamiento de los datos crudos de los microarreglos de expresión. **a)** Hut 78. **b)** Raji.

Tabla 8. Genes compartidos que se sobre-expresados y regularon a la baja entre la línea celular Hut 78 y Raji.

Genes sobre-expresados	Genes regulados a la baja
SLAMF7, TPMT, MIR21; VMP1, CAMSAP2, WIPI1, SYT11, JUN, ABHD4, CLEC7A, ABCA5, ADAMTS6, MAML2, ZSWIM6, CD69, PPP4R4, TANC2, DPYD, ARID5B, LAMC1, SLC9A9, FMNL2, RGS9, LINC00936, PAIP2B, BBS9, CTTNBP2NL, ARRDC3, LOC105371220, PLEKHH2, LIMA1, SGCB, NPC2; MIR4709, ATP8B2, DOCK4, RALGAPA2, ILDR2, DYNC2H1, LOC154761, SRGN, RRAGD, FMO4, BCL2A1, CLEC2B, TSPAN33, FAM102B, GRAMD1C, EXOC6B, ST3GAL5, INPP4B, SRGAP2; SRGAP2B; SRGAP2D, CEP126, CPEB4, RGS1, NEO1, KLF6, FIG4, DZIP3, NABP1, ADGRL1, SLC30A4, REPS2, LINC01268, PAPSS1, YPEL5, MYO1D, SAMD9L, ATXN1, RPS6KC1, GLIPR1, IL18RAP, MBNL2, SLC12A6, IFI6, LYST, IFI44, OAS1, SLAMF6, NCF2, PMAIP1, LMBRD2, TMEM154, HIVEP3, HIP1, SLC46A3, ATP1B1, DNAJC1, ERO1B, NRN1, ARHGAP18, PGM2L1, NFE2L3	AVEN, SLC5A6, RPS25, GEMIN4, FAM136A, USE1, LOC100506458, GTF3C6, ACACA

Tabla 9. Lista de genes regulados a la baja para la línea celular Raji.

ID	Fold Change	Valor de p	Símbolo del gen
16739636	-2.95	5.14E-06	SNHG1
16803197	-2.87	7.62E-06	NEIL1
16808915	-2.83	1.73E-05	CEP152
16969648	-2.67	0.0009	LOC105377359
16745148	-2.58	5.29E-05	RPS25
17000518	-2.51	0.0003	HSPA9
17047086	-2.5	0.0002	MIR590
17086947	-2.44	0.001	FAM120A
17118281	-2.28	0.0003	LOC100506458
16982635	-2.27	3.39E-06	TRIP13
16750429	-2.26	0.0014	MIR4698
17049330	-2.21	1.19E-05	MEPCE
16663514	-2.19	7.76E-06	CDC20
16952585	-2.18	0.0003	LOC101928323
16696533	-2.17	5.25E-05	SNORD75
16997676	-2.15	0.0005	MTRNR2L2
16996969	-2.12	0.0014	GUSBP3
17010273	-2.1	0.0002	KCNQ5-IT1
17085602	-2.1	5.79E-05	PGM5
16746142	-2.1	8.17E-05	PRDM10
16752453	-2.1	0.0004	PA2G4
17118285	-2.1	0.0009	LOC100128653
17050154	-2.07	2.89E-05	PRKAR2B
16910501	-2.05	0.0003	DTYMK
16830782	-2.01	0.0004	CYB5D1
16687418	-2	9.79E-06	NDC1
16822356	-1.99	3.43E-05	LUC7L
16684178	-1.99	3.06E-05	SNHG12
16834056	-1.97	1.72E-05	CDC6
17054273	-1.96	0.0004	PRKAR1B
17023062	-1.95	5.27E-05	LOC101927919
16673955	-1.95	3.02E-05	LOC730159
16925752	-1.95	0.0004	HMGN1
16898108	-1.95	0.0002	SNORA70B
16848961	-1.94	0.0003	TRIM65
17047176	-1.94	3.91E-05	GTF2I; GTF2IP1
16703452	-1.93	4.37E-05	PDSS1
17072093	-1.93	0.0001	LOC105375724
16974898	-1.92	0.0001	MIR573
17005865	-1.92	2.35E-05	HIST1H2BM
16887840	-1.91	0.0007	CDCA7
16773581	-1.91	0.0014	RNU6-82P
16702656	-1.9	4.76E-05	HSPA14
16936732	-1.9	0.0004	RABL2B
16882258	-1.89	1.39E-05	MAT2A
16661648	-1.89	1.41E-05	GMEB1
17013728	-1.88	3.31E-05	MTHFD1L
16932516	-1.86	0.0001	PI4KAP1
16984032	-1.86	7.82E-05	SKP2
17103413	-1.86	0.0005	SUV39H1
16691023	-1.85	6.73E-05	SLC16A1
16985599	-1.85	3.40E-05	CCNB1
16817017	-1.84	2.74E-05	PLK1
17025697	-1.84	3.43E-05	MIR3939
16743340	-1.83	5.70E-05	SNORD6; TAF1D; SNORA8
16824901	-1.82	0.0009	SLC7A5P2
17058372	-1.82	0.0005	STAG3L3; STAG3L1
16725910	-1.82	0.0003	UQC3
17117617	-1.82	0.0002	PCID2

16663294	-1.82	0.0002	PPIH
16989636	-1.81	0.0003	KIF20A
16755750	-1.8	3.01E-05	UTP20
16798919	-1.8	2.79E-05	ARHGAP11A
16946366	-1.8	0.0004	ZBTB38
16926087	-1.8	7.27E-05	WDR4
17104001	-1.79	0.0011	GNL3L
16988703	-1.79	9.09E-05	LMNB1
16838887	-1.79	0.0002	SLC25A10
16780236	-1.78	0.0004	TGDS
16841768	-1.78	8.64E-05	CENPV
16832835	-1.78	0.0006	SUZ12P1
17054254	-1.78	0.0004	PRKAR1B
16810933	-1.78	0.0006	TIPIN
17097895	-1.77	0.0005	PSMD5
16681611	-1.77	0.0004	SRM
17011683	-1.76	0.0004	GTF3C6
17075804	-1.76	0.0002	NUGGC
17085545	-1.76	0.0002	LOC102724580; LOC101929583; LOC105379443; LOC101928195; LOC100133920
16708728	-1.76	0.0002	SFXN2
16724607	-1.76	9.73E-05	NDUFS3
16827474	-1.76	0.001	CTRL
16846993	-1.76	4.47E-05	SRSF1
16940590	-1.75	0.0003	ARIH2
16663155	-1.75	9.02E-05	CTPS1
16833689	-1.74	0.001	CISD3
16971484	-1.74	0.0011	LOC100505685
16800209	-1.73	6.13E-05	TUBGCP4
16733920	-1.73	7.55E-05	RNH1
16946393	-1.73	0.0007	RASA2
16847839	-1.73	0.0002	MIR5047; DDX5
17064679	-1.73	5.81E-05	XRCC2
17102755	-1.73	0.0001	DDX3X
16772234	-1.72	0.0009	THRIL
16962866	-1.72	0.0007	DPPA2P3
16811061	-1.72	0.0002	CALML4
16845727	-1.72	0.0002	CCDC43
16702685	-1.72	0.0003	SUV39H2
17016366	-1.72	0.001	HIST1H2AB
16664078	-1.72	0.0004	TOE1
16691883	-1.71	0.0004	FAM72D; FAM72C
16743342	-1.71	8.94E-05	TAF1D; SNORA8
16914315	-1.71	0.0001	UBE2C
16829085	-1.71	0.0003	SLC7A5
16707695	-1.71	0.0003	HELLS
16763021	-1.71	0.001	YARS2
16858714	-1.71	0.0009	RNASEH2A
16774303	-1.71	0.0007	RGCC
16891176	-1.7	0.0005	ANKZF1
16755498	-1.7	0.0001	TMPO
16820584	-1.7	6.48E-05	NIP7
16774082	-1.69	0.0002	EXOSC8
16740997	-1.69	0.0005	PTPRCAP; CORO1B
16716239	-1.69	0.0001	GLUD1
16866153	-1.69	0.0006	ZNF587; ZNF586
16668880	-1.69	0.0006	SLC16A1-AS1
16839582	-1.69	0.0005	TSR1
17003682	-1.69	8.74E-05	HNRNPH1
16731169	-1.68	0.0001	DLAT

16683268	-1.68	0.0011	LINCO1355
16890970	-1.68	8.59E-05	BCS1L
16798801	-1.67	6.14E-05	ARHGAP11B
16684406	-1.67	0.0004	SNRNP40
16846661	-1.67	0.0002	MRPL27
16934059	-1.67	0.0003	PATZ1
16913681	-1.67	0.0002	FAM83D
16934786	-1.67	0.0014	MFNG
16820537	-1.67	8.66E-05	UTP4
16935473	-1.67	0.0001	DESI1
16908557	-1.67	0.0004	NHEJ1
16760437	-1.66	0.0011	NOP2
16858122	-1.66	0.001	MRPL4
16706117	-1.66	0.0001	FUT11
16771894	-1.66	0.0004	MPHOSPH9
16875760	-1.66	0.0001	TMEM238
16985614	-1.66	0.0002	CENPH
16802204	-1.66	0.0004	ZWILCH
16989817	-1.65	0.0007	MATR3; SNHG4
17068782	-1.65	0.0007	MCM4
16662648	-1.65	8.45E-05	CDCA8
16995925	-1.65	0.0002	C5orf28
16962493	-1.65	0.0011	RFC4
16910825	-1.65	0.0002	NOP56; SNORD86; MIR1292
16862333	-1.65	0.0002	SNRPA
17105047	-1.65	0.0003	PGK1
16793225	-1.65	0.0002	DLGAP5
17054923	-1.64	0.0001	PMS2
17102041	-1.64	0.0002	SMS
16718922	-1.64	0.0001	PRDX3
16827679	-1.64	0.0006	NQO1
16696490	-1.64	0.001	CENPL
16849982	-1.63	9.93E-05	ALYREF
16770309	-1.63	0.0002	NAA25
16830914	-1.63	0.0002	PFAS
16935517	-1.63	0.0003	CENPM
16807605	-1.63	0.0006	OIP5
17018130	-1.63	0.0004	VPS52
16851344	-1.63	0.0003	SNRPD1
16660199	-1.63	0.0005	MRTO4
16802106	-1.63	0.0002	HACD3
16816897	-1.63	0.0002	NPIPBA; NPIPB5
16882658	-1.63	0.0006	RPIA
16714998	-1.63	0.0001	DNA2
16973879	-1.63	0.0002	LYAR
16739054	-1.62	0.0006	CPSF7
16845528	-1.62	0.0002	LSM12
16661589	-1.62	0.0002	RCC1; SNHG3
17005888	-1.62	0.001	ZNF165
16934568	-1.62	0.0008	FOXRED2
16882975	-1.62	0.0006	NCAPH
16914671	-1.62	0.0003	CSE1L
16810559	-1.62	0.0011	KIAA0101
16923289	-1.62	0.0014	PKNOX1
16987125	-1.62	0.0001	POLR3G
16851121	-1.61	0.0002	SEH1L
17090357	-1.61	0.0009	EXOSC2
16908373	-1.61	0.001	USP37
16672006	-1.61	0.001	PMF1; PMF1-BGLAP; BGLAP
16689581	-1.61	0.0008	GLMN
17000294	-1.61	0.0009	HNRNPA0

16738119	-1.61	0.001	MTCH2
17016624	-1.61	0.0007	TRIM27
17058582	-1.61	0.0006	ABHD11
16889602	-1.6	0.0002	NOP58
16823512	-1.6	0.0004	TFAP4
17106895	-1.6	0.0007	UTP14A
16932735	-1.6	0.0006	GGT2
17010246	-1.6	0.0007	KCNQ5
16977461	-1.6	0.0014	THAP9-AS1; SEC31A
16837729	-1.6	0.0004	NUP85
17021385	-1.6	0.0002	SYNCRIP
16798812	-1.6	0.0009	ARHGAP11B
16772625	-1.6	0.0007	POLE; CHFR
16979515	-1.6	0.0001	CCNA2
16783644	-1.6	0.001	PNN
16810104	-1.6	0.0003	ICE2
16962584	-1.6	0.0005	BCL6
16945254	-1.59	0.0002	ACAD9
16925194	-1.59	0.0002	GART
16741113	-1.59	0.0003	NUDT8
17049573	-1.59	0.0003	SRRT
16811151	-1.59	0.0006	ANP32A-IT1
16831285	-1.58	0.0007	COX10
16813900	-1.58	0.0002	SNRPA1
16799517	-1.58	0.0006	KNSTRN
16877888	-1.58	0.0001	EPT1
16760082	-1.58	0.0011	CRACR2A
16974096	-1.58	0.0005	GRPEL1
17016457	-1.58	0.0003	HIST1H2BK
17011671	-1.58	0.0006	AMD1
16692892	-1.58	0.0006	CERS2
16935623	-1.58	0.0003	RRP7A
16683271	-1.58	0.0003	HNRNPR
17081124	-1.58	0.0002	FAM49B
16747665	-1.58	0.0005	EMG1
17057579	-1.58	0.0002	HUS1; PKD1L1
16756627	-1.58	0.0003	UNG
16897519	-1.57	0.0016	GPR75-ASB3; ASB3; GPR75
16743222	-1.57	0.0009	CHORDC1
16826708	-1.57	0.0002	NUDT21
16806823	-1.57	0.0005	AVEN
17004388	-1.57	0.0003	PRPF4B
16713352	-1.57	0.0005	ZNF25
17117684	-1.57	0.0001	NPIPB11
16766260	-1.57	0.0005	ATP5B
16833292	-1.57	0.001	LIG3
16993919	-1.57	0.0003	TERT
16983172	-1.57	0.0002	CCT5
16658664	-1.57	0.0004	SLC25A33
17089898	-1.57	0.0002	NUP188
16972616	-1.57	0.0007	NEIL3
16843187	-1.57	0.0005	UTP6
17043355	-1.57	0.0006	AIMP2
16734069	-1.57	0.0002	PDDC1
16967031	-1.57	0.0004	PAICS
16953237	-1.57	0.0004	LOC100133032
16842673	-1.57	0.0002	SPAG5
16756111	-1.56	0.0008	TDG
16708533	-1.56	0.0004	PPRC1
16993268	-1.56	0.0002	HNRNPAB
16930418	-1.56	0.0013	ADSL
16825427	-1.56	0.0006	RABEP2

16688386	-1.56	0.0003	DEPDC1
17063448	-1.56	0.0011	KLRG2
16684222	-1.56	0.0005	SRSF4; MECR
17046573	-1.56	0.0005	CCT6P1
16756834	-1.56	0.0007	TCHP
16705725	-1.55	0.0016	PALD1
16702503	-1.55	0.0008	CDC123
16849321	-1.55	0.0002	SRSF2
16909700	-1.55	0.0008	HJURP
16893773	-1.55	0.0006	TMEM18
16808876	-1.55	0.0006	CEP152
16974873	-1.55	0.0005	DHX15
16781187	-1.55	0.001	PCID2
16670499	-1.55	0.0004	PRPF3
16866166	-1.55	0.0004	ZNF587B
16840902	-1.55	0.0006	AURKB
16917504	-1.55	0.0007	SNX5; OVOL2
17080595	-1.55	0.0004	DSCC1
16927052	-1.55	0.0006	CDC45
16802519	-1.55	0.0004	KIF23
16804902	-1.55	0.0005	BLM
16872567	-1.55	0.0007	EXOSC5
16939668	-1.54	0.0005	NKTR
17079971	-1.54	0.0002	SLC25A32
16844031	-1.54	0.0014	RPL23; SNORA21
17095830	-1.54	0.0002	NOL8
17088881	-1.54	0.0015	GPR21; RABGAP1
16830360	-1.54	0.0005	EIF5A
16722799	-1.54	0.0005	PRMT3
16687188	-1.54	0.0005	ORC1
16723507	-1.54	0.0003	NAT10
16898776	-1.54	0.0005	FAM136A
16859437	-1.54	0.0006	USE1
16719088	-1.54	0.0003	NSMCE4A
17046254	-1.54	0.0006	CCT6A
16832024	-1.54	0.0004	GRAPL
16685383	-1.54	0.0004	GNL2
16693642	-1.54	0.0004	JTB
16714240	-1.54	0.0012	TIMM23B; AGAP4
17047321	-1.54	0.0006	WBSCR16
16860508	-1.54	0.0008	DPY19L3
16987298	-1.54	0.001	SLF1
17090085	-1.53	0.0005	NTMT1
16995140	-1.53	0.0007	RAD1
16856567	-1.53	0.0005	DAZAP1
16758879	-1.53	0.0005	BRI3BP; THRIL
16842103	-1.53	0.0005	SHMT1
16758650	-1.53	0.0006	GTF2H3
16783983	-1.53	0.0008	ATP5S
17101053	-1.53	0.0002	LOC102723840; LOC102724521
16925689	-1.53	0.0003	BRWD1
16824143	-1.53	0.0003	RRN3
16990631	-1.53	0.0002	TCERG1
16843728	-1.53	0.0004	ACACA
16830146	-1.53	0.0006	MIS12
16995705	-1.53	0.001	RPL37; SNORD72
16913689	-1.53	0.0003	DHX35
16995809	-1.53	0.0011	OXCT1
16843376	-1.53	0.0006	NLE1
17012699	-1.53	0.0006	RPS12; SNORA33
17099083	-1.53	0.0013	TOR1A
16837205	-1.53	0.0002	NOL11

16872039	-1.53	0.0011	ECH1
16824865	-1.52	0.0003	NPIP5; NPIP4
17108546	-1.52	0.0006	BRCC3
16718903	-1.52	0.0003	SFXN4
17077244	-1.52	0.0015	LYPLA1
16939402	-1.52	0.0005	RPSA
17086353	-1.52	0.0003	RMI1
16992637	-1.52	0.0003	SFXN1
16673278	-1.52	0.0009	UCK2; MIR3658
17062853	-1.52	0.0005	TMEM209
16901830	-1.52	0.0004	ANAPC1
16806692	-1.52	0.0012	ULK4P1; ULK4P2; ULK4P3; CHRFA7A
16863282	-1.52	0.0009	CD3EAP
16758624	-1.52	0.0013	DDX55
17044193	-1.51	0.0005	LOC101927841
17002078	-1.51	0.0011	GEMIN5
17099947	-1.51	0.0007	SDCCAG3
16833545	-1.51	0.0008	TADA2A
16914704	-1.51	0.0004	DDX27
16819217	-1.51	0.0008	MT1E
16696504	-1.51	0.0008	GASS; SNORA103
16791086	-1.51	0.0012	IPO4
16839254	-1.51	0.0006	GEMIN4
17112686	-1.51	0.001	TRMT2B
16823413	-1.51	0.0004	TRAP1
16674273	-1.51	0.0007	C1orf220; TEX35
16692724	-1.51	0.0005	ANP32E
16863946	-1.51	0.0006	RUVBL2
16989369	-1.51	0.0007	C5orf24; DDX46
16758107	-1.51	0.0004	RNF34
16839531	-1.51	0.0004	SMYD4
16822208	-1.51	0.0002	AFG3L1P
17058617	-1.51	0.0004	RFC2
16869172	-1.51	0.0005	ZNF490; ZNF564
16963519	-1.51	0.0012	BDH1
16875710	-1.51	0.0016	HSPBP1
16979389	-1.51	0.0005	MAD2L1
17024746	-1.5	0.0014	ZBTB2
16818600	-1.5	0.0005	ORC6
16713708	-1.5	0.0011	BMS1P5
17011694	-1.5	0.0006	RPF2
16965559	-1.5	0.0003	ANAPC4
17000465	-1.5	0.0007	ETF1
17010316	-1.5	0.0006	MTO1
17108500	-1.5	0.0005	DKC1
16699877	-1.5	0.0004	LBR
17061238	-1.5	0.0007	DNAJC2
16840145	-1.5	0.0005	SLC25A11
16913957	-1.5	0.0003	MYBL2
16820927	-1.5	0.0013	DHODH
16664118	-1.5	0.0004	NASP
16947235	-1.5	0.0009	GMPS
16927198	-1.49	0.0004	RANBP1
17115428	-1.49	0.0007	IRAK1
16937505	-1.49	0.0004	FANCD2
16836156	-1.49	0.0009	UTP18
16950999	-1.49	0.0016	CHCHD4
16820508	-1.49	0.0008	TANGO6
16837754	-1.49	0.0005	MRPS7
16821239	-1.49	0.0003	CENPN
17048923	-1.49	0.0013	CPSF4
16865737	-1.48	0.0004	U2AF2

16970863	-1.48	0.0015	NAA15
16947556	-1.48	0.0005	SMC4
16870828	-1.48	0.0007	ZNF43
16753800	-1.48	0.0009	NUP107
16681082	-1.48	0.001	ICMT
16957951	-1.48	0.0011	POLQ
16949467	-1.48	0.0014	LPP
16786133	-1.48	0.0004	RBM25
16716846	-1.48	0.0007	ALDH18A1
16790267	-1.48	0.0009	SUPT16H
16941661	-1.48	0.0007	GNL3; SNORD136
17005248	-1.48	0.0013	E2F3
16836072	-1.48	0.0013	LUC7L3
16906962	-1.48	0.0006	HSPD1
16925674	-1.48	0.0005	PSMG1
16973797	-1.48	0.0007	NOP14
16838359	-1.48	0.0008	BIRC5
16803436	-1.48	0.0008	IDH3A
17098848	-1.48	0.0008	TRUB2
16674767	-1.48	0.0004	DHX9
16673154	-1.47	0.0006	NUF2
16680935	-1.47	0.0006	C1orf174
16890915	-1.47	0.0015	RQCD1
16955048	-1.47	0.0011	RFT1
17092020	-1.47	0.0011	PUM3
16770828	-1.47	0.0009	FBXO21
16978334	-1.47	0.0008	H2AFZ
16745525	-1.47	0.0005	HSPA8
16862604	-1.47	0.0009	CD79A
16680348	-1.47	0.0007	SSU72
16692636	-1.47	0.0016	HIST2H2AB
16951756	-1.47	0.0005	SLC4A7
16774381	-1.46	0.0008	LOC105370177
16962359	-1.46	0.0007	TRA2B
16903090	-1.46	0.0006	MCM6
16727538	-1.46	0.0013	RBM14; RBM4; RBM14-RBM4
16825465	-1.46	0.0006	BOLA2; SMG1P2
16869841	-1.46	0.001	AKAP8
17007996	-1.46	0.0015	SRSF3
17060412	-1.46	0.0006	MCM7
16769403	-1.46	0.001	C12orf73
16664243	-1.46	0.0004	RAD54L
16688308	-1.46	0.0008	SERBP1
16770040	-1.46	0.0006	ANAPC7
16885526	-1.46	0.0008	IMP4
16869324	-1.46	0.0014	PRDX2
16894424	-1.46	0.0008	NOL10
16799426	-1.46	0.0015	PAK6; BUB1B
16670383	-1.46	0.0009	HIST2H2AA4; HIST2H2AA3
16825794	-1.45	0.0016	DCTPP1
16994244	-1.45	0.001	FASTKD3
16781516	-1.45	0.0008	APEX1
16713786	-1.45	0.0009	BMS1P6; AGAP9
17087716	-1.45	0.0007	SMC2
16935069	-1.45	0.0013	DMC1
16736422	-1.45	0.0016	SAAL1
16983907	-1.45	0.0009	BRIX1
16664281	-1.45	0.0016	NSUN4
17024362	-1.45	0.0008	ADAT2
17076773	-1.45	0.0011	SLC20A2
16681625	-1.44	0.0007	EXOSC10

16808345	-1.44	0.0009	ELL3
16674089	-1.44	0.0015	CACYBP
16895673	-1.44	0.0009	SLC5A6
16935490	-1.44	0.0016	SNU13
16668603	-1.44	0.0007	CEPT1
16685544	-1.44	0.0008	SF3A3
16954055	-1.44	0.0012	RHOA
16996645	-1.44	0.0009	DIMT1
16888674	-1.44	0.0014	WDR75
16845742	-1.44	0.0011	EFTUD2
16923397	-1.44	0.0012	RRP1
16705474	-1.44	0.001	DDX21
16776188	-1.43	0.0006	TPP2
16991261	-1.43	0.0007	G3BP1
16978142	-1.43	0.0012	EIF4E
16993243	-1.43	0.0011	RMND5B
16817973	-1.43	0.0008	TMEM265; SRCAP
16889375	-1.43	0.0012	NIF3L1
16911525	-1.43	0.0006	NDUFAF5
16759604	-1.43	0.0007	PGAM5
16915364	-1.43	0.0014	NELFCD
16698504	-1.43	0.0014	ELK4
16886503	-1.43	0.0014	RIF1
16860667	-1.43	0.0005	KCTD15
16904780	-1.42	0.0012	SPC25
16786941	-1.42	0.0011	AHSA1
16816833	-1.42	0.0015	POLR3E
16811832	-1.42	0.0009	SNUPN
16834370	-1.42	0.0014	MLX
16701287	-1.42	0.001	ADSS
16759202	-1.42	0.0011	RAN
16993397	-1.42	0.0013	CANX

16923347	-1.42	0.0008	RRP1B
16826985	-1.42	0.0008	GOT2
17067102	-1.42	0.0013	CDCA2
16820787	-1.42	0.0009	SF3B3
16860709	-1.42	0.0009	GPI
16909491	-1.42	0.0011	NCL
16829486	-1.42	0.0009	FAM57A
17055013	-1.42	0.0008	DAGLB; KDELR2
16936900	-1.42	0.0013	TRNT1
16837270	-1.41	0.0014	KPNA2
16765513	-1.41	0.001	CBX5
17108290	-1.41	0.001	EMD
16693173	-1.41	0.0011	MRPL9
17003336	-1.41	0.0009	DDX41
16959187	-1.41	0.0016	MRPL3
16766035	-1.41	0.0007	CNPY2
17115394	-1.41	0.0013	HCFC1
16704844	-1.41	0.0009	TIMM23B; AGAP6; TIMM23
16926148	-1.41	0.0009	U2AF1; U2AF1L5
16726790	-1.41	0.0012	POLA2
16841483	-1.4	0.0009	ELAC2
16688753	-1.4	0.0014	FUBP1
16814779	-1.4	0.0011	HN1L
17111688	-1.4	0.0011	LAS1L
17109706	-1.4	0.0013	EIF1AX
16776905	-1.4	0.0015	TFDP1
16929203	-1.4	0.0009	DRG1
16898175	-1.4	0.001	CCT4

Tabla 10. Lista de genes sobre-expresados para la línea celular Raji.

ID	Fold Change	Valor de p	Símbolo del gen
16977052	8.25	1.77E-09	CXCL10
16981219	7.37	7.20E-09	DDX60
16684080	6.8	1.33E-08	IFI6
16797498	6.48	5.68E-07	IGHV1-24; IGHG1; IGHG3
16761201	6.09	2.78E-06	CD69
17059776	5.8	3.04E-08	SAMD9L
16707196	5.06	1.66E-07	IFIT1
16666509	4.83	2.72E-07	IFI44
17069506	4.59	4.59E-07	DNAJC5B
16755826	4.52	2.22E-06	SPIC
16894710	4.35	4.55E-07	FAM49A
16906534	4.21	5.01E-08	STAT1
16909081	4.2	1.98E-07	DOCK10
16802102	4.15	1.01E-05	RNU5B-1
16812344	4.09	1.77E-07	BCL2A1
16707184	4.08	0.0001	IFIT3
17115782	3.97	3.59E-05	CLIC2
16797516	3.94	9.85E-06	IGHV3-33
16924498	3.88	1.89E-05	LINC00158
16773470	3.87	4.10E-06	USP12-AS2
17092710	3.81	7.15E-05	SCARNA8
16833426	3.79	1.22E-05	CCL4L2; CCL4L1
16977045	3.79	3.50E-06	CXCL9
16787814	3.77	5.15E-05	IFI27
16694886	3.76	6.58E-05	FCRL5
16833433	3.73	1.58E-06	CCL4L1

16960084	3.7	3.32E-06	SLC9A9
16859034	3.63	1.86E-06	CLEC17A
16836624	3.53	2.52E-06	MIR21; VMP1
16707180	3.48	1.57E-07	IFIT2
16797504	3.46	2.58E-05	IGHG1; IGHV4-28
16665967	3.43	1.28E-06	LOC105378785
16852886	3.42	1.85E-06	SERPINB10
17079317	3.38	1.64E-07	TP53INP1
16666485	3.37	6.24E-06	IFI44L
16737314	3.37	2.09E-07	LOC105376626
17069521	3.24	4.06E-06	TRIM55
17047459	3.18	0.0002	SNORA14A
16843602	3.18	3.20E-05	CCL3L3; CCL3L1
16797508	3.16	9.47E-06	IGHM; IGHV3-30; IGHV3-33
16694960	3.16	1.96E-07	FCRL2
16865782	3.16	3.43E-05	RFPL4AL1
16913572	3.08	5.14E-05	SNORA60
16900148	3.08	4.38E-06	IGKV2-24
17097955	3.02	3.53E-06	C5
16757324	3.01	3.77E-07	OAS1
16882750	3.01	1.61E-05	IGKV2D-24
16679349	2.97	7.89E-06	KMO
16679769	2.97	3.23E-07	OR2L1P
16673748	2.94	1.54E-05	FMO4
16931864	2.93	0.0006	POTEG; POTEG
16667702	2.92	2.40E-06	VCAM1
16720085	2.92	2.15E-05	IFITM1; IFITM2

17009615	2.9	0.0002	LOC730101
16968521	2.9	5.69E-06	MIR4451
16817692	2.9	8.81E-05	MVP
16968583	2.89	1.97E-06	AFF1
16694928	2.89	4.04E-07	FCRL3
16675301	2.88	4.24E-06	RGS1
16857136	2.87	9.99E-06	EBI3
16709927	2.87	0.0003	LOC105378515
17070242	2.86	2.18E-05	LOC105375913
17063480	2.85	2.87E-05	PARP12
16687875	2.84	8.08E-06	JUN
17117888	2.78	6.19E-07	ZEB2
17104049	2.77	5.49E-05	SNORA11; MAGED2
16943490	2.77	0.0001	LOC152225
16920475	2.75	2.94E-05	BCAS1
16806870	2.74	5.42E-06	SLC12A6
17051376	2.74	1.40E-05	TSPAN33
16722299	2.73	8.81E-06	PDE3B
16730972	2.72	7.44E-05	LOC105369484
17063977	2.72	9.77E-05	LOC154761
16886174	2.71	2.95E-06	KYNU
16909413	2.71	1.19E-06	SP110
16797447	2.71	0.0001	IGHM; IGHV4-31
16944344	2.71	0.0002	ARHGAP31
16897967	2.7	3.04E-06	LINC01185
16738694	2.7	2.32E-06	MPEG1
16780592	2.69	7.62E-07	GPR183
17012598	2.69	1.33E-06	ENPP3
16844381	2.69	1.61E-06	CCR7
16878662	2.67	9.10E-07	YPEL5
16748477	2.66	3.09E-05	CDKN1B
16819478	2.65	6.49E-06	CCL22
16678951	2.64	0.0001	LOC105373211
16852896	2.64	1.09E-05	HMSD
16711280	2.63	1.77E-05	KLF6
16830202	2.63	6.65E-07	XAF1
16682487	2.63	1.58E-06	IFFO2
16925023	2.62	0.0001	SNORA80A
16926942	2.62	0.0003	USP18
16984287	2.62	3.43E-06	PTGER4
16843511	2.61	1.29E-06	CCL5
16882740	2.61	9.74E-06	IGKV2D-28; IGKV2-28
16661497	2.59	4.87E-06	THEMIS2
17024168	2.59	0.0007	LOC100507406
16730471	2.59	1.27E-06	CEP126
16657594	2.58	2.29E-05	ISG15
16833327	2.58	2.02E-05	SLFN5
17105082	2.58	4.42E-05	GPR174
16837426	2.56	2.63E-05	SSTR2
16947715	2.55	0.0002	SERPINI1
16900156	2.54	1.67E-05	IGKV1-5; IGKV2D-28; IGKV2-28; IGKC
16874922	2.53	9.06E-06	SIGLEC14
16797512	2.53	1.22E-05	IGHV4-31
17023484	2.53	4.08E-05	ARHGAP18
16671874	2.53	1.65E-05	SYT11
16705507	2.51	9.43E-07	SRGN
16944120	2.51	1.66E-05	GRAMD1C
16761269	2.51	2.48E-05	CLEC7A
17021596	2.5	2.68E-05	RRAGD
16798228	2.49	8.82E-05	SNORD116-26
16867975	2.49	1.32E-06	FCER2
17004154	2.49	1.17E-06	DUSP22

17087308	2.48	2.22E-06	TDRD7
16980160	2.48	1.49E-05	INPP4B
16747336	2.47	0.0006	SCARNA10
16998059	2.47	9.45E-05	ARRDC3
16927702	2.47	0.0004	IGLV6-57; IGLL5
17011809	2.47	0.0001	LOC105377950
16922959	2.46	2.14E-05	MX2
16889636	2.46	5.72E-06	BMPR2
16798152	2.44	9.17E-05	SNORD116-8
16691718	2.43	8.36E-05	LOC105378943
16887052	2.43	2.82E-06	LOC101929633
16819207	2.4	2.81E-06	MT2A
16798144	2.4	8.72E-05	SNORD116-3; SNORD116-9
16798154	2.4	8.72E-05	SNORD116-3; SNORD116-9
16771417	2.39	4.35E-06	OASL
16798138	2.39	0.0002	SNORD116-2
16672654	2.39	6.67E-06	SLAMF7
16703311	2.38	3.75E-05	GPR158
16798216	2.38	5.86E-05	SNORD116-24
16921498	2.38	0.0003	POTED; POTE83
17022838	2.37	1.63E-05	LOC101927686
16798148	2.37	0.0002	SNORD116-6
16761212	2.37	3.21E-05	CLEC2B
16968237	2.36	6.55E-06	LINC01094
16892523	2.35	7.67E-05	SCARNA6
16705199	2.35	0.0002	ARID5B
16756310	2.34	2.50E-05	TCP11L2
17059771	2.34	5.57E-06	SAMD9
16765404	2.33	2.70E-05	CALCOCO1
16883624	2.33	1.34E-05	IL1R2
16798236	2.32	0.0002	SNORD116-29
17093090	2.31	6.33E-05	DDX58
16709128	2.31	2.68E-05	DUSP5
16730591	2.31	5.41E-06	DYNC2H1
16961037	2.3	0.0004	SCARNA7
16797520	2.3	6.66E-05	IGHV4-34; IGHM
16898903	2.3	1.23E-05	PAIP2B
17097941	2.29	2.10E-06	TRAF1
16690139	2.28	7.19E-06	EXTL2
16949572	2.28	4.75E-05	CLDN16
17051943	2.28	4.12E-05	TMEM140
16743432	2.27	1.08E-05	SESN3
16900144	2.27	0.0004	IGKV6-21
16852905	2.27	7.15E-05	SERPIN8; HMSD
16879540	2.26	9.36E-06	DYNC2L1
16698697	2.26	7.92E-06	FCMR
16949625	2.26	3.80E-06	CCDC50
16852619	2.25	2.34E-05	LOC102724745
16843627	2.25	1.39E-05	CCL3L1; CCL3L3
16973296	2.24	5.38E-05	ZNF732
16977058	2.24	1.63E-05	CXCL11
17106067	2.24	1.73E-05	VSIG1
16694913	2.23	0.0003	FCRL4
16921827	2.23	4.25E-06	MIR155HG; MIR155
16848079	2.23	2.93E-05	WIPI1
16725210	2.23	6.68E-06	MS4A7; MS4A14
16888979	2.23	4.92E-06	NABP1
16976192	2.22	1.22E-05	SPINK2
16900162	2.22	2.52E-05	IGKV2-30; IGKC
16669278	2.21	2.08E-05	FAM46C
16855673	2.21	1.18E-05	BCL2

17058826	2.21	1.66E-05	HIP1
16808696	2.21	2.06E-05	SLC30A4
16704320	2.21	2.59E-05	RASSF4
16991151	2.21	1.62E-05	SYNPO
16962620	2.2	1.36E-05	LPP-AS2
16725227	2.2	0.0013	MS4A14
16760944	2.19	2.91E-05	AICDA
16961616	2.19	3.18E-05	TNFSF10
16843578	2.19	6.34E-05	CCL3
16874339	2.19	0.0001	RRAS
16675323	2.19	7.93E-06	RGS2
16836868	2.17	0.0002	TANC2
16778559	2.17	4.66E-06	EPSTI1
17001324	2.17	0.0001	JAKMIP2
17022849	2.16	0.0003	LINC01268
16985033	2.16	0.0002	GAPT
17061129	2.15	1.81E-05	RASA4B; RASA4
16996684	2.15	2.54E-05	ADAMTS6
16904365	2.15	4.18E-06	IFIH1
17070273	2.14	0.0002	ZBTB10
17024265	2.14	3.86E-05	TXLNB
16970140	2.14	0.0006	USP53
16949537	2.13	7.53E-06	TP63
16873007	2.13	7.71E-06	ETHE1
16771801	2.13	7.26E-06	HCAR3
16730976	2.13	0.0001	ZC3H12C
16777944	2.12	1.51E-05	N4BP2L1
16803114	2.12	0.0001	SCAMP5
16790360	2.11	0.0013	SNORD9
17107896	2.11	5.48E-06	CSAG3; CSAG2
17115039	2.11	5.48E-06	CSAG3; CSAG2
16825638	2.11	5.90E-06	YPCL3
16892521	2.11	5.73E-05	SCARNA5
16927706	2.11	0.0002	IGLV11-55
16716365	2.11	7.58E-06	FAS-AS1
17066961	2.11	1.93E-05	ADAMDEC1
16900116	2.11	0.001	IGKV1-9
16691969	2.1	0.0008	LOC105371220
16739746	2.1	1.93E-05	HRASLS2
16668772	2.1	7.52E-05	CTTNBP2NL
16957795	2.1	1.20E-05	CD80
17005001	2.09	4.30E-06	CD83
17103185	2.09	0.0011	TIMP1
16965291	2.09	6.15E-05	LOC105374503
17025230	2.09	5.42E-06	TAGAP
16815925	2.09	1.20E-05	SNX29
17015324	2.08	1.34E-05	NRN1
16734524	2.08	0.0014	SNORA54
17050591	2.08	7.20E-06	MET
17013283	2.08	6.80E-06	UTRN
17050578	2.08	2.82E-05	CAV1
16966008	2.08	9.85E-05	KLF3
16681288	2.08	3.77E-05	TNFRSF9
16798190	2.07	7.80E-05	SNORD116-15
16743517	2.07	2.29E-05	MAML2
16806624	2.07	4.39E-05	LOC283710
16813303	2.07	0.0009	LOC105370968
16755433	2.07	0.0001	NEDD1
17004518	2.06	9.14E-06	LY86
16768468	2.06	6.30E-05	LOC101930023
17094656	2.06	0.0007	LOC105379251
16903356	2.06	8.59E-06	ZEB2
16674742	2.05	3.37E-05	NPL

16889563	2.05	0.0005	FZD7
17101828	2.05	2.30E-05	REPS2
16854602	2.04	1.40E-05	KLHL14
16726081	2.04	8.98E-05	RARRES3
16672669	2.04	0.0003	LY9
16754966	2.03	0.0002	LINC00936
16924192	2.03	0.0002	LIPI
16697095	2.03	3.74E-05	NCF2
16882723	2.03	0.0005	IGKV1-37; IGKV1D-37
16715793	2.02	2.84E-05	KCNMA1
16723422	2.02	4.25E-05	KIAA1549L
17067675	2.02	0.0003	LOC101929492
16832350	2.02	0.0002	KSR1
16900160	2.02	0.0006	IGKV2-29
16665588	2.02	7.61E-05	ROR1
16917689	2.02	4.21E-05	RALGAPA2
16878583	2.02	0.001	SNORD92
16890094	2.02	1.91E-05	LOC102724714
16735214	2.01	4.05E-05	GVINP1
17011771	2.01	0.0001	FAM229B
16872276	2.01	0.0015	FCGBP
16958124	2.01	8.05E-06	PARP9
16835386	2.01	2.90E-05	SNX11
16721280	2.01	1.84E-05	TRIM22; OR52N4
16874249	2.01	0.0004	SLC6A16
16992557	2	8.63E-05	CPEB4
16717520	2	0.0007	SNORA12
17020317	2	1.02E-05	DST
17083357	2	0.0012	CD274
16690566	2	3.39E-05	SORT1
16777854	1.99	0.0002	LINC01058
16698466	1.99	0.0003	NUAK2
16721916	1.99	0.0007	AMPD3
16695960	1.99	0.0005	ILDR2
16872181	1.99	0.0012	IFNL3
16965162	1.99	4.35E-05	CPEB2
16686438	1.98	0.0002	TESK2
16798198	1.98	3.76E-05	SNORD116-19; SNORD116-17
16798202	1.98	3.76E-05	SNORD116-19; SNORD116-17; SNRPN; IPW
17084363	1.98	0.0001	ANXA2P2
16871444	1.98	6.88E-05	IGFLR1
16757373	1.98	1.23E-05	OAS2
17101392	1.98	6.59E-05	WWC3
16767306	1.97	0.0001	LOC100507195
16980716	1.97	0.0009	TMEM154
16992467	1.97	0.0002	CREBRF
16798146	1.97	0.0011	SNORD116-5; SNORD116-7
16798150	1.97	0.0011	SNORD116-5; SNORD116-7
16971308	1.97	8.46E-05	ARHGAP10
16739911	1.96	5.87E-05	NRXN2
16818842	1.96	4.25E-05	CYLD
16797599	1.96	0.0011	IGHV3-72
16868689	1.96	2.55E-05	TYK2
16891922	1.95	4.37E-05	SP100
17061117	1.94	1.55E-05	RASA4B; RASA4
17061125	1.94	0.0001	RASA4B; RASA4
16903537	1.94	6.68E-05	NMI
17019683	1.94	3.49E-05	LOC102725160

16798164	1.93	0.0001	SNORD116-14
17086287	1.93	0.0002	LOC105376107
16924521	1.93	0.001	LINC00515
17013279	1.93	0.0004	STX11
17092809	1.92	0.0004	IFNB1
16791991	1.92	1.53E-05	NFKBIA
16754373	1.92	8.40E-05	GLIPR1
17106005	1.92	0.0007	FRMPD3
17023658	1.92	0.0004	MOXD1
17074673	1.92	0.0003	CTSB
17013554	1.92	3.78E-05	UST
16824352	1.91	6.89E-05	XYLT1
16779001	1.91	0.0001	LINC00441
17079517	1.91	0.0008	LOC105375666
17114017	1.91	7.58E-05	ZDHHC9
16995301	1.9	0.0001	RANBP3L
17111656	1.9	0.0002	MTMR8
16808940	1.9	2.10E-05	SECISBP2L
16882555	1.9	0.0007	IGKV3OR2-268
17112498	1.89	0.0003	POF1B
16725065	1.89	6.63E-05	DTX4
16987606	1.89	0.0001	LOC105379676
16704960	1.89	0.0002	SGMS1-AS1
16889411	1.89	1.22E-05	CFLAR
16674618	1.89	1.33E-05	IER5
16811638	1.89	2.82E-05	SEMA7A
16798206	1.89	0.0004	SNORD116-20; SNORD116@
16695422	1.89	2.40E-05	SLAMF1
16963389	1.89	0.0006	CEP19
17070061	1.88	3.91E-05	LY96
16891843	1.88	0.0003	SP140
16929741	1.88	0.0002	CYTH4
16777963	1.88	2.23E-05	N4BP2L1
16774679	1.88	7.91E-05	ITM2B
16975918	1.88	0.0001	SGCB
16852683	1.88	3.38E-05	PMAIP1
16797494	1.87	0.0004	ZCWPW2; IGHV3-23
16898548	1.87	0.0003	FBXO48
16977309	1.87	0.0004	RASGEF1B
16838581	1.87	1.82E-05	RNF213
17078893	1.87	2.39E-05	LOC101929709
16697196	1.86	3.12E-05	FAM129A
16789869	1.86	5.10E-05	POTEM; POTE
16673763	1.86	6.21E-05	TOP1P1; FMO4
16809263	1.86	0.0001	DMXL2
17022362	1.86	0.0005	SESN1
16699533	1.86	1.67E-05	DUSP10
16874097	1.86	6.14E-05	HSD17B14
16855340	1.86	0.0001	SNORA37
16969267	1.86	2.45E-05	BANK1
16887097	1.85	0.0001	CSRNP3
16836292	1.85	0.0009	ANKFN1
16761631	1.85	0.0001	DUSP16
16669796	1.85	3.52E-05	TXNIP
16828108	1.85	4.42E-05	SNORD71
17078452	1.85	0.0002	HEY1
17105076	1.85	0.0006	P2RY10
17118177	1.85	0.0004	ARMC2
16782132	1.84	0.0009	ABHD4
16694980	1.84	3.63E-05	FCRL1
16658102	1.84	0.0016	LOC100996583
16900875	1.84	7.49E-05	MGAT4A

16984010	1.84	8.48E-05	IL7R
17083370	1.84	2.87E-05	PDCD1LG2
16737260	1.83	0.0001	ABTB2
17061119	1.83	0.001	RASA4B; RASA4
16801835	1.83	4.47E-05	LACTB
17011593	1.83	2.30E-05	FIG4
17104021	1.83	0.0005	MAGED2
16677361	1.83	2.48E-05	RPS6KC1
16797574	1.83	0.0012	IGHV4-59
17043294	1.83	0.0002	FSCN1
16794705	1.82	2.02E-05	NPC2; MIR4709
17012711	1.82	0.0016	SNORA33
16711501	1.82	0.0007	IL2RA
16991654	1.82	0.0006	LOC101927740
17045542	1.82	4.43E-05	STK17A
16817177	1.81	0.0003	LOC554206
16731754	1.81	0.0001	IL10RA
16661149	1.81	2.36E-05	CD52
16951409	1.81	9.09E-05	SATB1
17110127	1.81	0.0009	LOC105373175
16857467	1.81	2.34E-05	TRIP10
16845671	1.81	5.35E-05	FAM171A2
16826779	1.8	0.0015	DOK4
16659338	1.8	0.0002	SNORA59B; SNORA59A
16832131	1.8	0.0002	SNORA59B; SNORA59A
16958972	1.8	0.0009	SNORA7B
16945682	1.8	8.12E-05	ACPP
17012946	1.8	4.21E-05	TNFAIP3
16702428	1.8	0.0002	LOC105376412
17012632	1.79	0.0002	ENPP1
17043095	1.79	5.47E-05	SDK1
16721652	1.79	0.0004	OR10AB1P
16753710	1.79	0.0004	HELB
16870200	1.79	4.41E-05	BST2
16677082	1.79	0.0005	HHAT
17097869	1.79	0.0001	MEGF9
16736764	1.79	0.0002	MUC15
16886564	1.79	0.0002	FMNL2
16891555	1.79	0.0002	SGPP2
16880122	1.79	7.32E-05	SPTBN1
17023799	1.78	0.0016	SLC2A12
16708623	1.78	7.41E-05	NFKB2
16782122	1.78	9.16E-05	TRAV20; TRAJ17; TRDV2; TRAC
17011895	1.78	0.0008	NT5DC1
16775883	1.78	8.41E-05	MBNL2
16714618	1.78	5.14E-05	ANK3
16948572	1.78	0.0007	KLHL24
16665757	1.77	0.0006	PDE4B
16722720	1.77	0.0002	NAV2
17061127	1.77	3.66E-05	RASA4B; RASA4
16815914	1.77	3.90E-05	SNN
16850656	1.77	0.0002	DLGAP1-AS1
16671416	1.77	0.0003	ATP8B2
17012804	1.77	0.0012	MYB
16879500	1.77	0.0001	PLEKHH2
16685935	1.76	3.82E-05	HIVEP3
16949442	1.76	0.0007	RTP4
17086685	1.76	0.0007	UNQ6494
16887014	1.75	6.75E-05	GCA
16906872	1.75	0.0001	ANKRD44
16957636	1.75	4.26E-05	ZBTB20
17094224	1.74	0.0002	ZNF658B

16913263	1.74	0.0009	EPB41L1
16674998	1.74	0.0013	RNF2
16843162	1.74	0.0005	EVI2B
16686345	1.74	0.0005	HECTD3
16700806	1.74	0.0005	LYST
17083319	1.74	0.001	JAK2
16959925	1.74	0.0001	XRN1
16916289	1.73	0.0002	C2orf96
16917617	1.73	0.0005	LINC00652
16773596	1.73	0.0013	MTUS2
16716374	1.73	0.0002	LIPA
16900132	1.72	0.0009	IGKV1-16
16791393	1.72	0.0011	CBLN3
16777756	1.72	6.93E-05	SLC46A3
16983451	1.72	0.0007	BASP1
16769207	1.71	8.58E-05	CCDC53
16673525	1.71	8.32E-05	ATP1B1
16797587	1.71	0.0002	IGHA1; IGHV3-66
16944410	1.71	0.0001	PLA1A
16998411	1.71	0.0004	LIX1
16983611	1.71	0.0003	LINC01021
16732900	1.71	0.0011	LOC100507283
16762941	1.71	6.25E-05	DENND5B
16932906	1.71	0.0002	PRAMENP
17010929	1.71	0.0003	PNRC1
16796412	1.7	0.0006	LINC00341; SYNE3
16853498	1.7	0.0004	LPIN2
16747184	1.7	0.0002	CD9
16749939	1.7	0.0005	LRRK2
16796286	1.7	7.06E-05	SERPINA9
16863243	1.7	6.15E-05	MARK4
16819244	1.69	0.0005	MT1CP
16763182	1.69	0.0005	ABCD2
17043965	1.69	0.0014	LOC100506098
16942560	1.69	0.0003	ARL6IP5
16733995	1.69	0.0006	IRF7
17008226	1.69	0.0007	DNAH8
16856803	1.69	9.12E-05	GADD45B
16709201	1.69	0.0003	PDCD4; MIR4680
17050171	1.69	0.0005	HBP1
16774598	1.68	0.0005	LRRC63
16985094	1.68	0.0004	ZSWIM6
17015975	1.68	0.0014	TPMT
16886331	1.68	0.0005	MBD5
17009620	1.68	0.0006	TMEM14A
16790362	1.68	0.0004	SNORD8
16681542	1.68	0.0003	CASZ1
16763002	1.68	0.0008	LOC105369723
16914844	1.68	0.0005	PTPN1
16913315	1.68	8.68E-05	DLGAP4
17083144	1.68	0.0003	SMARCA2
16884441	1.67	0.0002	ZC3H6
17020620	1.67	0.0002	LMBRD1
16792659	1.67	9.08E-05	SOS2
16716525	1.67	0.0005	CPEB3
17025470	1.67	0.0004	PACRG-AS1
16860418	1.67	0.0002	CCNE1
16689969	1.67	0.0003	DPYD
16764564	1.67	0.0002	LIMA1
17050361	1.67	0.0002	ZNF277
16999776	1.67	9.21E-05	IRF1
17051796	1.67	0.0002	LOC105375513
16779667	1.66	0.0009	PCDH9

16667662	1.66	0.001	CDC14A
16897973	1.66	0.0002	PUS10
16697221	1.66	0.0001	TRMT1L
16999712	1.66	0.0007	P4HA2
17004138	1.66	0.0005	LOC105374869
17087535	1.66	0.0013	STX17
16869596	1.66	0.0014	ADGRL1
16971019	1.66	0.0005	GAB1
17059423	1.66	0.0004	LOC101927420
17106624	1.66	0.0004	RHOXF1-AS1
16744918	1.65	0.0004	TMPRSS13
17076810	1.65	0.0015	CHRNA6
16697422	1.65	0.0003	LOC105371664
17076170	1.65	0.0011	RNF122
16741914	1.65	0.0009	FAM168A
16735375	1.65	0.0007	STK33
16920454	1.65	0.0001	ZNF217
16696685	1.65	0.0008	SCARNA3
17056291	1.65	0.0001	SCRN1
16996298	1.65	6.80E-05	IL6ST
16880955	1.65	0.0012	APLF
16677278	1.64	0.0009	ATF3
16756995	1.64	0.0002	TCTN1
17013694	1.64	0.0002	PLEKHG1
16956983	1.64	0.0002	CBLB
16659881	1.64	0.0005	NECAP2
17014959	1.64	0.0015	LOC102723922
17112137	1.64	0.0007	NAP1L2
17095703	1.64	0.0011	NFIL3
16748196	1.64	0.0006	LOC374443
16789955	1.64	0.0008	RPPH1
17102963	1.64	0.0014	JADE3
17015606	1.64	0.0005	MAK
16944618	1.64	0.0005	CD86
17052902	1.64	0.0002	OR2A25
16977502	1.63	0.0002	PLAC8
16658802	1.63	0.0002	KIF1B
17005420	1.63	0.0005	LRRC16A
16762992	1.63	0.0001	LOC105369724
16682348	1.63	0.0004	ATP13A2
17110122	1.63	0.0004	MID1IP1-AS1
16700911	1.63	0.0001	ERO1B
16952118	1.62	0.0002	TRANK1
16731269	1.62	0.0006	LOC283140
16883733	1.62	0.001	IL18RAP
17103793	1.62	0.0012	CXorf67
16679808	1.62	0.0013	OR2T3
16682144	1.62	0.0005	ANO7P1
17109893	1.62	0.0007	CXorf21
17020118	1.61	0.0005	ICK
16877172	1.61	0.0007	GREB1
16971995	1.61	0.0007	RAPGEF2
16777794	1.61	0.0002	UBL3
16920047	1.61	0.001	PREX1
16981979	1.61	0.0012	IRF2
17068296	1.61	0.001	IDO1
16726680	1.61	0.0015	TM7SF2
16898545	1.6	0.0003	LOC101927723
17015102	1.6	0.0004	SERPINB9P1
16969414	1.6	0.0013	TET2
16820989	1.6	0.0004	LOC101927978
16904105	1.6	0.0001	LY75-CD302; CD302; LY75

16765657	1.6	0.0003	TESPA1
17015862	1.6	0.0007	ATXN1
16660685	1.6	0.001	TCEB3
16936947	1.6	0.0002	ITPR1
16709108	1.6	0.0002	MXI1
16807324	1.6	0.0005	BMF
16882744	1.6	0.0002	IGKV1D-27
16719217	1.6	0.0002	CHST15
16919962	1.59	0.0009	SULF2
16863753	1.59	0.0003	EMP3
16802795	1.59	0.0002	NEO1
17002194	1.59	0.0002	ADAM19
17045032	1.59	0.0011	BBS9
16943375	1.59	0.0002	TFG
16797591	1.59	0.0004	IGHV1-69; IGHV1-69-2; IGHM
16988576	1.59	0.0004	CSNK1G3
16725049	1.59	0.0006	FAM111A
16766093	1.59	0.0006	STAT2
16830302	1.58	0.0005	ACADVL
16708038	1.58	0.0003	PI4K2A
16764398	1.58	0.0003	FMNL3
16837101	1.58	0.0003	RGS9
17056211	1.58	0.0005	HIBADH
16730104	1.58	0.0005	SCARNA9
16834545	1.58	0.0011	IFI35
16898924	1.58	0.001	EXOC6B
16725112	1.58	0.0004	STX3; OR10Y1P
16735152	1.58	0.0007	TPP1
16946603	1.58	0.0015	CHST2
16957479	1.57	0.0008	CFAP44
16738544	1.57	0.0004	UBE2L6
16978793	1.57	0.0007	PAPSS1
16843241	1.57	0.0004	MYO1D
16904039	1.57	0.0007	BAZ2B
17069063	1.57	0.0002	LYN
16752061	1.57	0.0002	NCKAP1L
17096301	1.57	0.0011	LOC105376166
17070381	1.57	0.0015	LRRCC1
17019565	1.57	0.0011	NFKBIE
16813854	1.57	0.001	LOC101927751
16891491	1.57	0.0012	LOC105373887
16899764	1.57	0.0012	ST3GAL5
16763540	1.57	0.0003	SLC38A2
17114033	1.57	0.0009	LOC105373335
16682989	1.57	0.0002	ECE1
16703114	1.56	0.0007	COMMD3-BMI1; BMI1; COMMD3
16721479	1.56	0.0004	ILK
16811936	1.56	0.0002	SCAPER
16921289	1.56	0.0009	HELZ2
16842626	1.56	0.0012	UNC119
16659478	1.56	0.0002	PRDM2
16676643	1.56	0.0003	MAPKAPK2
16944665	1.56	0.0004	DTX3L
16731605	1.56	0.0005	SIDT2
17004491	1.56	0.0009	LYRM4-AS1
17014064	1.56	0.0004	ZDHHC14
16726293	1.56	0.0007	DNAJC4; NUDT22
16729336	1.55	0.0005	CAPN5
17061807	1.55	0.0003	PNPLA8
16972553	1.55	0.0014	WDR17
16759469	1.55	0.0002	SNORA49

16718567	1.55	0.0008	CCDC186; MIR2110
17058978	1.55	0.0006	GSAP
16884697	1.55	0.001	IGKV1OR2-108
17020044	1.54	0.0008	TRAM2
16712458	1.54	0.0016	DNAJC1
16661351	1.54	0.0007	WDTC1
16792079	1.54	0.0008	LOC105370452
17104186	1.54	0.001	LINC01420
16784008	1.54	0.0014	ATL1
16928428	1.54	0.0007	ADRBK2
16729064	1.53	0.001	SLCO2B1
16807763	1.53	0.0008	EHD4
16965286	1.53	0.0007	TAPT1-AS1
16901197	1.53	0.0003	SNORD89; RNF149
16774188	1.53	0.0013	COG6
17006087	1.53	0.0008	HLA-F
17025417	1.53	0.0015	AGPAT4
16738671	1.53	0.001	LOC283194
16939315	1.53	0.0003	TTC21A
16898617	1.53	0.0004	AAK1
16854360	1.53	0.0005	ZNF521
16838049	1.52	0.0009	UBALD2
17044414	1.52	0.0003	NFE2L3
17056649	1.52	0.0002	HERPUD2
16968098	1.52	0.0013	CXCL13
16941359	1.52	0.0007	LOC101929054
16947613	1.52	0.0006	PPM1L
16922243	1.52	0.0011	IL10RB
16830016	1.52	0.0003	KIF1C
16768438	1.51	0.0003	BTG1; LINC01619
16984945	1.51	0.0003	MAP3K1
16774690	1.51	0.0011	RB1
16698136	1.51	0.0009	CYB5R1
16775520	1.51	0.0003	CLN5
17011279	1.51	0.0003	PRDM1
16742963	1.51	0.0004	SYTL2
16867715	1.51	0.0003	SLC25A23; SLC25A41
16858137	1.51	0.0007	ICAM1
17087584	1.51	0.0007	LOC105376177
16933591	1.51	0.0015	AP1B1
17088916	1.5	0.0004	LHX2
16998162	1.5	0.001	MCTP1
17008092	1.5	0.0011	PIM1
16818755	1.5	0.0013	PAPD5
16971943	1.5	0.0012	ETFDH
17016697	1.5	0.0014	GABBR1
16701620	1.5	0.0008	OR2T10
17092490	1.5	0.0016	NFIB
16799357	1.5	0.0004	EIF2AK4
16678838	1.5	0.0011	NTPCR
17102129	1.5	0.0008	SAT1
16912455	1.49	0.0005	CCM2L
17101531	1.49	0.0011	TLR7
16696237	1.49	0.0007	SELL
17061881	1.49	0.0009	DOCK4
16742086	1.49	0.0009	PGM2L1
16793176	1.49	0.0008	GCH1
16995254	1.49	0.0007	LMBRD2
16827502	1.49	0.0014	SLC12A4
16812245	1.49	0.0008	CTSH
16950912	1.48	0.0014	IQSEC1
16936452	1.48	0.0006	PLXNB2
16964835	1.48	0.0008	AFAP1-AS1

16790431	1.48	0.0006	OR10G3
16857519	1.48	0.0012	ADGRE1
16695392	1.48	0.0009	SLAMF6
16898403	1.48	0.0016	SPRED2
17009583	1.48	0.0014	EFHC1
16675673	1.48	0.0007	CAMSAP2
17062049	1.48	0.0012	TFEC
17062000	1.48	0.0015	LINC00998
16770733	1.48	0.0008	MED13L
16886883	1.48	0.0007	TANK
16660785	1.48	0.001	NIPAL3
17070082	1.47	0.0007	GDAP1
16676562	1.47	0.0011	SRGAP2; SRGAP2B; SRGAP2D
16787831	1.47	0.0011	PPP4R4
16735669	1.47	0.0006	SBF2
16943681	1.47	0.0006	DZIP3
17005515	1.47	0.0013	TRIM38
16916261	1.47	0.0011	PCMTD2
16768857	1.47	0.0011	CDK17
16908998	1.47	0.0005	WDFY1
17006122	1.47	0.0011	HLA-G; HLA-H
16979590	1.47	0.001	NUDT6
16879968	1.46	0.0008	PPP1R21
16715241	1.46	0.0005	PSAP
16660212	1.46	0.0007	PQLC2
16835816	1.46	0.0005	ACSF2
16898389	1.46	0.0013	LOC105374778
16658184	1.46	0.0015	TPRG1L
16959412	1.46	0.0014	RYK
16852098	1.46	0.0004	PIK3C3
17010175	1.45	0.0004	OGFRL1
17010584	1.45	0.0011	BCKDHB
16970258	1.45	0.0016	KIAA1109
16794158	1.45	0.001	ZFP36L1

17085685	1.45	0.0005	TJP2
16823928	1.45	0.0007	LITAF
16848318	1.44	0.0012	ABCA5
16999808	1.44	0.0016	TH2LCRR
16851933	1.44	0.0011	GALNT1
17023922	1.44	0.0011	MIR3662
16735010	1.44	0.0016	PRKCDBP
16687028	1.44	0.0015	EPS15
16696295	1.44	0.0015	KIFAP3
16731084	1.43	0.0011	SIK2
16773759	1.43	0.0007	FRY
16943603	1.43	0.0008	BBX
16956027	1.43	0.0015	TMF1
16888803	1.42	0.0015	INPP1
16855127	1.42	0.0008	SMAD7
17084184	1.42	0.0016	ACO1
16948565	1.42	0.001	LINC00888
16841982	1.42	0.0013	TOM1L2
16873087	1.42	0.0013	KCNN4
16983286	1.42	0.0013	TRIO
16916920	1.42	0.0008	SLC23A2
16668002	1.42	0.0006	FAM102B
17056328	1.42	0.0013	NOD1
16842834	1.42	0.0008	FLOT2
16855469	1.42	0.0011	LINC-ROR
16969229	1.42	0.0009	DAPP1
16935703	1.41	0.0014	ARFGAP3; PACSIN2
16869291	1.41	0.0016	SNORD41
16707149	1.41	0.001	FAS
16674805	1.41	0.0012	LAMC1
16762489	1.41	0.001	ITPR2
16723673	1.41	0.0013	TRIM44
17012785	1.41	0.0014	LINC01010
16781573	1.41	0.0011	ANG; RNASE4
16691668	1.41	0.0009	NOTCH2

Tabla 11. Lista de genes regulados a la baja para la línea celular Hut 78.

ID	Fold Change	Valor de p	Símbolo del gen
16693976	-3.58	1.09E-07	MUC1
17111955	-2.95	8.72E-06	CXCR3
16874828	-2.53	5.91E-06	NKG7
16699643	-2.33	2.50E-06	SUSD4
16699634	-2.25	1.04E-05	TLR5
17100482	-2.22	3.01E-05	NSMF
16684192	-2.19	0.0008	SNORD99
16866489	-2.17	1.45E-06	PRSS57
16984783	-2.08	2.40E-05	GZMK
16923842	-2.07	3.48E-05	COL6A1
16796060	-2.03	6.15E-05	LGMN
16817537	-2	1.82E-05	LAT
16820486	-1.95	9.11E-06	CDH1
17016263	-1.94	9.64E-06	CMAHP
16851795	-1.89	0.0002	LOC646778
16682016	-1.82	1.64E-05	AGMAT
16658622	-1.81	2.33E-05	CA6
16858941	-1.8	1.76E-05	RLN3; IL27RA
16951150	-1.79	6.91E-05	SH3BP5
17076810	-1.77	1.33E-05	CHRNA6
16777805	-1.75	0.0006	LINC00365

16914745	-1.73	0.0004	SNORD12; ZFAS1
16922114	-1.73	5.98E-05	HUNK
16836446	-1.73	1.44E-05	BZRAP1-AS1
17049676	-1.73	0.0002	SERPINE1
16726778	-1.72	0.0002	SLC22A20
16856896	-1.72	8.85E-05	GNA15
16923890	-1.72	1.39E-05	COL6A2
16737105	-1.67	2.54E-05	WT1
16693482	-1.67	0.0002	S100A14
16806823	-1.66	0.0005	AVEN
16842659	-1.66	0.0001	ALDOC
17046181	-1.66	5.17E-05	LANCL2
17014208	-1.66	6.53E-05	SYTL3
16841941	-1.64	3.62E-05	SREBF1
16956448	-1.64	8.06E-05	GBE1
17045258	-1.64	9.68E-05	GPR141; EPDR1
16670681	-1.63	0.0003	ANXA9
16866849	-1.63	0.0002	MKNK2
16830326	-1.62	0.0001	ELP5
16882332	-1.61	0.0005	GNLY
17019029	-1.61	0.0005	TREM2
17017018	-1.61	4.78E-05	IER3
16870776	-1.61	0.0002	ZNF826P

17073146	-1.6	0.0002	PTP4A3
16895673	-1.6	2.83E-05	SLC5A6
16919223	-1.59	0.0002	SNORA71B; SNHG17
16745148	-1.59	0.0002	RPS25
16747623	-1.58	0.0005	PTPN6
16922779	-1.58	0.0004	ETS2
16734883	-1.57	0.0005	OR51B4
17103560	-1.57	0.0007	PLP2
16931276	-1.57	0.0002	LOC105373069
16868130	-1.56	0.0004	CD320
16943401	-1.56	0.0007	FAM172BP
16812245	-1.55	0.0003	CTSH
17103509	-1.54	0.0004	PQBP1
16786255	-1.54	9.18E-05	ACOT2
16817883	-1.53	8.67E-05	ITGAL
16839254	-1.53	0.0001	GEMIN4
16714073	-1.53	0.0002	LRRC18
16830789	-1.53	0.0008	CHD3
16829570	-1.52	0.0005	SERPINF1
16823250	-1.52	0.0005	CLDN6
16819229	-1.52	0.0007	MT1JP
17064230	-1.51	0.0007	ACTR3C
16769924	-1.51	0.0003	MMAB
17058672	-1.5	0.0004	GTF2IRD2; GTF2IRD2B
16770124	-1.5	0.0003	HVCN1
16898776	-1.5	0.0004	FAM136A
17064235	-1.5	0.0006	ACTR3C
17100277	-1.49	0.0004	FUT7
16893992	-1.49	7.14E-05	AD11
16676217	-1.49	0.0003	LAX1
16725459	-1.49	0.0003	LOC105369324
16992807	-1.49	0.0008	MIR1271

16880087	-1.48	0.0004	ACYP2
16955456	-1.48	0.0004	DENND6A
16837061	-1.47	0.0008	SNORD104
16683852	-1.47	0.0003	ZNF683
16774235	-1.46	0.0003	SLC25A15; MIR621
16954567	-1.46	0.0003	CISH
16879863	-1.45	0.0002	EPCAM
16686611	-1.45	0.0002	LRRC41
17090917	-1.45	0.0003	RXRA
16802162	-1.45	0.0005	DIS3L
16859437	-1.44	0.0001	USE1
16841852	-1.44	0.0004	PLD6
16864393	-1.44	0.0006	ATF5; MIR4751
16672738	-1.44	0.0002	UFC1
16862646	-1.44	0.0006	ZNF574
16850107	-1.44	0.0008	FASN
16711866	-1.44	0.0004	SEPHS1
16863041	-1.43	0.0003	BCL3; MIR8085
17100326	-1.43	0.0006	MAN1B1-AS1
16737314	-1.43	0.0003	LOC105376626
17118281	-1.43	0.0004	LOC100506458
17011683	-1.42	0.0003	GTF3C6
16938712	-1.42	0.0008	CRTAP
16928046	-1.42	0.0008	SMARCB1
16708249	-1.41	0.0005	SCD
16741659	-1.41	0.0004	ANAPC15
16825897	-1.41	0.0003	BCL7C
16975751	-1.41	0.0004	TXK
16929677	-1.41	0.0003	CSF2RB
16843728	-1.41	0.0004	ACACA
16759592	-1.41	0.0006	PXMP2
16859314	-1.4	0.0007	KLF2

Tabla 12. Lista de genes sobre-expresados para la línea celular Hut 78.

ID	Fold Change	Valor de p	Símbolo del gen
16947053	7.16	1.40E-08	SUCNR1
16811684	5.13	1.12E-06	CYP1A1
16975226	4.35	4.07E-07	TLR6; TLR1
17022529	4.2	6.17E-07	WASF1
17023379	3.87	4.46E-06	SOGA3; KIAA0408
16998551	3.7	9.71E-07	SLCO4C1
16865341	3.37	9.89E-06	LAIR2
16840318	3.3	5.20E-05	NLRP1
16689352	3.3	5.82E-05	GBP2
16979917	2.97	9.81E-07	SLC7A11
16672654	2.92	3.40E-07	SLAMF7
16819161	2.88	2.64E-05	GNAO1
17063461	2.83	1.75E-07	HIPK2
17015975	2.74	3.74E-07	TPMT
17112426	2.73	5.70E-07	HMGNS
16950321	2.73	1.99E-06	BHLHE40-AS1
16761350	2.68	1.52E-05	KLRC3
16961501	2.64	2.97E-06	TNIK
16709553	2.62	3.79E-06	ATRNL1
16836624	2.59	2.48E-07	MIR21; VMP1
16675673	2.56	6.41E-07	CAMSAP2
17089371	2.52	1.49E-05	STXBP1
16688864	2.5	6.55E-06	TTL7
17094814	2.46	1.53E-06	TMEM2

16703659	2.38	2.41E-06	MAP3K8
16943763	2.38	0.0002	PVRL3
16848079	2.38	1.32E-06	WIPI1
16978976	2.34	2.73E-06	CFI
16674927	2.34	5.99E-06	RGL1
16858210	2.32	2.44E-06	SLC44A2
16987395	2.32	1.42E-06	RHOBTB3
16984689	2.32	0.0002	ITGA2
17015802	2.31	2.87E-06	LOC101928354
17011217	2.29	1.93E-06	GRIK2
16671874	2.28	3.36E-06	SYT11
16965268	2.28	2.61E-06	CD38
16687875	2.27	1.51E-05	JUN
16796202	2.27	5.24E-06	MIR4506
16821562	2.27	0.0002	KIAA0513
16673842	2.26	9.87E-07	DNM3
17013657	2.25	0.0001	ULBP1
16782132	2.24	4.17E-05	ABHD4
16761269	2.24	8.07E-05	CLEC7A
16968051	2.22	0.0001	SEP11
17010461	2.22	3.98E-06	MYO6
16835016	2.22	5.65E-06	MAPT
16947605	2.22	5.56E-05	MIR16-2
17023118	2.22	1.34E-05	FAM184A
16697370	2.22	1.65E-06	PTGS2
16878994	2.22	9.20E-05	RASGRP3

16698049	2.21	6.58E-06	KDM5B
16848318	2.21	6.95E-05	ABCA5
16996684	2.18	1.42E-05	ADAMTS6
16977251	2.17	9.43E-06	ANTXR2
17084838	2.17	8.15E-05	RECK
16872803	2.16	4.67E-06	CEACAM1
16667258	2.14	5.40E-06	FNBP1L
16743517	2.14	4.92E-06	MAML2
16905216	2.12	1.54E-05	GPR155
16905600	2.1	3.21E-05	TTN
16872452	2.09	2.15E-05	BLVRB
16675578	2.09	5.61E-06	PTPRC
16843987	2.09	3.17E-05	PCGF2
17043843	2.09	8.14E-06	TSPAN13
16709333	2.09	4.27E-05	TCF7L2
16675197	2.09	1.66E-05	PLA2G4A
16859117	2.08	3.22E-06	CYP4F22
16985094	2.08	7.80E-05	ZSWIM6
17096574	2.08	0.0001	STX17-AS1
17114829	2.07	2.23E-05	IDS
16886382	2.07	0.0008	KIF5C
17022139	2.05	0.0003	BVES
16761201	2.05	9.86E-06	CD69
16961172	2.05	3.84E-05	BCHE
17112855	2.05	0.0004	BEX5
17015799	2.04	0.0002	LOC105374942
16754111	2.03	0.0006	KCNMB4
16876764	2.02	0.0001	RSAD2
16780585	2.02	5.70E-05	GPR18
16787831	2.02	0.0001	PPP4R4
16986409	2.02	6.11E-06	F2R
16675278	2.02	3.07E-05	RGS18
16944524	2.01	0.0001	STXBPL5L
16777190	2	7.41E-06	GJB6
16998906	2	6.67E-05	MCC
16946485	2	0.0002	PLS1
17050350	1.98	1.36E-05	LRRN3
17113079	1.98	1.93E-05	MORC4
16836868	1.98	2.94E-05	TANC2
16986501	1.97	7.52E-06	PDE8B
16854408	1.97	1.58E-05	PCAT18
16785696	1.97	9.60E-06	ARG2
16689969	1.97	1.16E-05	DPYD
16705199	1.96	2.49E-05	ARID5B
17117110	1.96	6.78E-05	CD24
16744991	1.96	1.12E-05	MPZL3
16956688	1.95	0.0002	CPOX
16745002	1.95	1.51E-05	MPZL2
16690343	1.94	3.38E-05	VAV3
16863963	1.94	0.0001	CGB2
16748262	1.94	7.38E-05	CLEC12B
16831306	1.93	0.0001	HS3ST3B1
16674805	1.93	2.40E-05	LAMC1
16801305	1.92	0.0006	TEX9
17085901	1.92	6.02E-06	ANXA1
16788014	1.92	1.16E-05	C14orf132
16835174	1.92	0.0003	EFCAB13
17056849	1.92	0.0003	TRGV3; TRGC2
16764305	1.92	6.28E-05	TUBA1A
17021831	1.91	7.72E-05	GPR63
16960084	1.91	0.0005	SLC9A9
17012516	1.91	0.0002	L3MBTL3
17059756	1.9	4.02E-05	CDK6

16829618	1.9	3.06E-05	HIC1
16886564	1.89	1.97E-05	FMNL2
16769463	1.89	0.0004	SLC41A2
16857093	1.89	0.0003	CREB3L3
16744967	1.89	7.98E-06	AMICA1
16716341	1.89	5.00E-05	ANKRD22
16837101	1.89	2.33E-05	RGS9
16801122	1.89	3.34E-05	TMOD2
16660976	1.88	0.0001	SEPN1
17023150	1.88	1.25E-05	MAN1A1
16668919	1.88	1.54E-05	MAGI3
16779766	1.88	9.62E-06	KLF12
16845410	1.87	5.70E-06	ETV4
16754966	1.87	0.0004	LINC00936
16842128	1.87	0.0004	USP32P2
16898903	1.87	8.54E-06	PAIP2B
16946966	1.87	8.57E-05	MED12L
17069212	1.86	0.0002	SDCBP
16906571	1.86	0.0002	STAT4
17045032	1.86	9.48E-05	BBS9
16803533	1.86	4.51E-05	HYKK
17055354	1.86	0.0002	ETV1
16957433	1.85	4.75E-06	CD200R1
16668772	1.85	3.47E-05	CTTNBP2NL
16998059	1.85	2.06E-05	ARRDC3
16970435	1.84	0.0001	SPRY1
16689354	1.84	0.0001	GBP2
16755542	1.83	6.77E-06	APAF1
16737669	1.83	1.39E-05	PHF21A
17014091	1.83	3.66E-05	SNX9
16869684	1.83	0.0006	ADGRE2
16798246	1.82	2.27E-05	SNRPN; IPW
16714880	1.82	0.0003	DNAJC12
16955324	1.81	0.0003	IL17RD
16975506	1.81	6.31E-05	ATP8A1
16691969	1.81	5.66E-05	LOC105371220
16817044	1.81	0.0002	PRKCB
17062973	1.8	0.0002	MKLN1-AS
16879500	1.8	0.0002	PLEKHH2
16755173	1.79	0.0002	PLXNC1
17000618	1.79	0.0001	DNAJC18
16798224	1.78	6.70E-05	SNRPN; IPW
16837292	1.78	0.0001	LOC105371870
16764564	1.78	1.36E-05	LIMA1
17074795	1.77	0.0003	LOC729732
16872640	1.77	1.14E-05	RABAC1
16897719	1.76	0.0002	CCDC88A
16975918	1.76	2.48E-05	SGCB
16862704	1.76	7.20E-05	TMEM145
17056072	1.76	2.15E-05	SKAP2
16987381	1.75	0.0002	RFESD
16990483	1.75	0.0003	ARHGAP26
16999421	1.75	0.0006	MARCH3
17088760	1.75	0.0003	PTGS1
17081401	1.74	0.0004	NDRG1
17070229	1.74	1.27E-05	ZC2HC1A
16794705	1.74	1.34E-05	NPC2; MIR4709
16909551	1.74	0.0002	NPPC
			LOC440867; LOC105369166; LOC100996770; LOC101927533
16880774	1.74	0.0004	
16966514	1.73	0.0005	ATP10D

16903931	1.73	4.82E-05	CYTIP
16669389	1.73	5.64E-05	PHGDH
17011378	1.73	2.41E-05	SOBP
16671416	1.73	9.44E-05	ATP8B2
16831313	1.73	0.0004	MGC12916
17061881	1.73	0.0001	DOCK4
16855810	1.73	0.0001	CD226
16917689	1.72	3.82E-05	RALGAPA2
16808793	1.72	1.15E-05	FBN1
16929855	1.72	0.0008	LGALS1
16904278	1.72	1.15E-05	DPP4
16799231	1.72	1.44E-05	SPRED1
16798238	1.72	0.0002	SNRPN; IPW
17020103	1.72	3.37E-05	GSTA4
16695960	1.72	4.81E-05	ILDR2
16700074	1.72	0.0003	CDC42BPA
16730591	1.71	0.0004	DYNC2H1
16685359	1.71	0.0005	LINC01137
17063977	1.71	0.0007	LOC154761
16970699	1.71	0.0001	C4orf33
17063311	1.71	2.46E-05	CREB3L2
16798067	1.71	0.0003	PWAR5; SNORD108
16675539	1.7	4.43E-05	LHX9
16666545	1.7	6.75E-05	ADGRL2
16675627	1.7	2.88E-05	LINC01221
16917004	1.7	0.0002	GPCPD1
16748248	1.7	0.0001	CLEC12A
16894848	1.7	3.78E-05	WDR35
16705507	1.7	7.91E-05	SRGN
17021596	1.7	0.0005	RRAGD
16949505	1.7	0.0002	TPRG1
16673748	1.69	0.0003	FMO4
16996078	1.69	0.0005	LOC105378963
16798220	1.68	5.19E-05	SNRPN; IPW
16683445	1.68	3.96E-05	FUCA1
16753426	1.68	9.25E-05	SRGAP1
16812344	1.68	0.0001	BCL2A1
16761370	1.68	0.0006	KLRC1
16868361	1.68	0.0004	ZNF699
16809610	1.68	0.0007	DYX1C1; CCPG1; DYX1C1-CCPG1
17060061	1.67	6.46E-05	ASNS
17015106	1.67	0.0002	SERPINB9
16778355	1.67	0.0003	LHFP
16798210	1.67	5.02E-05	SNRPN; IPW
16761212	1.67	9.41E-05	CLEC2B
16943090	1.67	5.53E-05	ARL6; EPHA6
16813590	1.67	0.0003	LOC100130976
16854016	1.67	6.57E-05	SPIRE1
17051376	1.67	3.26E-05	TSPAN33
17087191	1.67	7.39E-05	HABP4
16878676	1.66	0.0006	LBH
16875101	1.66	0.0005	ZNF468
16668002	1.66	0.0005	FAM102B
16798218	1.66	3.55E-05	SNRPN; IPW
17095020	1.66	6.02E-05	NMRK1
16956199	1.66	1.92E-05	EIF4E3
17074474	1.66	4.41E-05	MFHAS1
16866686	1.66	0.0003	ADAMTSL5
16835672	1.66	0.0001	ITGA3
16819252	1.66	0.0001	MT1F
16798083	1.65	0.0006	SNORD109B; SNORD109A

16798440	1.65	0.0006	SNORD109B; SNORD109A
17048563	1.65	0.0003	PEG10
16697660	1.65	0.0004	MIR181B1
16944120	1.65	0.0002	GRAMD1C
16798240	1.65	5.49E-05	SNRPN; IPW
17060531	1.64	4.93E-05	GATS
17088652	1.64	0.0003	GSN
16798192	1.64	0.0003	SNRPN; IPW
16898924	1.64	0.0002	EXOC6B
16802605	1.64	0.0006	LRRC49
16899764	1.64	2.00E-05	ST3GALS5
16980160	1.64	6.73E-05	INPP4B
16739752	1.64	0.0001	PLA2G16
16785938	1.64	0.0001	TTC9
16676562	1.64	0.0003	SRGAP2; SRGAP2B; SRGAP2D
16942167	1.63	0.0002	ABHD6
16798232	1.63	5.68E-05	SNRPN; IPW
16798244	1.63	2.56E-05	SNRPN; IPW
16798250	1.63	2.08E-05	SNRPN; IPW
16730471	1.63	0.0001	CEP126
16783215	1.63	0.0004	ARHGAP5
16724633	1.63	3.31E-05	PTPRJ
16952469	1.63	6.51E-05	ULK4
16880176	1.62	0.0001	EML6
16952874	1.62	6.54E-05	CCR1
17015794	1.62	7.76E-05	LOC105374943
17013174	1.62	0.0001	AIG1
16992557	1.62	0.0004	CPEB4
17066921	1.62	0.0004	ADAM28
17071298	1.62	2.74E-05	OSR2
16806692	1.62	0.0001	ULK4P1; ULK4P2; ULK4P3; CHRIFAM7A
16904270	1.62	0.0002	MXRA7
16879250	1.61	0.0008	GALM
16675301	1.61	0.0001	RGS1
17101990	1.61	6.53E-05	CNKSR2
16878947	1.61	0.0002	LTBP1
17014714	1.61	0.0001	MLLT4
16802795	1.61	0.0002	NEO1
17083239	1.6	0.0008	RFX3-AS1
16802967	1.6	0.0001	CCDC33
17094893	1.6	0.0001	ALDH1A1
16798248	1.6	0.0001	SNRPN; IPW
17080045	1.6	0.0005	ZFPM2-AS1
16930226	1.6	0.0002	SYNGR1
16880669	1.6	6.03E-05	LGALS1
17080853	1.6	6.18E-05	TMEM65
16888270	1.6	5.11E-05	ITGA4
16798234	1.6	9.25E-05	SNRPN; IPW
16698618	1.6	0.0001	SRGAP2
16967286	1.59	8.50E-05	STAP1
16956714	1.59	0.0002	DCBLD2
17012313	1.59	6.00E-05	NCOA7
16924268	1.59	6.54E-05	NRIP1
16711280	1.59	3.36E-05	KLF6
16763195	1.59	9.60E-05	SLC2A13
16761193	1.59	0.0006	CLECL1
17011593	1.59	9.89E-05	FIG4
16799492	1.59	0.0001	INAFM2
16695447	1.59	0.0007	CD244
16969817	1.59	0.0006	C4orf32

16968314	1.59	0.0005	PRDM8
16668861	1.59	7.64E-05	FAM19A3
16989750	1.58	0.0002	CTNNA1
16750837	1.58	9.69E-05	KCNH3
16894148	1.58	6.31E-05	LOC101929452
16943681	1.58	8.21E-05	DZIP3
17083249	1.58	0.0001	RFX3-AS1
16692846	1.58	0.0007	CTSK
16960963	1.58	0.0003	IFT80
16696138	1.58	0.0006	NME7
16888979	1.58	0.0001	NABP1
16978113	1.58	8.94E-05	TSPAN5
16798214	1.57	6.49E-05	SNRPN; IPW
16914952	1.57	0.0001	LOC105372674
16869596	1.57	6.57E-05	ADGRL1
16924878	1.57	0.0001	TIAM1
16987673	1.57	0.0003	PAM
16996771	1.57	0.0001	SGTB
16688594	1.57	0.0003	CRYZ
17023810	1.57	0.0002	SGK1
16731132	1.57	0.0003	DIXDC1
16808696	1.57	0.0003	SLC30A4
16871359	1.56	6.58E-05	DMKN
16674973	1.56	0.0002	C1orf21
16804294	1.56	0.0003	PDE8A
16833921	1.56	0.0004	GSDMA
17022916	1.56	9.41E-05	FRK
16942511	1.56	5.80E-05	KBTBD8
16701238	1.56	0.0005	AKT3
16707791	1.56	0.0004	ENTPD1
16979256	1.56	0.0001	SEC24D
16852789	1.55	0.0001	PHLPP1
17110365	1.55	0.0004	MIR221
16873332	1.55	9.72E-05	RTN2
17050154	1.55	0.0001	PRKAR2B
17047652	1.55	5.37E-05	PTPN12
16888912	1.55	0.0002	MYO1B
17078999	1.55	0.0008	C8orf88
17101828	1.54	0.0006	REPS2
16930212	1.54	0.0002	APOBEC3H
17105018	1.54	0.0005	ATP7A
16884304	1.54	0.0005	ACOXL
16862284	1.54	0.0006	LTBP4
17022849	1.54	0.0001	LINC01268
16809687	1.54	0.0006	NEDD4
16888349	1.54	0.0003	PPP1R1C
16889694	1.54	0.0002	NBEAL1
16690388	1.54	0.0002	SLC25A24
16836333	1.54	0.0004	SCPEP1
17085951	1.54	0.0007	RORB
16978793	1.54	0.0002	PAPSS1
16748565	1.54	0.0005	FAM234B
17080450	1.53	0.0008	EXT1
16996119	1.53	0.0002	ARL15
16878662	1.53	0.0004	YPEL5
17005113	1.53	0.0004	STMND1
17025018	1.53	0.0003	IPCEF1; CNKSR3
16947875	1.53	0.0002	PRKCI
16784207	1.53	0.0001	PTGER2
17101876	1.53	0.0006	SCML1
16813565	1.53	0.0002	NR2F2-AS1
16755878	1.53	0.0005	CHPT1
17096091	1.52	0.0002	PTCH1

16913985	1.52	0.0005	TOX2
16905963	1.52	8.84E-05	CCDC141
16951357	1.52	0.0002	TBC1D5
16712168	1.52	0.0004	CUBN
16851900	1.52	0.0002	MAPRE2
17088957	1.52	6.49E-05	LOC100129034
16775898	1.52	0.0003	RAP2A
16843241	1.52	0.0001	MYO1D
17059776	1.51	7.57E-05	SAMD9L
16776525	1.51	0.0001	LOC105370363
17015862	1.51	0.0006	ATXN1
16809027	1.51	0.0001	ATP8B4
16995678	1.51	0.0003	TTC33
17071412	1.51	0.0003	SPAG1
16974968	1.51	0.0002	SEL1L3
17115868	1.51	0.0006	IL3RA
16703407	1.51	0.0002	APBB1IP
16942648	1.51	0.0002	GXYLT2
16969911	1.51	0.0008	ANK2
16989977	1.51	0.0001	CYSTM1
17048102	1.51	0.0006	CFAP69
16864661	1.5	0.0008	SIGLEC17P
16798196	1.5	0.0003	SNRPN; IPW
16931957	1.5	0.0003	CECR1
16874198	1.5	0.0002	CGB8
16677361	1.5	0.0004	RPS6KC1
16973975	1.5	0.0002	CRMP1
16896620	1.49	0.0002	HNRNPLL
17055978	1.49	0.0001	C7orf31
17008007	1.49	0.0004	CDKN1A
16839177	1.49	0.0003	METRNL
17023414	1.49	0.0002	PTPRK
16907257	1.49	0.0002	TRAK2
16676633	1.49	0.0002	DYRK3
17016105	1.49	0.0005	LOC105374974
16666616	1.49	0.0001	PRKACB
16673874	1.49	0.0006	DNM3-IT1
16832194	1.49	0.0004	CCDC144CP
16908822	1.49	0.0001	CHPF
16754373	1.49	0.0001	GLIPR1
16746343	1.48	0.0008	IGSF9B
16883733	1.48	0.0003	IL18RAP
16775883	1.48	0.0003	MBNL2
16968246	1.48	0.0001	BMP2K
16806870	1.48	0.0005	SLC12A6
17055216	1.48	0.0002	ICA1
16763032	1.48	0.0004	PKP2
16684080	1.48	9.10E-05	IFI6
16938647	1.48	0.0002	CMTM8
16700806	1.48	0.0008	LYST
16998134	1.47	0.0008	KIAA0825
16961475	1.47	0.0008	EIF5A2
16761326	1.47	9.79E-05	KLRC4-KLRK1; KLRK1; KLRC4
16924207	1.47	0.0003	HSPA13
16666509	1.47	0.0005	IFI44
16861945	1.47	0.0008	NCCRP1
17072653	1.47	0.0004	PCAT1
16757324	1.47	0.0003	OAS1
16695392	1.47	0.0003	SLAMF6
16697095	1.47	0.0004	NCF2
16781315	1.46	0.0003	RASA3
16852683	1.46	0.0004	PMAIP1

17106913	1.46	0.0004	BCORL1
16909464	1.46	0.0006	GPR55
16748361	1.46	0.0002	LOC101060038
16947974	1.46	0.0004	FNDC3B
16971443	1.46	0.0003	FAM160A1
16942991	1.46	0.0003	ARL13B
16829037	1.46	0.0003	ZCCHC14
17090063	1.46	0.0002	LINC00963
16995254	1.46	0.0002	LMBRD2
16947287	1.46	0.0002	TIPARP
16843167	1.46	0.0002	EVI2A
17052049	1.46	0.0001	LOC105375523
16879408	1.46	0.0003	EML4
16702547	1.45	0.0006	OPTN
16938562	1.45	0.0002	TGFBR2
17047504	1.45	0.0002	HSPB1
16674557	1.45	0.0006	XPR1
16669568	1.45	0.0007	SRGAP2; SRGAP2B
16689400	1.45	0.0002	GBP5
16874012	1.45	0.0004	CA11
16674025	1.45	0.0005	RABGAP1L
16684310	1.45	0.0002	LAPTM5
16972198	1.45	0.0003	TLL1
17106415	1.45	0.0008	WDR44
16980716	1.45	0.0006	TMEM154
16685935	1.44	0.0008	HIVEP3
16768297	1.44	0.0001	DUSP6
16777812	1.44	0.0007	KATNAL1
17021281	1.44	0.0006	CEP162
16793750	1.44	0.0002	SGPP1
16798755	1.44	0.0002	ULK4P1; ULK4P2
16965942	1.44	0.0003	TBC1D1
17009316	1.44	0.0003	ENPP4
17005169	1.44	0.0004	KDM1B
16906000	1.44	0.0007	SESTD1
16813820	1.44	0.0002	PRKXP1
16781591	1.44	0.0006	RNASE6
17054149	1.44	0.0001	WDR60

17043856	1.43	0.0001	AHR
16807195	1.43	0.0002	RASGRP1
17058826	1.43	0.0004	HIP1
16975419	1.43	0.0002	APBB2
17001100	1.43	0.0004	NR3C1
16777756	1.43	0.0002	SLC46A3
16673525	1.43	0.0006	ATP1B1
16873060	1.43	0.0005	PLAUR
16673544	1.43	0.0003	BLZF1
16737543	1.43	0.0007	TP53I11
16745870	1.42	0.0008	CDON
17118035	1.42	0.0003	CRMP1
16695437	1.42	0.0002	CD48
16704182	1.42	0.0004	CSGALNACT2
16671579	1.42	0.0005	ADAM15
17052864	1.42	0.0006	TCAF2
17004721	1.42	0.0003	GCNT2
16712458	1.42	0.0004	DNAJC1
16834302	1.42	0.0004	ATP6V0A1
16700911	1.42	0.0002	ERO1B
16775588	1.42	0.0005	SLAIN1
16767052	1.42	0.0005	GNS
16722445	1.42	0.0002	NCR3LG1
16697750	1.42	0.0005	KIF21B
17015324	1.41	0.0003	NRN1
16942958	1.41	0.0008	EPHA3
16877728	1.41	0.0002	NCOA1
17070665	1.41	0.0007	DECR1
17023484	1.41	0.0006	ARHGAP18
16727936	1.41	0.0005	NDUFV1
16742086	1.41	0.0004	PGM2L1
17044414	1.41	0.0007	NFE2L3
16795612	1.41	0.0007	EML5
16981364	1.41	0.0008	NEK1
16798050	1.4	0.0003	PWARSN; SNRPN
16743527	1.4	0.0003	CCDC82
16851604	1.4	0.0003	IMPACT

A continuación, se muestran los diagramas de algunas de las vías más importantes mencionadas en los resultados y discusión.

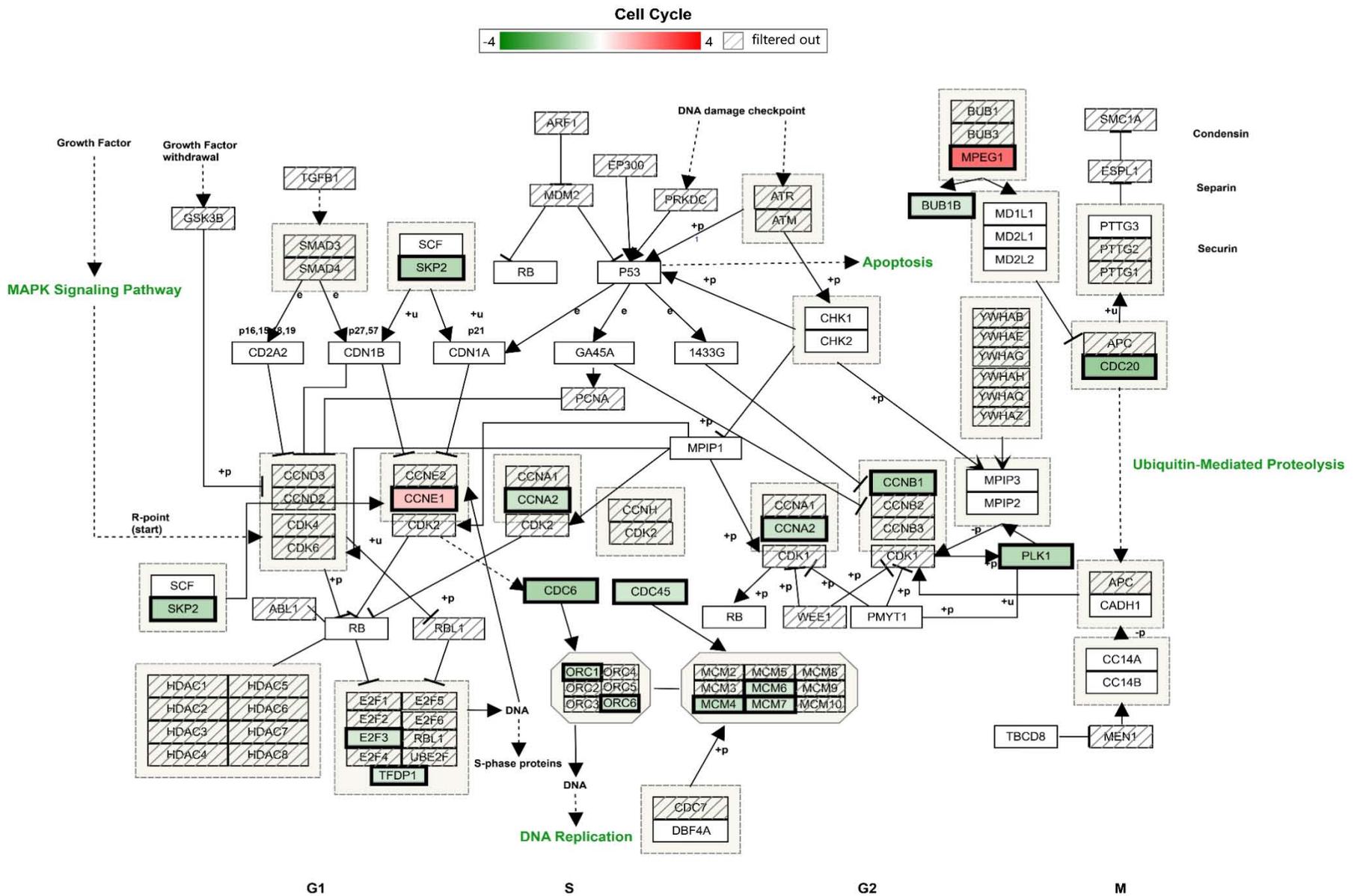


Figura 36. Cambios de expresión de genes involucrados en la vía de ciclo celular. Células Raji.

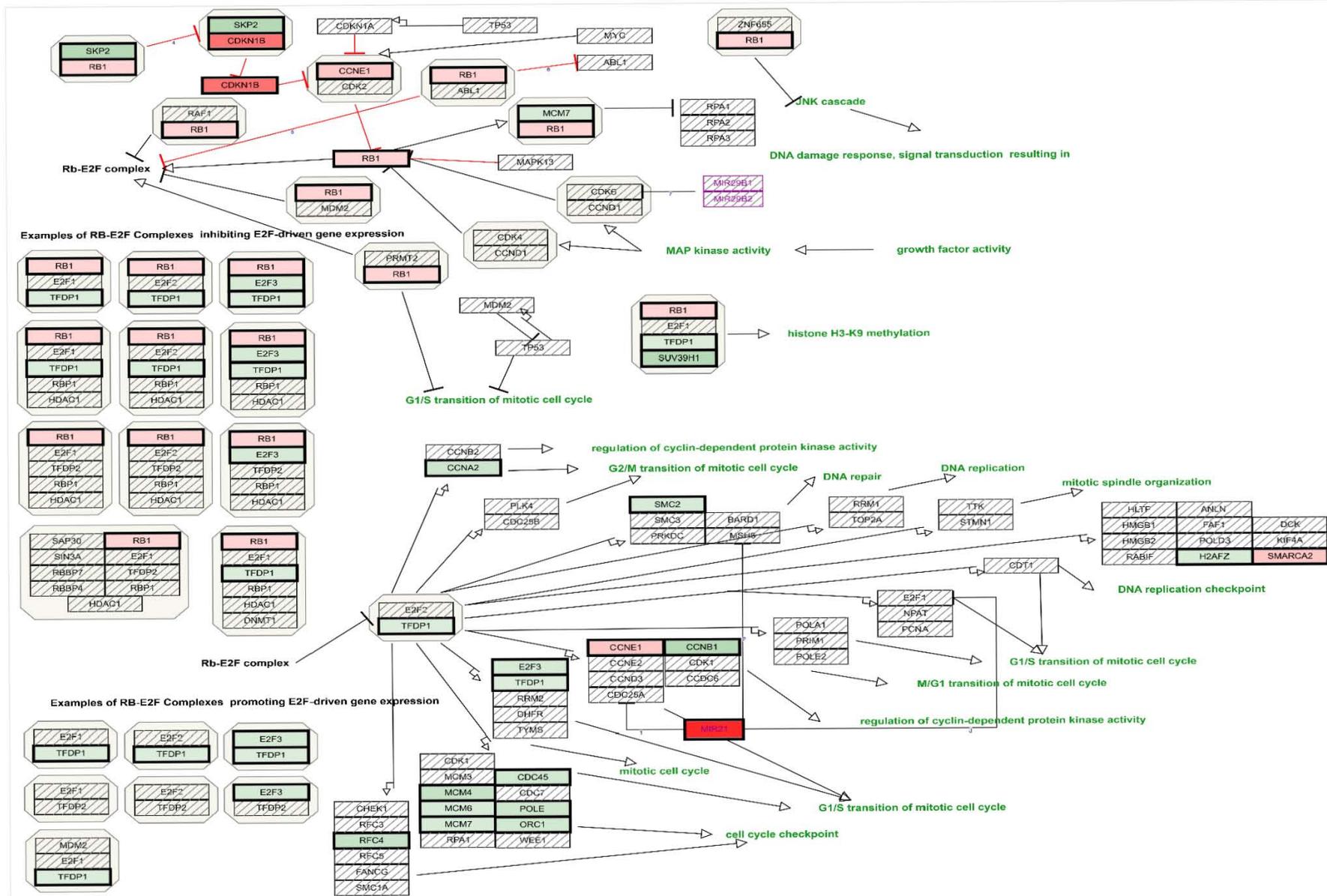


Figura 37. Cambios de expresión de genes involucrados en la vía de retinoblastoma en cáncer. Células Raji.

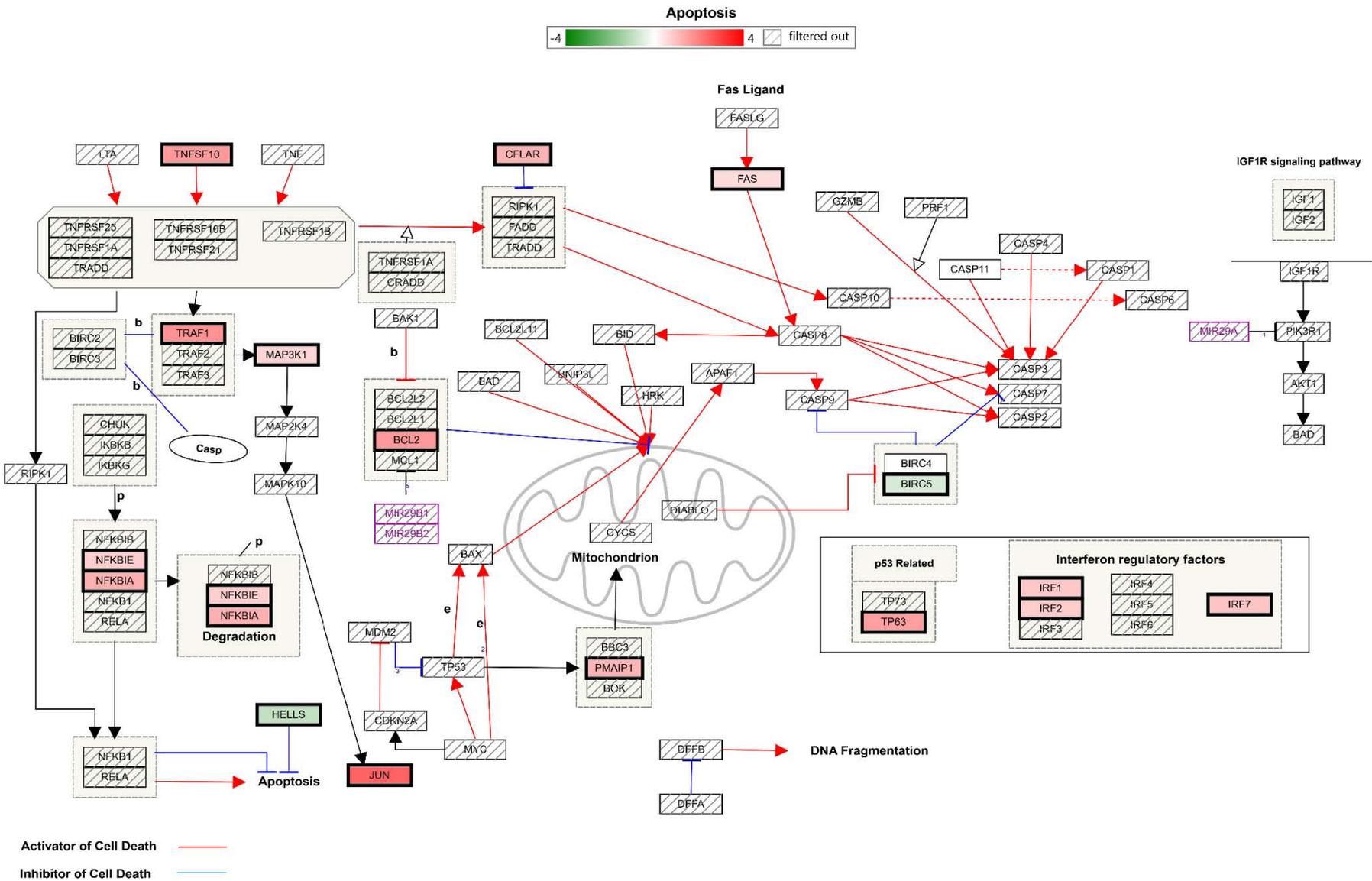


Figura 38. Cambios de expresión de genes involucrados en la vía de apoptosis. Células Raji.

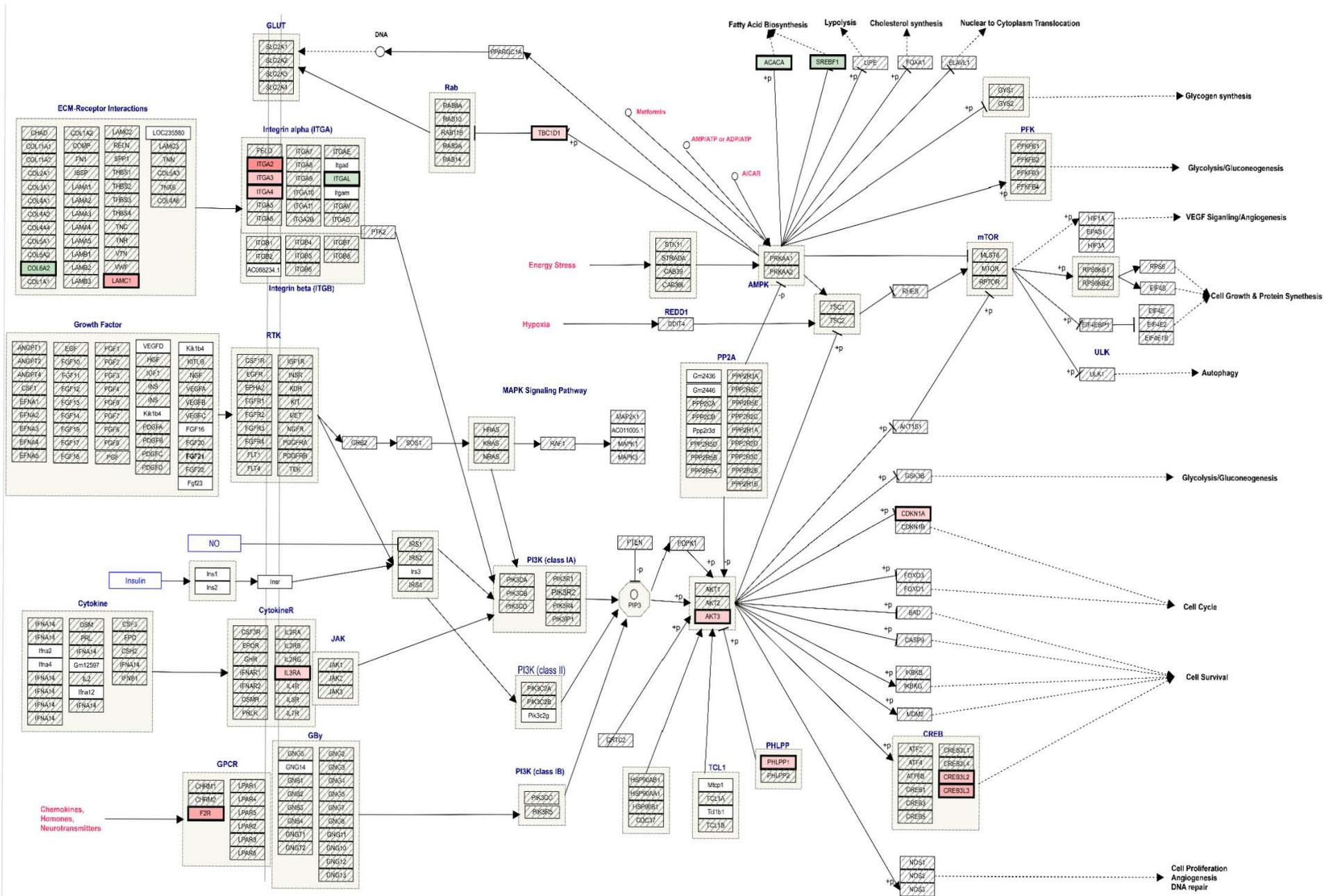


Figura 39. Cambios de expresión de genes involucrados en la vía PI3K/AKT/mTOR. Células Hut78.

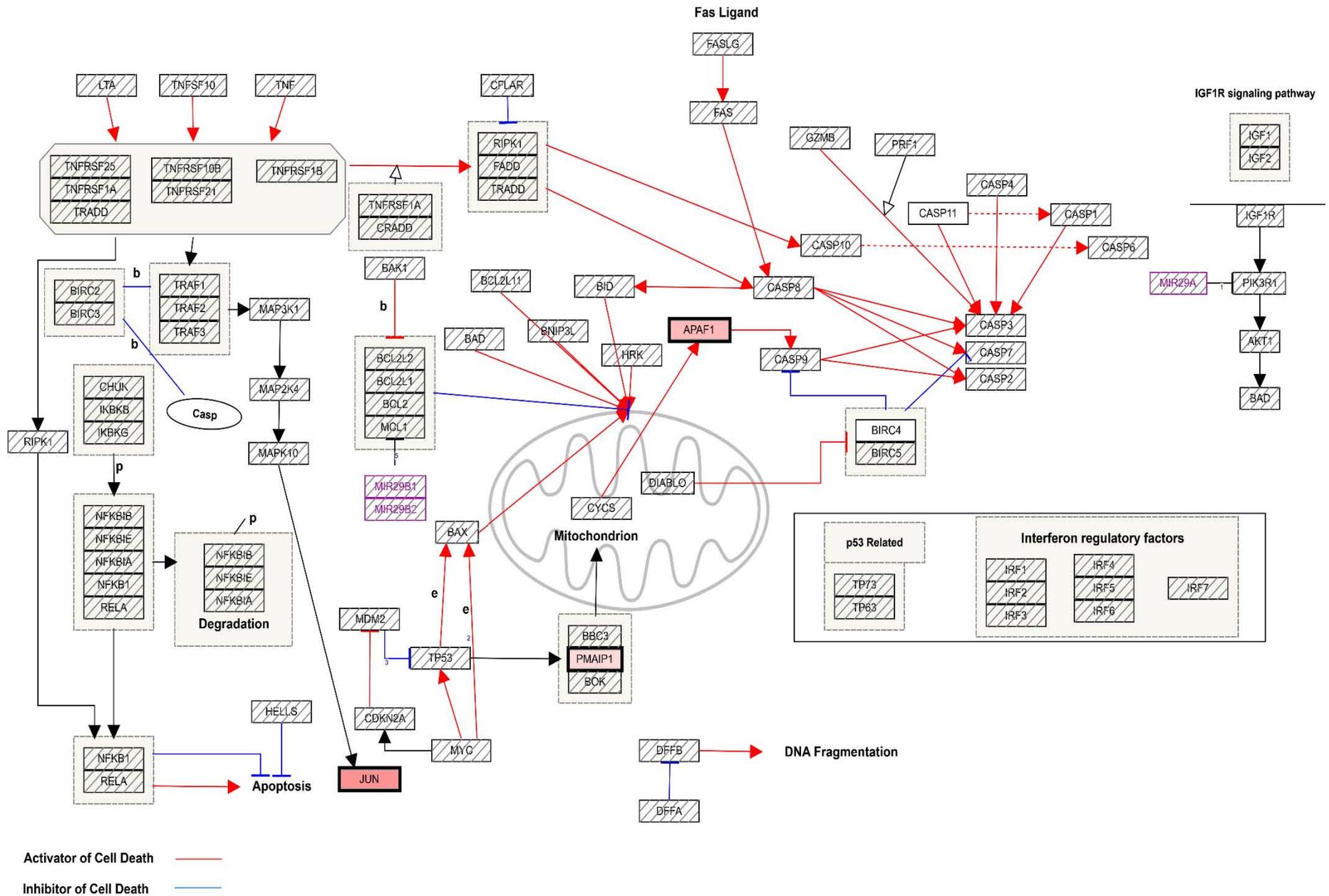


Figura 40. Cambios de expresión de genes involucrados en la vía de apoptosis. Células Hut78.

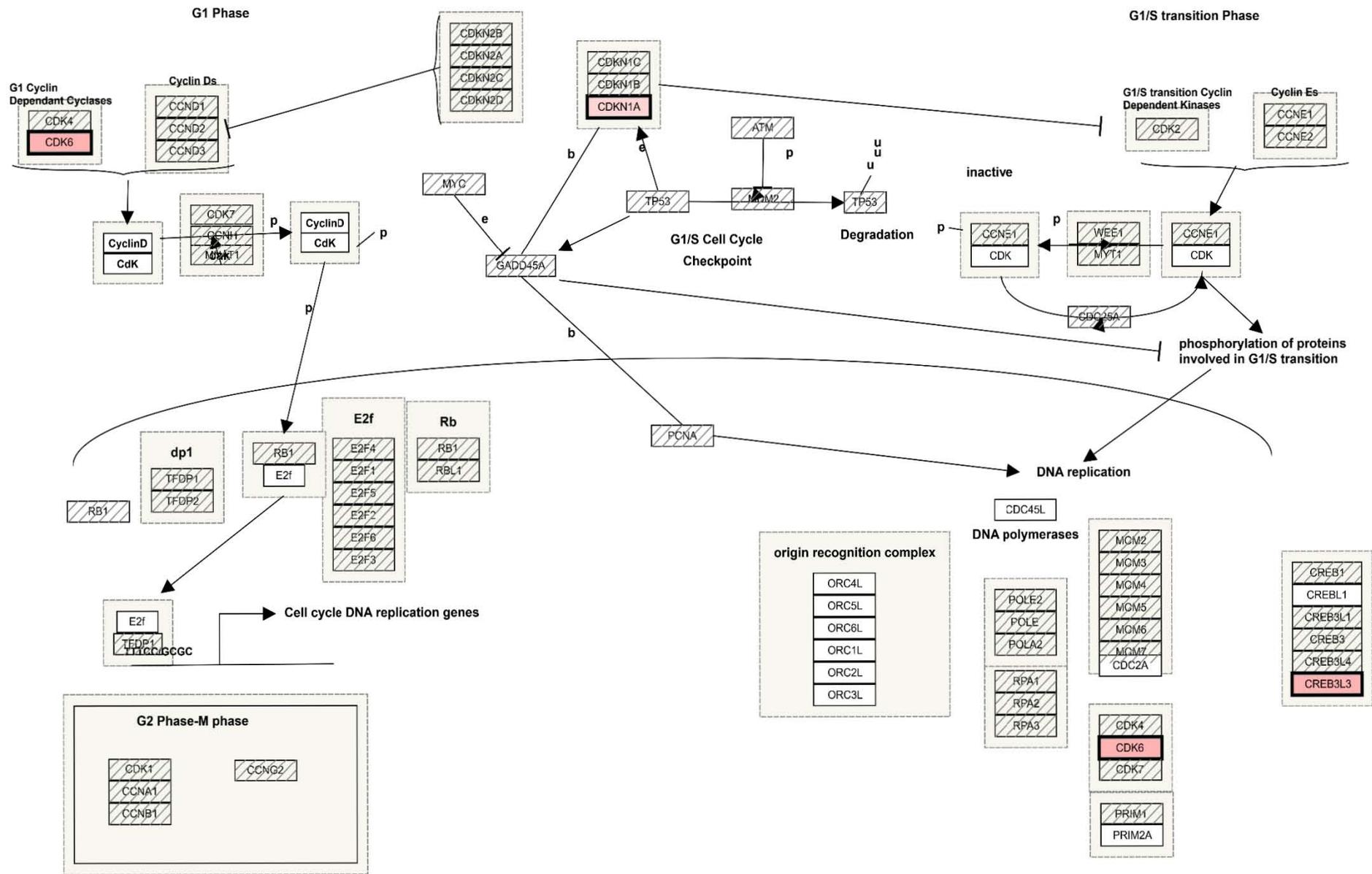


Figura 41. Cambios de expresión de genes involucrados en la vía de ciclo celular. Células Hut78.