



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN EL PROTEOMA
RELACIONADOS CON RESISTENCIA A FÁRMACOS EN LA
LÍNEA CELULAR CCRF-SB DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA ANTE LA EXPOSICIÓN SÚBITA A VINCRISTINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

HUGO DÍAZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

QUEZADA PABLO HÉCTOR



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Elizalde Torres Josefina**

VOCAL: **Profesor: Gutiérrez Venegas Gloria**

SECRETARIO: **Profesor: Quezada Pablo Héctor**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Díaz Flores Luis Alejandro**

2° SUPLENTE: **Profesor: Gutiérrez Luna Francisca Morayna**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ. LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE INMUNOLOGÍA Y PROTEÓMICA**

ASESOR DEL TEMA: HÉCTOR QUEZADA PABLO

SUSTENTANTE: HUGO DÍAZ SÁNCHEZ

Resumen

La Leucemia Linfoblástica Aguda infantil (LLA) es un cáncer de la sangre y de la médula ósea y es el tipo de cáncer más común en los niños y adolescentes. La LLA infantil se origina en los linfoblastos de células T y B en la médula ósea, y en pacientes con la enfermedad, aumenta el número de células inmaduras que no logran llevar a cabo sus funciones como los linfocitos sanos dentro del sistema inmunológico. La quimioterapia es el tratamiento al que más se recurre y en él se utilizan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. La vincristina es un alcaloide antitumoral y antineoplásico, se sabe que sus efectos son específicos de cada fase del ciclo celular, pero principalmente bloquean la división celular de células que se encuentran en mitosis. Su actividad biológica se basa en la capacidad para ligarse directamente a la tubulina bloqueando la facultad de dicha proteína para polimerizarse en microtúbulos interrumpiendo así la división celular. Desafortunadamente durante el tratamiento con vincristina en los pacientes pueden llegar a sobrevivir una población de células leucémicas las cuales generan resistencia a la quimioterapia, lo que provoca una recaída del paciente, dificultando su tratamiento, por lo que encontrar los procesos celulares y las proteínas involucradas que dan origen a la resistencia es de gran interés para generar tratamientos y evitarla. La proteómica es una disciplina que se encarga del estudio a gran escala de los productos proteicos de un genoma utilizando métodos bioquímicos, lo que ayuda a obtener una visión global e integrada de los procesos celulares que ocurren bajo ciertas condiciones de crecimiento. La espectrometría de masas es una herramienta que se puede implementar en estudios proteómicos con la que es posible identificar grandes cantidades de proteínas en base a la detección de péptidos que son comparados con bases de datos que contienen proteínas que han sido secuenciadas y caracterizadas.

Este proyecto tiene como objetivo identificar, mediante espectrometría de masas, los cambios en el proteoma en la línea celular CCRF-SB de LLA al ser expuesta súbitamente a una concentración subletal de vincristina durante 24 horas. Para esto se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) y ésta se usó para exponer a las células durante 24 horas. Se extrajo el proteoma total de las células expuestas y se inyectó en un equipo de nanoHPLC-MS/MS donde se detectaron las diferentes masas correspondientes a los péptidos de las proteínas extraídas. Los datos obtenidos se analizaron mediante diferentes bases de datos donde se identificaron y clasificaron las proteínas identificadas. Al compararse las diferencias entre células que fueron expuestas y células control se encontraron funciones biológicas sobreexpresadas como la reparación de ADN, β -oxidación, tráfico vesicular, metabolismo mitocondrial y señalización por calcio, así también se identificaron proteínas específicas relacionadas con los procesos anteriores. Estos procesos en conjunto podrían estar actuando como una red de mecanismos para defenderse de la acción citotóxica de la vincristina.

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Introducción	4
2.1 Planteamiento del problema	4
2.2 Objetivos	4
2.3 Hipótesis.....	5
3. Antecedentes	6
3.1 Leucemia linfoblástica aguda	6
3.2 Vincristina	9
3.3 Proteómica.....	10
3.4 Espectrometría de masas y HPLC	12
4. Metodología	17
4.1 Cultivo celular	17
4.2 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de vincristina a 24 horas.....	18
4.3 Exposición súbita a vincristina	19
4.4 Efectividad de los lavados de células	19
4.5 Obtención del proteoma total de las células CCRF-SB	20
4.6 Análisis por HPLC-MS.....	23
4.7 Análisis de los estándares de proteína digerida HeLa	24
4.8 Análisis bio-informático.....	25
5. Resultados.....	26
5.1 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de vincristina a 24 horas.....	26
5.1.1 Cálculo de la IC ₅₀	28
5.2 Efectividad de los lavados de células	29
5.3 Estándar de HeLa.....	29
5.4 Extracción y análisis por HPLC-MS del proteoma total de las células CCRF-SB.....	31
5.5 Análisis bio-informático.....	32
5.5.1 SSBP1. Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial	43
5.5.2 MSH6 (GTBP). Proteína de reparación de desemparejamientos del ADN.....	44

5.5.3 RFC3 y RFC4. Factor de replicación C subunidades 3 y 4	45
5.5.4 NDUFA5. Subunidad 5 del subcomplejo 1 α de NADH deshidrogenasa (Ubiquinona)	47
5.5.5 RAB1B y RAB21. Proteína relacionada a Ras Rab-1B y Rab-21	47
5.5.6 TMED10 (TMP21). Transmembrana emp24, dominio que contiene la proteína 10.....	49
5.5.7 Reparación de ADN.....	50
5.5.8 β -oxidación.....	51
5.5.9 Tráfico vesicular	53
5.5.10 Metabolismo mitocondrial	54
5.5.11 Señalización por calcio	55
6. Discusión de resultados.....	57
7. Conclusiones.....	60
8. Bibliografía	63
9. Anexos.....	75
9.1 ANEXO I. Cromatogramas de los estándares HeLa.....	75
9.2 ANEXO II. Cromatogramas de las muestras en las réplicas 1 y 2.	76
9.3 ANEXO III. Proteínas encontradas en las categorías funcionales sobrerrepresentadas.	80

1. Abreviaturas

°C: Grados centígrados

µg: Microgramos

µL: Microlitros

µm: Micrómetros

ABC: *Ammonium bicarbonate* (Bicarbonato de amonio)

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

CCRF-SB: Linfocitos B pertenecientes a la línea celular de leucemia linfoblástica aguda

ClGn: Cloruro de guanidinio

cm: Centímetros

cm²: Centímetros cuadrados

CMTN: Cáncer de mama triple negativo

CO₂: Dióxido de carbono

CoA: Coenzima A

Conc.: Concentración

CT: Células control, no expuestas a vincristina

DTT: Ditiotreitól

ESI: *Electro Spray Ionization* (ionización por electrospray)

FASN: *Fatty Acid Synthase* (Sintasa de ácidos grasos)

FDR: *False Discovery Rate* (Tasa de identificaciones falsas)

HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento)

IAM: Iodoacetamida

IC₅₀: *Inhibitory Concentration 50* (Concentración inhibitoria 50)

KDa: Kilodaltones

LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LMA: Leucemia mieloblástica aguda
m/z: Relación masa/carga
M: Molar
MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
(desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz)
mg: Miligramos
min: Minutos
miR: MicroRNA
mL: Mililitros
mm: Milímetros
mM: Milimolar
MMR: *Missmatch repair* (reparación de desajustes)
MS: *Mass spectrometry* (Espectrometría de masas)
N₂: Nitrógeno
nanoHPLC: *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de nanoflujos)
PBS: *Phosphate buffered saline* (Buffer salino de fosfatos)
PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen* (antígeno nuclear de células en proliferación)
PPIA: *Peptidylpropyl isomerase A* (peptidilpropil isomerasa A)
PPI D: *Peptidylpropyl isomerase D* (peptidilpropil isomerasa D)
Q: Cuadrapolo
RDA: Respuesta al daño del ADN
ROS: *Reactive oxygen species* (Especies reactivas de oxígeno)
rpm: Revoluciones por minuto
RPMI: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*
SDS: *Sodium docecyl sulfate* (dodecilsulfato de sodio)
SNC: Sistema nervioso central
TFA: *Trifluoroacetic acid* (ácido trifluoroacético)

TME: Transición mesenquimal-epitelial

TOF: Time Of Flight (tiempo de vuelo)

Tris: Tris-hidroximetil aminometano

VCN: Células expuestas a vincristina

Viab.: Viabilidad

2. Introducción

2.1 Planteamiento del problema

La leucemia linfoblástica aguda es el principal tipo de cáncer que afecta a los niños en la población mexicana y en el mundo. El tratamiento de la enfermedad ha mejorado en las últimas décadas, llegando a ser en México cerca del 80% de pacientes los que logran curarse de la enfermedad. Desafortunadamente cerca del 20% de los casos resulta en una recaída durante el tratamiento y gran parte de estos es debido a la generación de quimioresistencia a la vincristina, la cual es uno de los principales fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad. La quimioresistencia es un problema grave para los pacientes debido a que el tratamiento se complica por lo que resulta de gran interés el identificar aquellos mecanismos celulares que dan lugar a esta resistencia de las células ante los efectos de la vincristina.

2.2 Objetivos

Objetivo principal

Identificar los cambios en el proteoma de una línea celular de LLA que sean indicativos de resistencia a vincristina durante una exposición súbita.

Objetivos secundarios

- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) a las 24 horas de exposición a vincristina en la línea celular CCRF-SB.
- Exponer un cultivo celular de CCRF-SB a la IC_{50} de vincristina durante 24 horas.
- Extraer y purificar el proteoma total de cultivos celulares expuestos a vincristina durante 24 horas.

- Inyectar el proteoma extraído en un equipo de nanoHPLC-MS y llevar a cabo la identificación de los péptidos y posteriormente de las proteínas presentes.
- Realizar un análisis bioinformático de las proteínas identificadas en bases de datos para encontrar aquellas relacionadas con procesos y mecanismos de resistencia a la vincristina.

2.3 Hipótesis

La comparación del proteoma total de células cultivadas en presencia y ausencia de vincristina permitirá identificar la sobreexpresión de mecanismos clave en la resistencia a este fármaco.

3. Antecedentes

3.1 Leucemia linfoblástica aguda

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es un tipo de cáncer que se origina en la línea linfoide, específicamente en el precursor de los linfocitos B y T, el linfoblasto¹, el cual puede ser clasificado de diversas formas, dependiendo de sus características morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y genéticas, entre otras. La principal característica de la LLA es el aumento alarmante de linfocitos tanto en la médula ósea como en el torrente sanguíneo, pudiendo llegar a la infiltración leucémica en otros sitios como ganglios, bazo, hígado y sistema nervioso central². Debido al incremento y acumulación de estas células, las cuales presentan deficiencias importantes en su funcionamiento, se provoca una disminución de la hematopoyesis, por lo que se pueden generar síntomas característicos como debilidad, hemorragias y hematomas (derivado de la trombocitopenia), anemia, palidez, dolor óseo y en articulaciones e incremento en las infecciones (derivado de la neutropenia)^{1, 2}.

La LLA es el tipo de cáncer más común en niños, aunque puede presentarse a cualquier edad y es la principal causa de muerte antes de los 20 años². En adultos es menos frecuente. El tratamiento temprano de la enfermedad en niños lleva a una alta probabilidad de recuperación, siendo actualmente arriba del 80% de los casos, mientras que en adultos no se tiene tan buen pronóstico. En 1948 se realizó la primera descripción de la remisión temporal de la leucemia inducida por quimioterapia³ desde entonces se ha logrado un incremento en la efectividad del tratamiento y la supervivencia de pacientes, incrementada de un 10% en 1960 hasta un 90% en la actualidad².

En los Estados Unidos la incidencia de la enfermedad es de 30 casos por cada millón de personas menores de 20 años, con el pico de incidencia

entre los 3 y 5 años^{4, 5}. La incidencia varía significativamente de acuerdo con la raza y grupo étnico se habla de que hay 14.8 de casos por millón en raza negra, 35.6 en caucásicos, 40.9 en hispanos, y también hay más frecuencia en hombres que en mujeres (55% y 45% respectivamente)⁶.

En México la leucemia es el tipo de cáncer infantil más común, con un 49.8%. La incidencia de la enfermedad en el año 2012 fue de 78.1 por cada millón de habitantes, siendo entre los 0 y 4 años el rango de edad con mayor frecuencia. Así mismo, predomina en el género masculino (55.5% de los casos). La LLA es el tipo de leucemia más predominante (83%)⁷. La tasa de mortalidad en México fue de 5.3/100,000 en el 2012 representando la segunda causa de muerte entre los 4 y 15 años. La supervivencia global de la enfermedad tuvo una tasa de 68%. Estos datos obtenidos en México reflejan que la incidencia y prevalencia de la enfermedad es similar a la de países desarrollados⁷.

El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en la aparición de trastornos hematológicos como pancitopenia (disminución simultánea de glóbulos rojos, blancos y plaquetas) e hiperleucocitosis. La presencia de leucocitosis no es requerida para el diagnóstico de la enfermedad, ya que solo se presenta en un tercio de las leucemias⁸, por lo que se hacen análisis importantes como el recuento sanguíneo completo, panel bioquímico (ácido úrico, creatinina, nitrógenos sanguíneos y perfil hepático), fibrinógenos, pruebas de coagulación y pruebas de infección activa. La biopsia de médula ósea es necesaria para un diagnóstico definitivo, mientras que el frotis de la sangre periférica y el hematograma son las herramientas más útiles para detectar la enfermedad^{8, 9}. Las células malignas se llevan a un estudio citogenético convencional para ayudar a la información pronóstica y la citometría de flujo se realiza para caracterizar los antígenos que definen al linaje e identificar subtipos de la LLA. Hay distintos factores que pueden llevar a

determinar el pronóstico de la enfermedad, entre los que se encuentran la edad, que es un factor importante y significativo, siendo a edades tempranas los que tienen el mejor pronóstico², y el conteo de células blancas, donde un conteo alto lleva a un peor pronóstico.

Tratamiento: El tratamiento se basa en controlar la enfermedad eliminando la población total de células leucémicas tanto en la médula ósea como la enfermedad sistémica, así como evitar o tratar la enfermedad en otros sitios como el sistema nervioso central (SNC). La terapia más importante es la quimioterapia, que se administra sistemáticamente y tiene un tratamiento preventivo al SNC. En la quimioterapia se utilizan medicamentos para detener la proliferación de células cancerosas impidiendo su división o provocando apoptosis. Esta terapia puede ser administrada por diversas vías como la vía oral, intravenosa, intramuscular o intratecal, dependiendo del sitio donde se esté llevando el tratamiento de la enfermedad. El tratamiento se puede dividir en tres fases que incluyen la inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento, y el tratamiento total de la enfermedad puede variar entre 1.5 a 3 años.

La inducción a la remisión: es la primera fase del tratamiento y tiene como principal objetivo erradicar a las células leucémicas de la sangre y de la médula ósea. Dura entre 4 a 6 semanas e incluye un glucocorticoide (Prednisona o dexametasona), vincristina, asparaginasa, una antraciclina como uso opcional y quimioterapia intratecal². La mayoría de los pacientes llegan a la remisión, pero no significa que estén curados, ya que las recaídas pueden ocurrir sin una terapia adicional.

Consolidación: En esta fase del tratamiento, una vez que se encuentra en remisión el paciente se tiene por objetivo destruir a las células leucémicas que aun permanezcan en el cuerpo y que tienen la capacidad

de provocar una recaída. Dura de 6 a 8 meses con una combinación intensa de quimioterapia, que esta designado para consolidar la remisión y prevenir el desarrollo de leucemia en el SNC².

Mantenimiento: La última fase del tratamiento tiene por objetivo eliminar toda célula leucémica restante que pueda regenerarse y producir recaída. A diferencia de las fases anteriores aquí se administran dosis más bajas y por un largo periodo de tiempo. Es una terapia de mantenimiento basada en anti-metabolitos de baja intensidad, que dura de 18 a 30 meses. Esta terapia consiste en una dosis diaria de mercaptopurina o tioguanina y metotrexato semanal por vía oral. Algunos tratamientos incluyen dosis cada 5 o 7 días de glucocorticoides y vincristina².

3.2 Vincristina

La vincristina es un alcaloide de origen natural obtenido de las hojas de la planta *Cantharanthus roseus* y pertenece a los alcaloides de la vinca, junto con la vinblastina^{10, 11}. Es un alcaloide de estructura compleja que se presenta en la forma de sulfato de vincristina, con un peso molecular de 923.1 KDa ($C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$)¹². Históricamente la planta era usada desde el siglo XVII, donde extractos de la planta se empleaban en el tratamiento de varias enfermedades¹³, pero fue hasta la década de 1950 que estudios demostraron que su uso causaba supresión de la médula ósea y tenía efectos antileucémicos en ratones^{14, 15}. La vincristina es un antineoplásico que sirve para la supresión del crecimiento de tumores y cuyo mecanismo de acción se sabe que impide la polimerización de los microtúbulos interfiriendo con el uso mitótico¹⁶ durante la división celular lo que provoca su interrupción llevando a la muerte celular. Agentes como la vincristina y la vinblastina se unen a la subunidad β de los heterodímeros α/β -tubulina, inhibiendo la adición de heterodímeros a los microtúbulos crecientes resultando en la despolimerización de

estos¹⁷. El efecto de la vincristina varía dependiendo de la concentración y duración de la exposición. A bajas concentraciones la vincristina estabiliza la estructura de los microtúbulos, pero al aumentar la concentración, la vincristina rompe y despolimeriza los microtúbulos¹⁶. El efecto de una exposición de corta duración en la división celular es reversible si se interrumpe la exposición, pero una exposición a largo plazo tiene un efecto irreversible y letal, por lo tanto, la eficacia clínica de la vincristina depende significativamente de la concentración y de la duración de la exposición¹⁶. La vincristina ha mostrado un amplio espectro de actividad clínica contra varias enfermedades pediátricas y del adulto. La respuesta clínica vista en pediatría varía de un 40% en tumores sólidos a 75% en enfermedades hematológicas, principalmente LLA por lo que la vincristina es un componente importante en tratamientos usados en LLA infantil y linfoma de No-Hodgkin¹⁶.

3.3 Proteómica

El conjunto de proteínas que se expresa en un tejido o célula bajo ciertas condiciones de crecimiento se le conoce como proteoma, y el estudio de este se le llama proteómica. La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, tomando en cuenta su estructura y función, pero principalmente tiene por objetivo el saber cómo interactúan conjuntamente todas estas proteínas para llevar a cabo alguna función en específico. La proteómica es un campo que nos ayuda a realizar estudios a gran escala tanto de forma cuantitativa como cualitativa en el análisis de proteínas¹⁸. En otras palabras, a diferencia de las técnicas de la bioquímica clásica, que estudian solo algunas proteínas a la vez para saber sus características, en la proteómica nos basamos en las funciones combinadas de múltiples proteínas para conocer todo un mecanismo global que se esté llevando a cabo en la célula o tejido que se esté estudiando. Es una herramienta con un gran

alcance con la que es posible estudiar incluso solo aquellas proteínas que estén expresándose en un organelo dentro de una célula, o por ejemplo solo aquellas que se encuentren fosforiladas (fosfoproteoma).

La proteómica puede llegar a ser un estudio complejo debido al amplio número de proteínas resultantes de varias variantes de *splicing* y modificaciones post-traduccionales, también a características dinámicas tales como interacciones proteína-proteína, interacciones con otras moléculas no proteínicas, proteólisis y la localización subcelular. Por lo tanto, la proteómica puede confrontar problemas o enfermedades a un nivel más profundo¹⁸. Gracias a la proteómica es posible hacer estudios específicos sobre una célula o tejido que nos indiquen aquellos mecanismos que se ven afectados cuando tenemos ciertas condiciones de crecimiento, como lo es durante una enfermedad, escases de alimento, exposición a alguna sustancia o fármaco, y así obtener información sobre mecanismos de acción de fármacos, desarrollo de una enfermedad, entre otros.

Un estudio proteómico puede llevar a la obtención de mucha información, la cual debe ser analizada cuidadosamente para poder separar aquella que es relevante para el objetivo del estudio, aplicando métodos estadísticos, bases de datos, estudios de sobrerrepresentación entre otros. Para evaluar adecuadamente los datos proteómicos es necesario tener preguntas simples y relevantes para un caso particular que se esté estudiando e ir avanzando con preguntas más específicas¹⁸. La proteómica es una ciencia relativamente nueva, a comparación de otras, esto principalmente a que su uso solo ha sido posible a partir de tecnologías recientes. Una de las herramientas más utilizadas, y quizás la más importante en la proteómica es la espectrometría de masas, la cual ha permitido el análisis de proteínas en muestras complejas, llegando secuenciarlas y a identificarlas.

3.4 Espectrometría de masas y HPLC

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se utiliza para el estudio de las masas de distintas especies como átomos, moléculas o fragmentos de moléculas. La espectrometría de masas ha sido usada por largo tiempo en la investigación para medir y determinar isótopos de algunos elementos hasta moléculas orgánicas complejas como proteínas¹⁹. Con la espectrometría de masas es posible determinar la secuencia de aminoácidos en una proteína, la secuencia de ácidos nucleicos en el ADN, la estructura de un carbohidrato complejo y los tipos de lípidos en un organismo. Tiene un amplio campo de aplicación en diversas áreas de la investigación, así como en la industria.

La espectrometría de masas genera un espectro de masas y la obtención de este se logra a través de un tratamiento gradual; primero las especies gaseosas separadas de las fases condensadas son ionizadas, los iones son acelerados a través de un campo eléctrico y son separadas de acuerdo con la relación masa/carga (m/z)¹⁹ y después estos iones pasan al detector. En un analizador los iones se encuentran con un campo magnético perpendicular a la dirección en la que están viajando, durante este proceso se mantiene un vacío constante para evitar que los iones sean desviados al chocar con moléculas de gases presentes. El campo magnético desvía los iones en dirección del final del tubo, donde está el detector, los iones pesados no son desviados suficientemente mientras que los ligeros se desvían demasiado para alcanzar el detector. Un espectro de masas se obtiene al variar la fuerza del campo magnético, por lo que se van detectando diferentes masas conforme varía la fuerza¹⁹.

Para poder llegar a la medición de las masas de las especies y con esto obtener un espectro de masas es necesario que dichas especies pasen a una fase gaseosa y que sean ionizadas, es decir que obtengan una carga

eléctrica. La espectrometría de masas funciona tanto para iones positivos como negativos, lo que se logra simplemente revirtiendo los voltajes donde los iones son formados y detectados¹⁹. La ionización por *electrospray* es una técnica de ionización utilizada entre un cromatógrafo de líquidos y un espectrómetro de masas. El líquido proveniente de la columna cromatográfica entra en un nebulizador capilar de acero junto con un flujo coaxial de nitrógeno gaseoso (N₂). Un fuerte campo eléctrico en la salida del nebulizador, combinada con el flujo de nitrógeno crea un fino aerosol de partículas cargadas. Dependiendo del análisis aquí se seleccionan los iones positivos o negativos, siendo desechadas las cargas no deseadas, así como las moléculas neutras. Para esta técnica resulta de gran importancia que al momento de entrar al equipo los analitos deseados ya se encuentren con la carga deseadas (positiva o negativa) ya que el *electrospray* únicamente libera iones preexistentes en la solución.

Después de la generación de iones en fase gaseosa, el deflector se encarga de la selección de las moléculas cargadas que se desean analizar, ya sea positivos o negativos. Esta separación se realiza aplicando un campo eléctrico en el que las moléculas elegidas avanzan y van siendo deflectadas hacia el analizador. Esta separación también depende de la masa por lo que la separación final depende del cociente masa / carga (m/z). En el analizador, generalmente se realizan dos procesos: primero se hace la medición de la masa de los iones que están presentes en un momento dado, por ejemplo, cada 0.3 segundos y de entre ellas, se seleccionan algunos iones de interés para fragmentarse, generalmente los más abundantes y con cargas mayores a +1 o -1. Comúnmente se usan gases inertes como helio o nitrógeno para que colisionen con los iones de interés y pasen a una segunda etapa de medición de masas, en donde se miden las masas de los fragmentos resultantes. Existen diferentes tipos de analizadores, por

ejemplo, los de tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolos (Q), *orbitrap* o trampa de iones. Finalmente, los iones impactan al detector y son representados en un espectro, donde es posible ver la abundancia y la relación m/z .

Existen diferentes tipos de espectrómetros de masas (ESI, MALDI, QTOF) pero todos se basan en los mismos principios para llevar a cabo el análisis de las muestras.

En proteómica, el uso de un espectrómetro de masas es importante, y como ya se mencionó las muestras analizadas por lo general son muy complejas. Para un análisis correcto en espectrometría de masas es necesario cuidar muy bien el cómo va a entrar nuestra muestra al equipo y uno de los aspectos más importantes es evitar que toda la muestra entre de golpe al equipo, debido a que esto puede llevar a que se sature y nos dé lecturas incorrectas y poco precisas, así mismo también hay que asegurarse de que entre una cantidad de muestra lo suficientemente alta como para poder ser detectada. Debido a que las muestras utilizadas en proteómica son complejas, es decir, contienen gran cantidad de analitos y todos ellos importantes para el estudio, es necesario aplicar un método previo que nos permita separarlos cuidadosamente en base a alguna de sus propiedades fisicoquímicas como lo es la hidrofobicidad, que permitirá que toda nuestra muestra entre al espectrómetro de una forma más ordenada y continua.

Uno de los métodos analíticos más utilizados junto con la espectrometría de masas es la cromatografía, la cual nos ayuda como paso previo a la identificación a que en muestras complejas de proteínas primero se separen los componentes, con el objetivo de que no entren todas juntas al espectrómetro de masas. Un espectrómetro de masas es un detector muy poderoso para la cromatografía ya que ofrece tanto información cuantitativa como cualitativa, con una alta sensibilidad y pudiendo

incluso diferenciar entre sustancias con el mismo tiempo de retención¹⁹. La espectrometría de masas nos ayuda a obtener tanto información cualitativa como cuantitativa en muestras de proteínas y el espectrómetro puede ser altamente selectivo para el analito de interés. Esta selectividad facilita los requisitos para la preparación de muestras o para completar la separación cromatográfica de los componentes en una mezcla e incrementa la relación señal/ruido. La ionización por *electrospray* es muy útil para el estudio de macromoléculas como lo son las proteínas, en parte gracias a que las proteínas tienen un ácido carboxílico y una amina como cadenas laterales, las cuales pueden tener una carga negativa o positiva respectivamente, dependiendo del pH de la solución donde se encuentren.

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). Es una técnica analítica de separación que utiliza presiones altas para forzar el flujo de un solvente a través de una columna cerrada que contiene una resina con lo que se logra una separación de alta resolución¹⁹. Se basa principio básico de la cromatografía, que es la migración a diferentes velocidades de los analitos de una mezcla dependiendo de su interacción con una fase estacionaria y una fase móvil. HPLC es una técnica muy recurrida para el análisis de muestras, ya que permite la separación de sus componentes de acuerdo con sus propiedades de hidrofobicidad, pudiendo tener una resolución muy alta a diferencia de otros tipos de cromatografía. Existen variaciones como el ultraHPLC que utiliza presiones altas para el avance rápido de las fases móviles o el nanoHPLC que es capaz de utilizar nanoflujos lo que da como ventaja que aun con una cantidad mínima de muestra se pueda realizar un análisis confiable.

El sistema de un HPLC consiste en un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta

presión, un detector y una computadora para controlar el sistema y mostrar los resultados. También dentro del sistema de HPLC se incluye un horno para el control de temperatura de la columna, que puede ayudar en el proceso al disminuir la viscosidad de los solventes con un incremento en la temperatura.

El HPLC utiliza una columna de 5 a 30 cm de largo y con un diámetro interno de 1-5 mm, aunque otros sistemas como el nanoHPLC utilizan columnas capilares de hasta 50 cm de largo con un diámetro de alrededor de 25 μm ; dentro de estas columnas se cuenta con una fase estacionaria siendo la más común partículas con microporos, y esféricas de sílice que son permeables a los solventes y tienen un área superficial de cientos de metros cuadrados por gramo. Estas partículas cuentan con el grupo silanol (Si-OH) las cuales pueden ser utilizadas como fase estacionaria, pero lo más común es que se añada un grupo funcional a la sílice que la haga polar (grupos amino, ciano, diol) o no polar (Octadecil, octil, fenil). El proceso de elusión consiste en la adsorción del analito en la fase estacionaria y las moléculas de la fase móvil compitiendo con el analito para unirse y la elusión ocurre cuando el solvente desplaza al analito de la fase estacionaria. El HPLC puede ser acoplado a distintos analizadores, los que nos van a permitir identificar y/o cuantificar las muestras que se hayan inyectado en el sistema. Como analizadores pueden utilizarse un espectrómetro de masas, espectrofotómetro, detector de índice de refracción entre otros, todo depende del tipo de analitos que se quiere detectar y si se va a hacer una detección cualitativa y/o cuantitativa¹⁹.

4. Metodología

4.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular CCRF-SB de leucemia linfoblástica aguda obtenida comercialmente y que corresponde a un paciente masculino caucásico de 11.5 años. Las células se colocaron en cajas para cultivo de 15 cm² con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1mM de piruvato, 1mM de glutamina y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Estas son condiciones ideales para el correcto crecimiento y desarrollo del cultivo celular⁹⁷. Previo a los experimentos se mantuvieron las células en estas condiciones con cambios de medio cada segundo o tercer día durante aproximadamente una semana. Para los cambios de medio se tomó todo el volumen de las cajas con una pipeta serológica para trasvasar el volumen en tubos para centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el sobrenadante cuidando de no perder el botón celular del fondo del tubo y este se resuspendió gentilmente en 1 mL de medio fresco.

Para el correcto desarrollo del experimento se requiere tener un número de células alto con una viabilidad alta (arriba del 85%) por lo que fue necesario monitorear esto en cada cambio de medio. Para esto se realiza una dilución de la suspensión de células con azul de tripano, la dilución final se ajusta dependiendo de la concentración de células (generalmente se utiliza 1:5 (suspensión: tripano) en 10 µL de volumen final). Se mezcló perfectamente y se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer para proceder con el conteo y la medición de la viabilidad de las células. El azul de tripano es un colorante de exclusión que permite identificar el número de células viables en un cultivo. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas intactas que

permiten excluir el tripano, mientras que las células muertas no lo hacen. Al observar al microscopio, las células viables tendrán un citoplasma claro y brillante, mientras que las no viables o muertas tendrán citoplasmas azules y oscuros²⁰. Con la ayuda de la cámara de Neubauer se cuentan el número de células vivas y muertas y se procede a calcular la viabilidad celular y la concentración de células. Una vez determinada la concentración y, si la viabilidad de las células resulta alta, se colocaron de nuevo en la caja para cultivo y se agrega medio de cultivo fresco necesario para no dejarlas muy confluentes y se dejan incubando. Si la viabilidad de las células no es suficiente (por ejemplo cercana al 50%), entonces se les hacen lavados con medio fresco, los cuales consisten en volver a centrifugar las células resuspendidas a 1000 rpm durante 5 minutos para eliminar las células muertas y así aumentar la viabilidad; Este proceso se repite hasta que se alcance por lo menos 70% de viabilidad, con lo que se dejan incubando en las cajas de cultivo.

4.2 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de vincristina a 24 horas

Para la determinar la IC₅₀ la línea celular CCRF-SB se expuso a diferentes concentraciones de vincristina y se determinó su viabilidad mediante la técnica del azul de tripano 24 horas después. Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 y 10 nM. En una caja de 96 pozos se colocaron en los 9 pozos seleccionados (8 concentraciones y un pozo control) 70 mil células con 200 µL de volumen final de medio, este procedimiento se realizó por duplicado. Posteriormente se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas y una vez pasado el tiempo se procedió a medir la viabilidad de cada uno de los pozos. Al final de este experimento se determinó una IC₅₀ de 6 nM.

4.3 Exposición súbita a vincristina

Una vez determinada la IC_{50} de 6 nM se expuso a esta concentración a la línea celular CCRF-SB. Para esto se partió de un cultivo celular con al menos 85% de viabilidad y por cada réplica del experimento se tuvo una caja control y dos cajas con células expuestas al fármaco. En cada caja para cultivo se colocaron 3 millones de células con 8 mL de medio. En las cajas de exposición a vincristina se añadieron 40 μ L de una dilución 1:100 de un stock de vincristina con una concentración de 0.1 mg/mL (121359.22 nM) con lo que se obtiene la concentración final de 6 nM. Las cajas se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas y 24 horas después se procedió a realizar el conteo celular, la medición de la viabilidad y se recolectaron las células. Para continuar con el experimento se le realizaron lavados a las células para asegurarnos de eliminar todo el medio de cultivo, para esto se tomaron las células con una pipeta serológica y se colocan en un tubo para centrífuga de 50 mL y se centrifugaron a 900 rpm a 4°C durante 5 minutos. Terminado el tiempo se desechó el sobrenadante y se agregaron 3 mL de buffer de fosfatos 1x (PBS) frío al botón de células y se resuspendieron gentilmente, después se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces más para dar un total de 3 lavados con PBS. Al final de último lavado el botón de proteínas se resuspendió en 1 mL de PBS y se pasó a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y se centrifugó bajo las mismas condiciones, finalmente el sobrenadante se desechó y conservamos el botón de células.

4.4 Efectividad de los lavados de células

Con este experimento se planteó demostrar la efectividad de los lavados para eliminar células muertas y asegurarnos de que las proteínas detectadas en los análisis proteómicos, correspondiesen a células vivas.

Para esto se realizó una réplica idéntica a la de exposición súbita, pero sin la caja control. Al igual que en el experimento anterior, la viabilidad se midió al momento en que se cumplieron las 24 horas de exposición y se procedió a realizar la misma técnica de lavado de células. Al finalizar este procedimiento se resuspendieron las células en 1 mL de PBS y se procedió a medir la viabilidad y se comparó con la viabilidad antes de los lavados.

4.5 Obtención del proteoma total de las células CCRF-SB

A partir de este punto nos aseguramos de trabajar siempre en frío las muestras. En el botón de células que obtuvimos después de los lavados se agregaron 500 μ L de un buffer de lisis (Tabla 1) y se resuspendieron perfectamente; el proceso de lisis comienza inmediatamente y para asegurar de que haya una lisis completa procedimos a sonicar las células durante 20 ciclos (1 segundo de pulso; 1 segundo de descanso). Después de sonicar los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos y se observó que al fondo de los tubos se formó un botón que corresponde a células que no se lisaron, en los casos donde sucedió se volvió a sonicar durante 20 ciclos más.

Tabla 1. Componentes del buffer de lisis para la extracción del proteoma.

Componente del buffer de lisis	Concentración
SDS	4%
Tris (pH 8.6)	100 mM
DTT	100 mM
Inhibidor de proteasas y fosfatasas	1x

El dodecilsulfato de sodio (SDS) ayuda a romper y disolver las membranas. El tris-hidroximetil aminometano (Tris) es un buffer que nos ayuda a mantener un nivel de pH ligeramente alcalino. El ditioneitol (DTT) es un agente

reductor que rompe los puentes de disulfuro en las proteínas. El inhibidor de proteasas y fosfatasas (ThermoFisher) evita que las proteínas extraídas puedan ser degradadas por este tipo de enzimas.

Los tubos se incubaron a 40°C con agitación suave durante 30 minutos para llevar a cabo el proceso de reducción de los puentes de disulfuro en las proteínas por parte del ditioneitol (DTT) presente en el buffer de lisis. Terminado el tiempo los tubos se toman y se les agregó Tris pH 8.6 a una concentración final de 300 mM y iodoacetamida (IAM) a una concentración final de 200 mM para llevar a cabo la alquilación de los grupos tiol y se pusieron a incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos.

Terminado el tiempo se procedió a la precipitación de proteínas, para lo cual en un tubo de centrifuga de 50 mL se agregó etanol puro con el lisado obtenido en una relación 9:1 (etanol:lisado). Para este paso se separó una alícuota de 100 µL de lisado de cada muestra y se precipitó por separado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con el objetivo de tener una alícuota exclusiva para la cuantificación de proteínas. Todos los tubos se llevaron a -20°C y se dejaron reposar durante toda una noche. A la mañana siguiente los tubos se colocaron en hielo y se procedió a realizar lavados para eliminar la mayor cantidad de sales y otros solutos no deseados. Para esto el contenido de los tubos se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartó todo el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 90% y se agitó vigorosamente en vórtex durante 2 minutos ya que es importante lavar perfectamente el botón obtenido, este proceso de lavado se repite 4 veces más. Con esos lavados se remueve la mayor parte del SDS, DTT, IAM y Tris, resultando un pellet compuesto predominantemente de proteínas desnaturalizadas. Después de descartar el sobrenadante del

último lavado los botones se dejan secar en los tubos lo mejor posible cuidando de que no se contaminen con el aire ambiental poniendo los tubos de cabeza. Una vez que los botones se encontraron perfectamente secos en los tubos se procedió a resuspender las muestras. Las muestras destinadas para cuantificación de proteínas se resuspendieron en 100 μL de una solución de urea 3 M y bicarbonato de amonio (ABC) 50 mM con ayuda de un vórtex. Una vez que se disolvieron perfectamente se procedió a cuantificar por el método de Bradford. Se tomó una alícuota de 10 μL de la solución de proteínas y se mezcló con 300 μL del reactivo de Bradford, para la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro se utilizó una longitud de onda de 595 nm y como blanco se utilizó la solución de urea y ABC. Con base en las mediciones obtenidas se calculó la cantidad de proteína presente en las muestras completas.

Las muestras completas de proteínas se resuspendieron en 150 μL de una solución de cloruro de guanidinio (ClGn) 50 mM y ABC 50 mM, para lo cual se agitan perfectamente en vórtex durante 10 minutos para asegurar que todas las proteínas se han disuelto perfectamente. Se calculó entonces la cantidad de tripsina que será añadida en cada tubo de acuerdo al resultado obtenido en la cuantificación para obtener una relación final 1:50 (tripsina:proteínas). La alícuota de tripsina se encuentra en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Una vez agregada la tripsina y bien homogeneizada en vórtex se incuban los tubos a 37°C con agitación suave durante 18 horas.

Terminado el tiempo, los tubos se sacaron de la incubación, se colocan en hielo y para detener la reacción de la tripsina se les agregó ácido trifluoroacético (TFA) suficiente para una concentración final de 0.1% para llegar a 500 μL de volumen final, se midió también el pH con tiras reactivas para asegurar un pH de 2 a 3, con lo que también se preparan las muestras para el desalado.

Para el proceso de desalado se utilizan columnas SEP PAK C18 junto con dos soluciones A y B. La solución A consiste en agua milliQ con 0.1% de TFA y la solución B corresponde a una solución con acetonitrilo (ACN) 60% con agua milliQ al 0.1% de TFA. Cada una de las muestras fue tratada con una columna totalmente nueva. A las columnas se les pasó un volumen de 2 mL de la solución B para limpiar de impurezas que pudieran estar del proceso de fabricación de las columnas y posteriormente se pasaron 3 mL de la solución A para equilibrar la columna. Se procedió entonces a pasar la muestra a través de la columna dos veces y lo más lento posible para asegurar que los péptidos se adhieran a la columna, después se hizo pasar lentamente 5 mL de la solución A con lo que se acarrearon los solutos hidrofílicos que no interactúan con la columna como es el caso de las sales. Finalmente, se eluyeron los péptidos con la solución B haciendo pasar primero 500 μ L y se recolectaron en un tubo nuevo, posteriormente se hizo pasar de nuevo ese volumen junto con otros 500 μ L de solución B, dando un volumen final de 1 mL.

Los tubos con los péptidos ya desalados se llevaron a una microcentrífuga con secado al vacío, donde se eliminó todo el disolvente y quedaron los péptidos totalmente secos e inmediatamente se guardaron a -80°C hasta que fueron utilizados.

4.6 Análisis por HPLC-MS

Para llevar a cabo el análisis en el equipo los péptidos fueron resuspendidos en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en un volumen necesario para alcanzar una concentración de 1 μg de proteína/ μL ; dependiendo de los microgramos de proteína determinados en cada muestra, los péptidos se resuspenden en una cantidad de microlitros equivalente. Las muestras fueron colocadas en viales para ser inyectadas en el equipo de nanoHPLC Ultimate 3000 (Thermo) con una

columna C18 de nanoflujos con un gradiente en el que la fase A fue agua al 0.1% de ácido fórmico y la B fue acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico, el gradiente programado se puede ver en la Tabla 2. Estas condiciones de trabajo son las recomendadas para muestras complejas de proteínas⁹⁷.

Tabla 2. Gradiente de elución utilizado para el experimento

Tiempo (min)	% De la fase B	% De la fase A
0	1	99
7	1	99
15	15	85
50	20	80
150	40	60
210	60	40
232	90	10
240	1	99
285	1	99

La fase B corresponde a acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico y la fase A a agua MilliQ con 0.1% ácido fórmico.

El nanoHPLC estuvo acoplado a un espectrómetro de masas *Amazon Speed ETD*, que corresponde a un equipo de trampa de iones operado con ionización por *electrospray* y configurado para la detección de iones positivos. Cada una de las muestras se inyectó por triplicado en el equipo.

4.7 Análisis de los estándares de proteína digerida HeLa

El estándar de HeLa (ThermoFisher) es un estándar de proteína digerida de la línea celular HeLa y se utiliza como control de calidad para análisis por espectrometría de masas de muestras complejas de proteínas. Este estándar se inyectó por triplicado en el equipo de HPLC-MS con la

misma configuración y método con los que se inyectaron las muestras. Este estándar comercial se utilizó como control positivo y para determinar los límites de detección de proteínas en el equipo con el método utilizado.

4.8 Análisis bio-informático

Los resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas se analizaron con los programas *DataAnalysis* y *ProteinScape* (ambos de Bruker), incluyendo el análisis por *ProteinExtractor*, el cual es un análisis del programa *ProteinScape* que nos permite obtener una compilación de resultados de distintos análisis provenientes de distintas inyecciones al equipo siempre y cuando sean de la misma muestra, este análisis ayuda a mejorar los resultados encontrados (número de proteínas identificadas) al encontrar congruencias entre las distintas inyecciones.

Una vez obtenida la lista de proteínas identificadas, y como parte de la interpretación de los resultados, se usaron programas en línea *VENN DIAGRAM*²¹ (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) que nos permite hacer diagramas de Venn de hasta 30 listas para ver aquellos elementos compartidos entre ellas y la base de datos *DAVID Bioinformatics DataBase*²² (<https://david.ncifcrf.gov/>) con los que se podrán analizar las listas de proteínas y obtener información como las categorías funcionales sobrerrepresentadas a las que pertenecen las proteínas en cada una de las muestras. Para buscar datos relacionados con cada una de las proteínas como nombre, función y localización se utilizó la base de datos de UniProt²³ (<http://www.uniprot.org/>).

5. Resultados

5.1 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de vincristina a 24 horas

Los resultados obtenidos en dos réplicas biológicas independientes de la determinación de la IC₅₀ se resumen en la Tabla 3. Con los resultados de las viabilidades de las dos réplicas se obtuvo el promedio y con este se procedió a calcular la IC₅₀. Los datos se graficaron (Figura 1) y se puede observar la tendencia clara de una disminución en la viabilidad conforme se incrementa la concentración de vincristina.

Tabla 3. Resultados obtenidos en las dos réplicas para la determinación de la IC₅₀.

Conc. (nM)	% Viab. 1	% Viab. 2	Promedio (%)	Desviación estándar (%)
0	98	98	98	0
0.5	93	91	92	1.41
1	91	87	89	2.83
1.5	89	82	85.5	4.95
2	76	74	75	1.41
3	55	66	60.5	7.78
5	50	53	51.5	2.12
7	47	51	49	2.83
10	27	36	31.5	6.36



Figura 1. Gráfica con los promedios y desviaciones estándar de las viabilidades en las diferentes concentraciones de vincristina.

Tabla 4. Datos de la concentración de vincristina contra el logaritmo de la viabilidad.

Concentración (nM)	Log ₁₀ (% viabilidad)
0	1.991226076
0.5	1.963787827
1	1.949390007
1.5	1.934498451
2	1.875061263
3	1.785329835
5	1.716003344
7	1.69019608
10	1.505149978

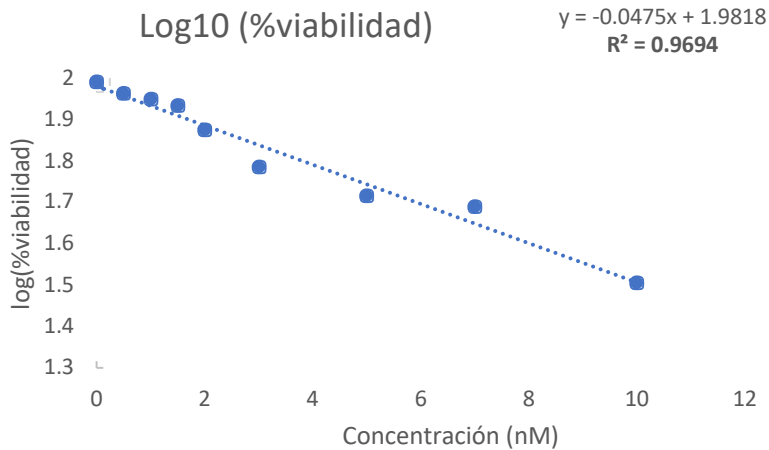


Figura 2. Gráfica con la viabilidad transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal.

Para poder determinar la IC_{50} los datos de % de viabilidad se transformaron a logaritmo base 10 (Tabla 4) (con lo que se obtuvo el mejor coeficiente de correlación) y se graficaron los datos y con la regresión lineal se calculó la IC_{50} (Figura 2), obteniendo así una concentración inhibitoria 50 a 24 horas de vincristina sobre la línea celular CCRF-SB de 6 nM.

5.1.1 Cálculo de la IC_{50}

Para calcular la IC_{50} se recurrió a la ecuación de la recta ($y=mx+b$), para lo cual, los datos de ordenada al origen (b) y pendiente (m) se obtuvieron de la regresión lineal de los datos de viabilidad transformados a logaritmo (Tabla 4, Figura 2)

Regresión lineal: Pendiente = -0.0475 1/nM **Ordenada al origen** = 1.9818

$$IC_{50} = \frac{\text{Log}_{10}(50\%) - 1.9818}{-0.0475 \text{ 1/nM}} = 5.95 \text{ nM} = \mathbf{6 \text{ nM}}$$

Por lo tanto, la concentración de vincristina a la que la línea celular CCRF-SB donde la población disminuye un 50% tras una exposición de 24 horas es de 6 nM.

5.2 Efectividad de los lavados de células

Los resultados de las viabilidades antes y después de los lavados se registraron en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de los lavados de células donde se observa la mejora en la viabilidad

Réplica	Viabilidad inicial	Viabilidad a las 24 horas de exposición	Viabilidad después de los lavados
1	90%	60%	83%
2		63%	76%
	Promedio	62%	80%

Con los datos se puede observar que la viabilidad mejoró en un promedio de 18%, lo que nos habla de la efectividad de este proceso para eliminar células muertas de las muestras. Con este control nos aseguramos de que las células usadas para nuestros análisis proteómicos son en su gran mayoría células viables.

5.3 Estándar de HeLa

El estándar de HeLa tras ser analizado en el equipo (cromatogramas en ANEXO I) y procesados los resultados en los programas de *DataAnalysis* y *ProteinScape*, se observó un número diferente de proteínas en cada inyección (Tabla 6), los números son similares y gran parte de las proteínas identificadas son compartidas entre las inyecciones como se observa en el diagrama de Venn (Figura 3) y tras el análisis con *ProteinExtractor*.

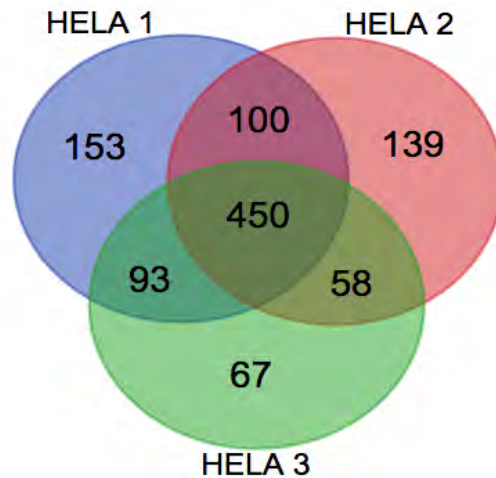


Figura 3. Diagrama de Venn de las tres inyecciones del estándar donde se puede observar los diferentes números de proteínas obtenidas y como se comparten.

Tabla 6. Número de proteínas encontradas en los estándares de HeLa.

# de Inyección	Número de proteínas encontradas	Número total de elementos	Protein de Extractor
1	796	1060	978
2	747		
3	668		

El número total de elementos corresponde a todas las proteínas identificadas en las tres inyecciones sin considerar redundancias.

Por estos resultados se considera que: a) De una mezcla compleja de proteínas (extracto de HeLa) el equipo, métodos y los programas utilizados son capaces de detectar hasta 1000 proteínas. b) Las inyecciones y análisis de una misma muestra nos otorgan resultados similares, tanto en número de proteínas identificadas como

identificación de las mismas proteínas. Por lo que la metodología usada en el equipo tiene repetibilidad.

5.4 Extracción y análisis por HPLC-MS del proteoma total de las células CCRF-SB

El proteoma se obtuvo de los cultivos celulares en dos réplicas biológicas independientes, donde, en cada una, se tuvo una caja control (tres millones de células sin fármaco) y 2 cajas de exposición a vincristina (tres millones de células cada caja, expuestas a 6 nM de vincristina durante 24 horas).

Tabla 7. Resultados generales de la extracción del proteoma total de las células control y de las expuestas a vincristina en las dos réplicas biológicas.

Muestra	Viab. a las 24 horas	Número de células a las 24 horas	Proteína obtenida	Proteínas encontradas (Protein Extractor)
<i>Réplica 1</i>				
Control	90%	4 700 000	31.2 µg	821
VCN 1	56%	1 900 000	14.6 µg	657
VCN 2	50%	1 900 000	13.5 µg	
<i>Réplica 2</i>				
Control	94%	7 520 000	54.03 µg	954
VCN 1	60%	1 400 000	11.3 µg	876
VCN 2	47%	800 000	8.0 µg	

Para un mejor análisis en el espectrómetro de masas los duplicados expuestos a vincristina en cada réplica se juntaron en un solo vial antes de ser inyectados al equipo, esto debido a la baja cantidad de proteína obtenidas.

En la Tabla 7 se resumen los resultados de la extracción del proteoma y de la posterior identificación de proteínas en cada una de las muestras (la identificación de las proteínas en cada una de las muestras se

especifica más adelante). En el ANEXO II se encuentran disponibles los cromatogramas obtenidos de las muestras.

5.5 Análisis bio-informático

Los datos obtenidos en el espectrómetro de masas se analizaron con los programas (*DataAnalysis* y *ProteinScope*) para identificar las proteínas encontradas en cada una de las muestras. Posteriormente estos resultados se procesaron con el análisis de *ProteinExtractor* con lo que se juntaron en un solo análisis las tres inyecciones de cada muestra. Los resultados de las proteínas encontradas de cada muestra se ven en la Tabla 8. En cada muestra observamos el número de inyección, el número de proteínas encontradas individualmente y el número total de proteínas (sin proteínas redundantes) así como el número de proteínas halladas con *ProteinExtractor*. También se presentan los diagramas de Venn (Figura 4) de cada muestra donde podemos ver el número de proteínas compartidas entre las inyecciones.

Tabla 8. Resumen del número de proteínas encontradas en cada muestra de las dos réplicas.

Muestra	# de inyección	# de proteínas encontradas	# total de proteínas	<i>Protein Extractor</i>
<i>Réplica 1</i>				
<i>Control</i>	1	437	502	821
	2	299		
	3	340		
<i>Exposición a vincristina</i>	1	323	408	657
	2	158		
	3	330		
<i>Réplica 2</i>				
<i>Control</i>	1	521	630	954
	2	386		
	3	465		
<i>Exposición a vincristina</i>	1	324	542	876
	2	300		
	3	475		

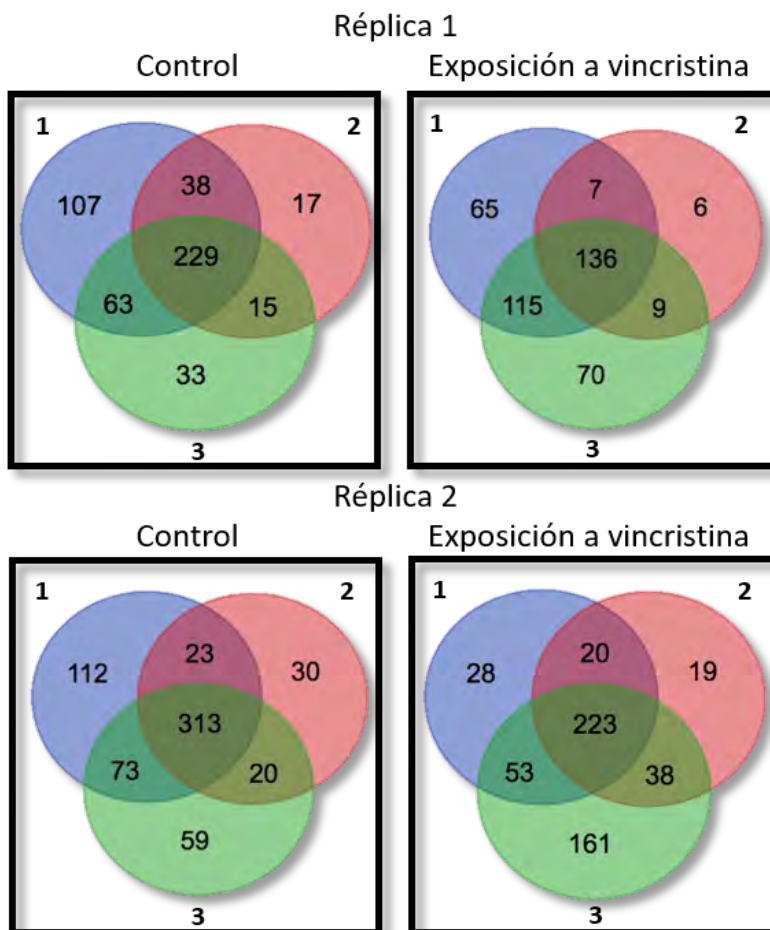


Figura 4. Diagramas de Venn de cada una de las muestras. Cada círculo representa una inyección y las proteínas compartidas que hay entre cada una de ellas en las muestras.

En base a estos resultados podemos ver que entre cada inyección obtenemos un número distinto de proteínas halladas, pero al analizar los diagramas de Venn nos damos cuenta de que en todas las muestras hay un mayor porcentaje de proteínas que se concentran entre los grupos compartidos entre dos o tres inyecciones, siendo en el control un porcentaje del 69% y en las expuestas a vincristina de 65% en la réplica 1 y de 68% en el control y de 62% en las expuestas a vincristina de la réplica 2. Esto nos dice que, el sistema mostró una variabilidad más alta

de lo esperado entre réplicas analíticas. A pesar de ello, las identificaciones de proteínas son confiables ya que se usaron filtros muy estrictos: el análisis por *ProteinExtractor* usó un filtro de 1% de tasas de identificación falsa (FDR), y los comandos *Peptide Decoy* (Mascot) y *percolator*, los cuales aseguran que solo los péptidos con muy alta probabilidad de ser correctamente identificados sean incluidos en la lista de resultados.

Las funciones de las proteínas obtenidas en cada réplica, tanto en las células control como en las células expuestas a 6 nM de vincristina durante 24 horas, deben ser analizadas para identificar las proteínas que nos guíen hacia aquellos procesos relacionados con la resistencia a la vincristina. Debido a la gran cantidad de proteínas obtenidas en las muestras es necesario aplicar un análisis que nos permita disminuir el número de proteínas para facilitar su análisis individual, pero conservando las proteínas clave. Para esto se comenzó realizando los diagramas de Venn (Figura 5), en donde por réplica se compararon todas las proteínas encontradas en las células control (CT) contra las proteínas encontradas en las células expuestas al fármaco (VCN), con esto se logra separar aquellas proteínas que son comunes entre ambos grupos y aquellas que son exclusivas a cada uno. En nuestro caso, el análisis se centrará en aquellas proteínas que se encuentran exclusivamente en las células expuestas al fármaco, ya que es aquí donde se espera encontrar proteínas relacionadas con la respuesta a la tolerancia al fármaco. Para llevar a cabo el análisis también se utilizaron las proteínas compartidas entre ambos grupos, las cuales representarían aquellas proteínas que se están sobre expresando tanto en presencia como ausencia del fármaco, por lo que servirán como referencia de un funcionamiento celular normal.

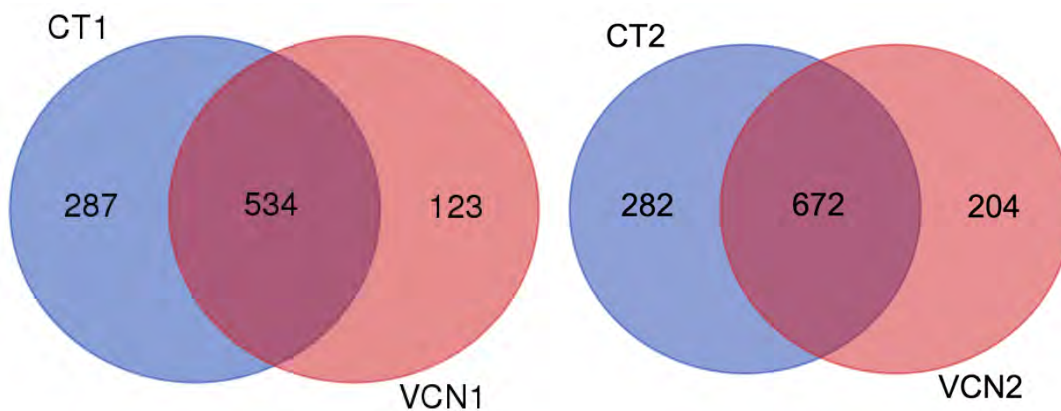


Figura 5. Diagrama de Venn comparando el número de proteínas encontradas en las células control (CT) y las células expuestas a 6 nM de vincristina (VCN) en la réplica 1 (CT1 y VCN1) y 2 (CT2 y VCN2).

Con estos diagramas podemos destacar que en ambas réplicas un mayor porcentaje de las proteínas se concentra en las compartidas entre los controles y las provenientes de células expuestas al fármaco, mientras que aquellas que son exclusivas del grupo VCN presentan un menor porcentaje, lo que nos habla de que está presente la activación de mecanismos en la presencia del fármaco. Nuestro enfoque en el análisis está basado en la idea de que aquellas proteínas que se encuentran exclusivamente en VCN corresponden a mecanismos activados por las células ante la presencia del fármaco, por lo que podría contener mecanismos que estén involucrados en el proceso de resistencia a la vincristina. Para poder resaltar estos mecanismos de resistencia necesitaremos un grupo de proteínas que nos permita tener mecanismos celulares que se están llevando a cabo de manera intrínseca en la célula, esto es con o sin la vincristina presente, por lo que las proteínas que en el diagrama de Venn se muestran compartidas entre CT y VCN serán tomadas como las proteínas que forman parte de

estos mecanismos intrínsecos de las células, ya que se expresaron tanto en presencia como en ausencia del fármaco. También es importante destacar que a pesar de que una célula puede contener más de 5 mil proteínas en un estado normal y que en nuestras extracciones de proteínas solo se detectaron alrededor de 800 por muestra, siguen siendo detecciones importantes debido a que el equipo va a detectar principalmente aquellas proteínas que se encuentren en mayor abundancia, por lo que si un mecanismo se está activando debido a la presencia del fármaco la detección de las proteínas involucradas nos habla de que dicho mecanismo fue activado fuertemente en la célula a tal grado que abundó más que otras proteínas en los mecanismos normales de la célula.

Como paso intermedio y para facilitar el análisis es necesario cambiar el nombre de las proteínas a un código identificador que nos ayuda a tener un mejor manejo de los datos, para lo cual ingresamos al sitio de UniProt y en la sección *Retrieve/ID mapping* se ingresaron las listas de proteínas y en las opciones se seleccionó *From UniProtKB AC/ID to UniProtKB*, con esto el sitio nos dará una hoja de cálculo con las proteínas ingresadas junto con el código identificador. Para cada una de las dos réplicas tanto las listas de proteínas exclusivas de VCN, como las proteínas compartidas entre VCN y CT se llevaron a la base de datos DAVID para continuar con el análisis. Se ingresó al sitio y en la herramienta *Functional Annotation*, se ingresaron las listas de proteínas (cada una por separado) y se mandó el análisis. Una vez terminado el análisis la base de datos nos organiza las categorías funcionales encontradas en una hoja de cálculo. En estos resultados la base de datos clasificó las proteínas en distintas categorías funcionales, correspondientes a mecanismos y procesos celulares con lo que se obtuvieron aquellas que se encuentran sobre expresadas en cada una de las listas que ingresamos. En este punto obtuvimos en la réplica 1 un

total de 185 categorías funcionales en las proteínas exclusivas a VCN y 982 categorías en las proteínas compartidas entre CT y VCN, mientras que en la réplica 2 obtuvimos 302 y 1070 categorías respectivamente (datos no mostrados). Para reducir el número de categorías obtenidas en cada lista y aumentar la confianza se depuraron las categorías funcionales que se obtuvieron en base a un valor de p de 0.01. Con esta reducción de datos en la primera réplica quedaron 535 categorías en las proteínas compartidas entre CT y VCN (cat compart1), y 73 categorías en las proteínas exclusivas de VCN (cat VCN) y en la segunda réplica se encontraron 581 y 93 categorías respectivamente. Estas últimas categorías que cumplieron con el valor de p se compararon de nueva cuenta en diagramas de Venn (Figura 6) en donde en cada réplica se compararon las categorías de las proteínas exclusivas con las categorías compartidas.

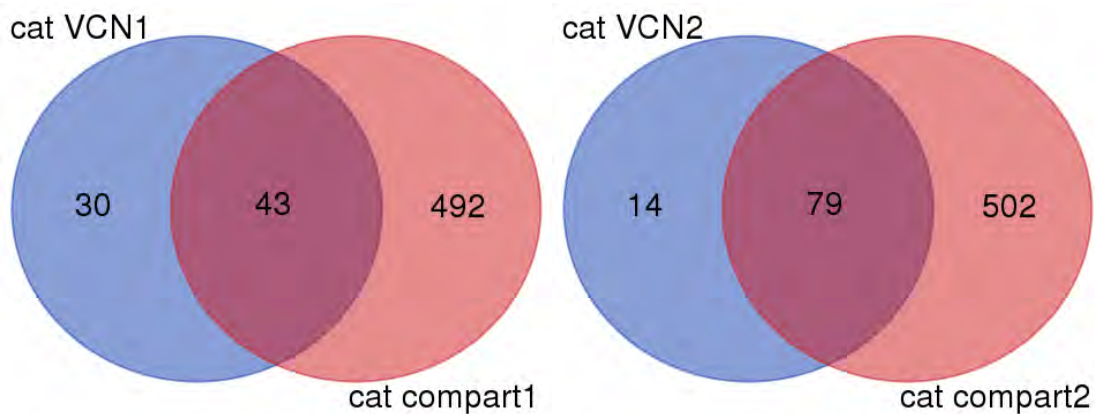


Figura 6. Diagramas de Venn de las categorías encontradas en las proteínas compartidas (cat compart) y las exclusivas (cat VCN) de ambas réplicas.

Se consideró entonces que aquellas categorías encontradas en el traslape y en las exclusivas de las categorías compartidas son funciones celulares que se están sobre expresando, pero no es debido a la

vincristina ya que se encontraron tanto en células expuestas como no expuestas, mientras que las categorías encontradas en las exclusivas de VCN son debido a la presencia del fármaco, por lo que nos centraremos en estas últimas. Con los diagramas de Venn (Figura 6) podemos ver que obtuvimos en la primer réplica 30 categorías funcionales exclusivas en las células expuestas a vincristina y 14 categorías en la segunda réplica. Cada una de estas categorías tiene asociado un determinado número de proteínas, las cuales pueden ser redundantes entre algunas categorías (una proteína puede estar ubicada en más de una categoría, así como dos o más categorías pueden contener proteínas similares), por lo que es posible agrupar varias de las categorías en una más general que nos dé una idea más clara de a que función o funciones celulares están asociadas las proteínas incluidas.

En la Tabla 9 podemos observar que en la réplica 1 se encontraron un total de 54 proteínas distribuidas entre las 30 categorías sobrerrepresentadas, las cuales se pudieron agrupar en categorías más generales incluyendo la reparación de ADN, tráfico vesicular, metabolismo mitocondrial, β -oxidación y señalización por calcio, por otro lado, en la réplica 2 se encontraron 80 proteínas distribuidas en 14 categorías, donde estas se agruparon en procesos de óxido-reducción, tráfico vesicular, metabolismo mitocondrial, β -oxidación, reparación de ADN y señalización por calcio. En ambas réplicas también se encontraron proteínas que no pudieron ser incluidas dentro de las categorías mencionadas por lo que se nombraron como "otros". En la Tabla 9 se resumen las categorías encontradas, así como en la Figura 7 se muestran los porcentajes de cada categoría de las dos réplicas. Al comparar ambas réplicas podemos observar claramente que se comparten varias de estas categorías, lo que nos asegura que en ambas se están activando mecanismos muy similares resultado de la exposición a vincristina. En específico, las categorías compartidas son la reparación

de ADN, tráfico vesicular, metabolismo mitocondrial, β -oxidación y la señalización por calcio, siendo estos los procesos en los que nos enfocaremos.

Tabla 9. Número de proteínas incluidas en las categorías en cada una de las dos réplicas.

Réplica 1	Número de proteínas	%	Réplica 2	Número de proteínas	%
Reparación de ADN	18	33	Proceso de óxido reducción	15	19
Tráfico vesicular	8	15	Tráfico vesicular	14	18
Metabolismo mitocondrial	7	13	Metabolismo mitocondrial	9	11
β -oxidación	6	11	β -oxidación	4	5
Señalización por calcio	3	6	Reparación de ADN	4	5
Otros	12	22	Señalización por calcio	2	3
Total	54	100	Otros	32	40
			Total	80	100

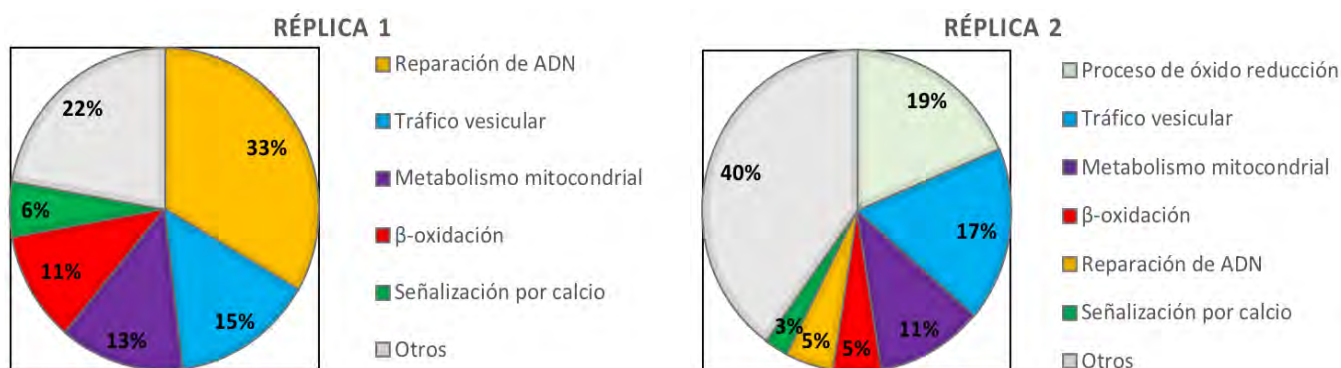


Figura 7. Gráficas de pastel donde se observan los porcentajes de las distintas categorías obtenidas en ambas réplicas.

Dentro de la categoría nombrada como "Otros" podemos encontrar proteínas relacionadas con diversos procesos celulares, en el caso de la réplica 1, tenemos procesos como degradación de amino ácidos, tumorigénesis, motilidad celular, regulación del crecimiento celular,

transporte nuclear y procesos de oxido reducción. Mientras que en la segunda réplica encontramos metabolismo de amino ácidos, respuesta a la falta de nutrientes, plegamiento de proteínas, metabolismo de ubiquitina, metilación de ADN, respuesta inmunológica, transporte nuclear, "splicing", entre otros.

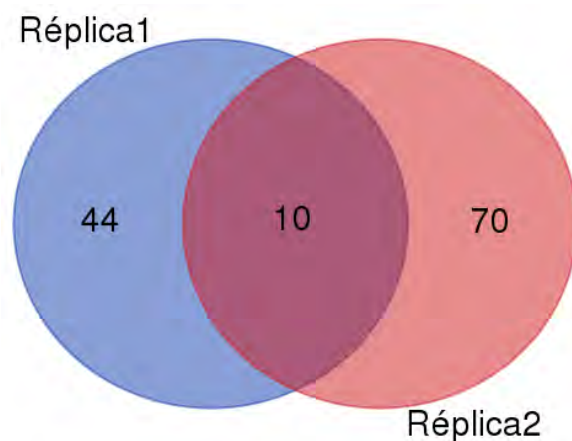


Figura 8. Diagrama de Venn con las proteínas compartidas en las categorías encontradas en las dos réplicas en presencia de vincristina.

Haciendo una comparación entre las proteínas encontradas hasta este punto en ambas réplicas mediante un diagrama de Venn (Figura 8) podemos encontrar que hay un total de 124 proteínas, donde 10 son proteínas compartidas, 44 exclusivas de la primera réplica y 70 en la segunda. Estas diez proteínas compartidas se especifica su nombre y función en la Tabla 10. Las 124 proteínas identificadas hasta este punto se encuentran disponibles en el ANEXO III.

Tabla 10. Descripción de las proteínas que fueron encontradas en ambas réplicas. La información de estas se obtuvo de la base de datos UniProt.

Nombre	Nombre del Gen	Localización	Descripción
3-hidroxi-isobutiril-CoA hidrolasa mitocondrial	HIBCH	Mitocondria	Relacionada con el catabolismo de valina. Hidroliza 3-hidroxi-isobutiril-CoA. También puede hidrolizar 3 hidroxipropanoil-CoA.
Deshidrogenasa mitocondrial específica de acil-CoA de cadena larga	ACADVL VLCAD	Mitocondria	Activo hacia ésteres de cadena larga y ácidos grasos de cadenas muy largas como el palmitoil-CoA y esteaoril-coA. Puede acomodar sustratos de cadenas de acilo tan largas como de 24 carbonos. Muestra poca actividad contra sustratos de menos de 12 carbonos.
Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial	SSBP1 SSBP	Mitocondria	Proteína de unión preferente y cooperativa al ADN de cadena sencilla. Involucrado en la replicación de DNA mitocondrial.
Proteína de reparación de desemparejamiento (mismatch) del ADN	MSH6 GTBP	Núcleo	Componente del sistema de reparación de DNA post replicativo (MMR). Se heterodimeriza con MSH2 para formar MutS alfa, el cual se une a los desemparejamientos del DNA provocando el inicio de la reparación del DNA.
Factor de replicación C subunidad 3	RFC3	Núcleo	La elongación de los moldes primarios de DNA por la polimerasa delta y épsilon requiere la acción de las proteínas accesorias que proliferan el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y el activador 1 (RFC, clamp loader).

Factor de replicación C subunidad 4	RFC4	Núcleo	La elongación de los moldes primarios de DNA por la polimerasa delta y épsilon requiere la acción de las proteínas accesorias que proliferan PCNA y el activador 1 (RFC).
Subunidad 5 del subcomplejo 1 α de NADH deshidrogenasa (Ubiquinona)	NDUFA5	Mitocondria	Es una subunidad accesorias de la membrana mitocondrial y funciona en la transferencia de electrones del NADH a la cadena respiratoria. El aceptor inmediato parece ser ubiquinona.
Proteína relacionada a Ras Rab-21	RAB21 KIAA0118	Endosoma, aparato de golgi, retículo endoplásmico	Regula la internalización y reciclaje de integrinas, pero no tiene influencia en general en el tráfico de receptores endosomales translocados. Como resultado puede que regule la adhesión celular y migración. Durante la mitosis de células adherentes, controla el tráfico endosomal de integrinas que son requeridas para completar correctamente la citocinesis.
Transmembrana emp24, dominio que contiene la proteína 10	TMED10 TMP21	Membrana plasmática, aparato de golgi, retículo endoplásmico	Proteína involucrada en el tráfico vesicular de proteínas. Actúa como receptor acarreador en el lado luminal para la incorporación de moléculas acarreadoras secretoras en vesículas transportadoras está involucrada en la formación de la cubierta de vesículas en lado citoplasmático.
Proteína relacionada a Ras Rab-1B	RAB1B	Endosoma, aparato de golgi, retículo endoplásmico	GTPasa pequeña Rab, regulador clave del tráfico membranar intracelular, desde la formación de vesículas de transporte a su fusión con las membranas.

Para propósitos del análisis nos enfocaremos en estas 10 proteínas y las categorías compartidas entre ambas réplicas; mostraremos la

información y estudios que hay acerca de estas proteínas y de las categorías funcionales acerca de sus efectos en la resistencia al tratamiento en el cáncer y en los casos particulares donde los haya, en la LLA.

5.5.1 SSBP1. Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial

SSBP1 es una proteína mitocondrial expresada constitutivamente (*housekeeping*), encargada principalmente de mantener la estabilidad del genoma mitocondrial y cambios en el metabolismo, se une preferencialmente a ADN de cadena sencilla²³⁻²⁵.

Distintos estudios han llevado a la idea de que esta proteína está asociada en la iniciación y progresión de tumores y respuesta de la célula al daño, esto al regular la función mitocondrial y el metabolismo celular²⁶. En Arakaki et al. (2006)²⁵ se observó que la inhibición de esta proteína incrementó la apoptosis celular inducida por etopósido en células de ratón, mientras que en otro estudio se demostró que al bloquear la expresión de SSBP1 se incrementó considerablemente la sensibilidad a la quimioterapia en cáncer cervical²⁷. En estudios recientes se encontró el potencial que tiene SSBP1 para funcionar como un marcador de pronóstico en cáncer gástrico²⁶, aunque se menciona que requiere de la validación con más estudios; igualmente se ha identificado a SSBP1 como posible biomarcador en proteomas mitocondriales de pacientes con carcinoma de hígado analizados por electroforesis 2D acoplado con MALDI-TOF/TOF, encontrándose a SSBP1 dentro de un grupo de proteínas sobreexpresadas, dando lugar a que funciones como la traducción y el plegamiento de proteínas se ven incrementados en la mitocondria²⁸; también hay que resaltar que en este estudio se encontró a la proteína PPIA (peptidilpropil isomerasa A), dentro de las sobreexpresadas en presencia de vincristina, una proteína que tiene funciones en el plegamiento de proteínas, se menciona esto ya

que en la segunda réplica de nuestro experimento se encontró a la proteína PPID (peptidilpropil isomerasa D), la cual tiene funciones muy similares a PPIA. En otro estudio en cáncer pulmonar de células no pequeñas se analizó el efecto de disminuir la expresión de SSBP1 con el objetivo de disminuir la biogénesis y bioenergética de la mitocondria en estas células y así evitar su adaptación a cambios durante la radioterapia. Al disminuir la expresión se disminuyó el número de copias de ADN mitocondrial y de la producción de ATP, llevando también la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que la terapia se volvió más efectiva al incrementar la apoptosis²⁹.

5.5.2 MSH6 (GTBP). Proteína de reparación de desemparejamientos del ADN

MSH6 es un componente del sistema de reparación de desemparejamientos del ADN post replicativo (MMR, del inglés mismatch repair). Forma heterodímeros con MSH2 para formar MutS alfa, el cual se une a los desemparejamientos del ADN iniciando la reparación, este heterodímero es capaz de reconocer desemparejamientos de sustitución base-base e inserción/eliminación de una base^{23, 30}. Las mutaciones en MSH6 son consideradas como participantes en la reaparición del glioma, resistencia adquirida a agentes alquilantes e inestabilidad del genoma y se ha encontrado que las mutaciones actúan como catalíticos de la progresión de los tumores³⁰. En un grupo de pacientes con osteosarcoma que no responden a la quimioterapia, se encontró que el tiempo de supervivencia se ve negativamente influenciado por la expresión de MSH6 y MSH2/6³¹. Por otro lado la expresión de MSH2 en células de osteosarcoma se ha relacionado con una potencial participación en la resistencia a quimioterapéuticos³². En otro estudio en muestras de médula ósea se reportaron varias mutaciones somáticas en reguladores

epigenéticos que son enriquecidos en recaídas en linfocitos B de LLA, entre los que se encuentra la proteína MSH6³³, pero aquí se sugiere que las mutaciones causaron la pérdida de función en la reparación del ADN, teniendo como dos posibles mecanismos, uno en el que la pérdida en la reparación llevó a un aumento en la diversidad mutacional y por lo tanto llevo la resistencia y el otro es que al no repararse correctamente, los mecanismos que activan la apoptosis no se encuentran disponibles por lo que hay supervivencia celular³³. Cabe mencionar que dicha resistencia en estas células B en este estudio fue mediante los fármacos 6-mercaptopurina y 6-tioguanina, los cuales actúan como antagonistas de la purina, provocando la sustitución en el ADN, provocando subsecuentemente la detención del ciclo celular.

5.5.3 RFC3 y RFC4. Factor de replicación C subunidades 3 y 4

El factor de replicación C (RFC) comprende una familia de cinco subunidades (RFC1-5) y estos tienen un papel importante en la replicación y reparación del ADN³⁴. Recientemente se ha demostrado que una activación anormal de RFC está asociada en la proliferación de células cancerígenas, siendo RFC3 la subunidad la que se ha asociado mayoritariamente. En un estudio en leucemia mieloide aguda, células progenitoras de pacientes se cultivaron *in vitro* y se observó que después de 35 días de cultivo, las células de pacientes mostraron una alteración en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y con la replicación de ADN, entre los que se encontraba RFC3³⁵. En un experimento en He et al. (2017)³⁴ se demostró que al inhibir la expresión de RFC3 se atenuó significativamente la metástasis y progresión del cáncer de mama triple negativo (CMTN, subtipo de cáncer de mama) en células *in vitro* por lo que al bloquear la expresión de RFC3 se logró atenuar la proliferación celular, migración e invasión. *In vivo* se observó que al silenciar la expresión de este gen en ratones

disminuye el volumen y peso de tumores y alivia la metástasis. Se consideró entonces que la sobreexpresión de RFC3 promueve la progresión del CMTN mediante la vía de señalización de transición mesenquimal-epitelial (TME) un proceso significativo que ha sido caracterizado en células que pierden la adhesión celular y por lo tanto ganan movilidad. En Chae et al. (2015)³⁶, en células de leucemia mieloide crónica, con la expresión exógena de RFC3 se logró la progresión de la transición entre las fases G1/S del ciclo celular al haber un bloqueo en la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB), la cual es un factor transcripcional sobreexpresado en mielopoiesis normal y neoplásico que regula el ciclo celular, por lo que RFC3 se considera que participa en mielopoiesis neoplásica al promover el ciclo celular y que su expresión está regulada por CREB³⁶. Mientras que en otro estudio se observó que RFC3 estaba siendo sobreexpresado en tejidos de carcinoma hepatocelular (HCC) y líneas celulares del mismo, y que al verse inhibida su regulación provocó la supresión de la viabilidad y proliferación de células de HCC esto debido a que el bloqueo de RFC3 provocó el arresto del ciclo celular en la fase S³⁷. En Shen et al. (2014)³⁸ se examinaron tejidos de cáncer de ovario y se observó que RFC3 tenía una expresión mayor que en tejidos sanos y fue observado también en carcinomas invasivos, posteriormente se encontró sobreexpresado en células de cáncer de ovario y el bloqueo provocó la caída de la viabilidad celular y proliferación³⁹. En Yao et al. (2015)³⁷ se encontró que la unión preferencial de RFC3 al PCNA forma un complejo que atenúa la expresión de RFC3 lo que inhibe la proliferación de células cancerígenas, por lo que podría ser un blanco para ser usado como tratamiento. En adenocarcinoma esofágico se encontró a RFC3 como oncogen candidato, y debido a su prevalencia en otros tipos de cáncer puede servir como un marcador de pronóstico⁴⁰.

En células de carcinoma hepatocelular se encontró que la inhibición de RFC4 se correlacionaba con una disminución en la proliferación celular, incremento en la apoptosis y una sensibilización de las células a agentes de daño al DNA como la doxorubicina y camptotecina⁴¹. En Huang et al. (2012)⁴² se encontró un grupo de 7 genes para predecir las recaídas en pacientes, entre los que se encuentra RFC4; estos genes se piensa tendrán implicaciones en el pronóstico o en la terapia en pacientes con cáncer cervical. En otro estudio en cáncer colorectal, se vio que RFC4 se encuentra sobreexpresado frecuentemente en muestras de este cáncer y se asoció con la progresión de tumores y un peor pronóstico de supervivencia⁴³.

5.5.4 NDUFA5. Subunidad 5 del subcomplejo 1 α de NADH deshidrogenasa (Ubiquinona)

NDUFA5 es una subunidad accesoria de la deshidrogenasa de NADH de la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial (Complejo I) y se cree que no está involucrada en la catálisis. Este complejo funciona en la transferencia de electrones de NADH a la cadena respiratoria²³. Se tiene reportado que los genes de la familia NDUFA juegan un papel importante en la vía de ensamblaje y función de la NADH deshidrogenasa en mamíferos⁴⁴ y por su parte NDUFA5 se encuentra involucrado en la construcción del potencial electroquímico requerido para la producción de ATP⁴⁵. Se ha encontrado evidencia de que la sobreexpresión de NDUFA5 es importante en carcinogénesis cervical derivado del virus del papiloma humano, al adquirir ventaja en el crecimiento y resistencia contra señales apoptóticas⁴⁶.

5.5.5 RAB1B y RAB21. Proteína relacionada a Ras Rab-1B y Rab-21

Este grupo de proteínas son reguladores esenciales del tráfico membranal, desde la formación de vesículas a su fusión con las

membranas. RAB1B regula el transporte vesicular entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi²³. RAB21 regula la internalización y reciclaje de integrinas, un paso importante para completar exitosamente la citocinesis. No tiene efectos generales en el tráfico de receptores translocados de endosomas y se piensa que regula la adhesión y migración celular²³. En un estudio realizado en tejidos de cáncer de hígado se hallaron proteínas sobreexpresadas que pertenecen a pequeñas GTPasas (incluyendo RAB1B), esto se piensa está relacionado con las principales funciones de las células hepáticas, la digestión y la detoxificación, donde un alto metabolismo y tráfico vesicular son primordiales⁴⁷. La sobreexpresión de RAB1B en tejidos y líneas celulares de cáncer colorectal se considera como un mal pronóstico para los pacientes, por lo que es un potencial biomarcador⁴⁸, pero aún queda en duda el mecanismo por el cual actúa en este tipo de cáncer.

Se identificó a RAB21 junto con otras proteínas como características en muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama con resistencia a tamoxifeno⁴⁹. La sobreexpresión de RAB21 estimula la migración celular⁵⁰. Esta proteína es requerida para los fibroblastos asociados a carcinoma para promover la invasión, así como también promueve la acumulación de la integrina $\alpha 5$ en la membrana plasmática llevando a un remodelamiento de la matriz subsecuente⁵¹. El tráfico de integrinas por la regulación de RAB21 es importante para la división celular normal y principalmente para la citocinesis y los defectos contribuyen a la multinucleación e inestabilidad genómica, que son sellos distintivos del cáncer^{50, 52}. En el estudio sobre miR-200b, un supresor de tumores, como posible factor pronostico en glioma, se encontró que aquellos pacientes con una sobreexpresión de cuatro RAB (21, 23, 18 y 3B), que son blancos para miR-200b, tienen el peor pronóstico y que caso contrario con una baja expresión mejora su pronóstico⁵³. Así también se

encontró en cáncer de mama la asociación de RAB21 con miR-200b, y se encontró evidencia de que al inhibir la expresión de RAB21 junto con otras proteínas de esta familia junto con la sobreexpresión de miR-200b inhibió la proliferación e invasión in vitro del cáncer de mama⁵⁴.

5.5.6 TMED10 (TMP21). Transmembrana emp24, dominio que contiene la proteína 10

TMED10 es una proteína transmembranal tipo 1 localizada en la membrana plasmática, membranas microsomales y membranas de gránulos zimógenos, está involucrada en el tráfico vesicular y tiene funciones en la vía secretoria temprana y se piensa que actúa como receptor acarreador en el lado luminal para la incorporación de moléculas en vesículas transportadoras así como en la formación de la capa vesicular en el citoplasma^{23, 55}. Se ha encontrado la participación de TMED10 en limitar la actividad de la proteína cinasa C (PKC) al asociarse con esta en la línea celular LNCaP de cáncer de próstata provocando una retención del proceso apoptótico^{56, 57}. En un experimento Saran et al. (2015)⁵⁸ se encontró un aumento en los niveles de TMED10 y de THOC5 (proteína que encontramos en la segunda réplica) en células de cáncer hepatocelular, con lo que se llegó a suponer que estas proteínas sean nuevos biomarcadores para este tipo de cáncer. En la línea celular TPC1 de cáncer de tiroides papilar, se encontró que TMED10 modula el crecimiento celular al inducir la autofagia⁵⁹.

No se encontró información relevante sobre las proteínas HIBCH y ACADVL en relación con el cáncer y procesos de resistencia. HIBCH, 3-hidroxi-isobutiril-CoA hidrolasa mitocondrial; Hidroliza 3-hidroxi-isobutiril-CoA a un catabolito que está involucrado en el catabolismo de valina dentro de la degradación de aminoácidos²³.

ACADVL (VLCAD). Deshidrogenasa mitocondrial específica de acil-CoA de cadena larga; Es una enzima activa con ésteres de ácidos grasos de cadenas largas y muy largas como palmitoil-CoA, misritoil-CoA y estearoil-CoA. Puede aceptar sustratos de hasta 24 carbonos, pero presenta poca actividad frente a sustratos menores de 12²³.

5.5.7 Reparación de ADN

El daño al ADN es el principal blanco de muchas terapias contra el cáncer, por lo que la reparación del ADN representa un problema para la efectividad de las terapias, otros mecanismos asociados pueden incluir la detoxificación de los fármacos y respuestas al daño del ADN⁶⁰. La reparación de ADN se ha visto envuelta en procesos de resistencia a fármacos usados en la quimioterapia cuyo mecanismo de acción consiste en atacar al ADN, como el cisplatino, en el cual se han reportado mecanismos de resistencia que involucran la reparación del ADN en cáncer de pulmón⁶¹. Así mismo mutaciones en genes involucrados en la respuesta al daño del ADN (RDA) pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer⁶². La sobreexpresión de genes de RDA pueden proveer a las células de LMA un mecanismo de escape a la barrera anticancerígena del RDA e inducir quimioresistencia. Al alterar directamente las vías implicadas en la respuesta al daño del ADN los eventos oncogénicos iniciadores pueden inducir la acumulación de daño en el ADN y activar una barrera de respuesta al daño del ADN. Al hiperactivar las vías de RDA propensas a errores las células leucémicas intentarán lidiar con la creciente acumulación de daño en el ADN, lo que puede llevar a aberraciones genéticas; Por otro lado, la respuesta aberrante al daño del ADN también puede inducir un fenotipo quimioresistente como resultado de una mayor capacidad para reparar las lesiones por daños en el ADN⁶². Se ha encontrado en LMA que mecanismos que aumentan la reparación del ADN como la expresión de

INPP4B (inositol polifosfato 4 fosfato II) está asociado con la quimio y radioresistencia en las células⁶³. La sobreexpresión de FA/BRCA, proteínas involucradas en la reparación de ADN, es la causante de resistencia en células leucémicas resistentes a adriamicina, un fármaco intercalante del ADN y que la disrupción de esta vía lleva a la resensibilización ante el fármaco⁶⁴. En el tratamiento de leucemia linfoblástica crónica con agentes alquilantes se observa una baja tasa de remisión completa y no mejora la supervivencia en general, esto se ha explicado por la capacidad de la célula de tener mecanismos de reparación del ADN^{65, 66}. Probablemente la representación de mecanismos de reparación de ADN en las células expuestas a vincristina, estén relacionados con la adaptación y tolerancia a este fármaco como parte de una respuesta general ante una agresión por un xenobiótico o por el efecto de la vincristina sobre los microtúbulos asociados a cromosomas lo que puede aumentar la frecuencia de rupturas de las cadenas de ADN.

5.5.8 β -oxidación

La mayor parte de la energía mitocondrial es generada vía oxidación de acetil coenzima A proveniente ya sea de la glucosa o de ácidos grasos cuando la glucosa está limitada⁶⁷. En general, en el cáncer una de las principales características es la rápida proliferación de las células, para lo cual se requiere una gran cantidad de energía y nutrientes. Se ha estimado que, en pacientes con obesidad, los adipocitos, que guardan energía en forma de triglicéridos, proveen de ácidos grasos libres a las células cancerígenas, dando una facilidad para la demanda de esta gran cantidad de energía⁶⁸.

Se ha asociado al cáncer con alteraciones metabólicas de lípidos y se ha encontrado que la desregulación de enoil-coenzima hidrataza tiene papeles importantes en la ocurrencia de tumores, desarrollo, metástasis y resistencia a fármacos⁶⁹. La sintasa de ácidos grasos (FASN),

responsable para la síntesis de novo ha sido recientemente propuesta como un blanco terapéutico⁷⁰ en el tratamiento del cáncer. La sobreexpresión de FASN ha sido encontrada en varios tipos de cánceres humanos y que se piensa contribuye a un mal pronóstico y a la recurrencia de estos cánceres, además de haber sido asociado tanto en resistencia a la radiación intrínseca y adquirida. Se ha reportado que esta enzima tiene acciones en la regulación de expresión de genes como a los de proteínas pro apoptóticas y procesos celulares como la reparación de ADN, los que contribuyen a la resistencia a fármacos⁷¹. En cáncer de mama se encontró que FASN se encuentra sobreexpresada y que puede estar involucrado en un mecanismo de resistencia a fármacos y que puede usarse como blanco para la quimiosensibilización. También se sugirió que la expresión incrementada de FASN es una respuesta temprana de las líneas celulares ante los fármacos⁷². En líneas celulares de cáncer de mama se observó que la resistencia a la quimioterapia con paclitaxel fue superada al inhibir a FASN o la producción de ceramida⁷³. Se observó en células de leucemia promielocítica resistentes a antraciclinas un aumento en la oxidación de ácidos grasos lo que se supuso como un posible marcador para la detección de células resistentes al encontrarse una mayor concentración de intermediarios en este proceso⁷⁴. Se ha visto que en varios tipos de células cancerígenas se tienen gotas de lípidos, como una posible forma de guardar energía⁶⁸. También hay evidencia de que los adipocitos proveen de ácidos grasos libres como fuente de energía a las células leucémicas. En LLA se ha encontrado evidencia de que las células leucémicas estimulan la lipólisis y utilizan ácidos grasos para suplementar lipogénesis y proliferación⁷⁵. Se encontró a la proteína ACADL como sobreexpresada en cáncer de próstata, así mismo este cáncer está asociado con cambios en el metabolismo de ácidos grasos⁷⁶. Este metabolismo de ácidos grasos aumentado en cáncer de próstata aumenta subsecuentemente la

disponibilidad de acetil-CoA proveyendo de una importante fuente de energía para el crecimiento celular⁷⁷.

Probablemente en las células en presencia de vincristina, la demanda energética sea mayor que en ausencia del fármaco, debido a mecanismos de defensa como la expulsión de la vincristina por las bombas expulsoras de xenobióticos dependientes de ATP (p. ej. la glicoproteína P). Además, la inducción de mecanismos de reparación de ADN y de tráfico vesicular, pueden representar una demanda extra de energía metabólica.

5.5.9 Tráfico vesicular

Como ya vimos cuando describimos a las proteínas RAB1B y RAB21, el tráfico vesicular es un proceso que parece ser clave al momento de generar una defensa en contra de los fármacos en las células cancerígenas. Entre otros estudios relacionados con el tráfico vesícula se ha visto que procesos como la regulación del movimiento de ceramida mediada por vesículas dependientes de PI3K/Akt en el área de retículo endoplasmático-aparato de Golgi, resultó crucial para la coordinación la biosíntesis de esfingolípidos del complejo membranal con la proliferación y crecimiento celular⁷⁸. También se ha reportado que la inhibición de PI3K actúa junto con la quimioterapia o con ligandos inductores de muerte para activar la apoptosis en células de glioblastoma⁷⁹. La proteína ABCA3 está sobreexpresada en leucemia mieloblástica aguda en niños y adultos, y que puede tener un papel en la entrega de vesículas ácidas y puede que participe en el secuestro subcelular de fármacos lo que contribuye a la resistencia⁸⁰.

A través del tráfico vesicular se distribuyen proteínas a los diferentes compartimentos celulares. Las vesículas se mueven desde el retículo endoplásmico, hacia el aparato de Golgi y de ahí se dirigen hacia los diferentes organelos o hacia la membrana plasmática. También hay

transporte de vesículas en el sentido opuesto, en cualquier caso transportan proteínas en su lumen y las dirigen hacia su correcta localización intracelular. Así por ejemplo, las proteínas mitocondriales con encapsuladas en vesículas las cuales, en su superficie, contienen señales que las direccionan hacia las mitocondrias y que en su lumen contienen proteínas mitocondriales de reciente síntesis para mantener el funcionamiento mitocondrial, formar nuevas mitocondrias o reponer proteínas dañadas. Del mismo modo se envían proteínas hacia lisosomas, peroxisomas o a membrana plasmática. Además el tráfico vesicular forma parte de los procesos de endocitosis y exocitosis. Las vesículas se mueven por el citosol con ayuda de proteínas motor, las cuales con consumo de ATP y siguiendo estructuras del citoesqueleto, mueven a las vesículas que traen como carga. La vincristina, al alterar la dinámica de polimerización de la tubulina, es muy probable que afecte al citoesqueleto y de este modo al tráfico vesicular. La célula, al detectar dicha afectación probablemente induzca la formación y distribución de vesículas en un intento por satisfacer las necesidades de abastecimiento a los diferentes compartimientos celulares.

5.5.10 Metabolismo mitocondrial

Moléculas y vías asociadas a la mitocondria son blancos atractivos para superar la resistencia a inhibidores de la tirosin cinasa en leucemia mieloblástica crónica, esto debido a que en la mitocondria, esta enzima altera diversas vías reguladoras como el control de crecimiento o la apoptosis, lo que lleva a una mayor supervivencia de estas células⁸¹.

La mitocondria es la principal fuente de energía de la célula, y esto relacionado con el hecho de que en el cáncer las células muestran una mayor demanda de energía, la mitocondria sale a la luz como un sitio importante para llevar a cabo estudios de resistencia, así como nuevos tratamientos^{82, 83}. Así mismo, la mitocondria es un regulador importante

en la vía intrínseca de la apoptosis⁸⁴. El aumento en la glicólisis y la fosforilación oxidativa pueden darse como mecanismo adaptativo de resistencia al incrementar la producción de ATP⁸². En un experimento de análisis proteómico realizado en mamíferos de dos líneas celulares de cáncer de mama, donde se enfocó en identificar específicamente proteínas mitocondriales se pudieron identificar un grupo de proteínas sobreexpresadas, donde estas se encontraban relacionadas con β -oxidación, metabolismo de cetonas, biogénesis mitocondrial e inhibidores de la autofagia y mitofagia⁸⁵. Este último tipo de proteínas, del tipo antiapoptóticas, también fueron encontradas en células de cáncer de ovario multirresistentes a fármacos⁸⁶. Estos resultados dejan el camino abierto a futuros estudios enfocados en la mitocondria de células cancerígenas tanto para la búsqueda de nuevos tratamientos y para evitar o erradicar la resistencia.

Como se mencionó en el apartado de β -oxidación, las células tumorales tienen mayor demanda energética tanto por su tendencia a la división celular como por sus mecanismos de defensa ante quimioterapéuticos. Probablemente, para contender con la vincristina, las células leucémicas requieran más ATP para reparar el DNA, expulsar el fármaco o para mantener una mayor dinámica del citoesqueleto y del tráfico vesicular.

5.5.11 Señalización por calcio

En una línea celular de cáncer gástrico multi resistente a fármacos inducida por vincristina se observó la sobreexpresión de sorcina (una proteína de unión a calcio involucrada en mantener la homeostasis del calcio celular). La sobreexpresión de esta proteína está asociada con un mal pronóstico en muchos tipos de tumores celulares, así como en pacientes con leucemia. Se observó que la sobreexpresión de sorcina está asociada con una disminución en la acumulación intracelular de vincristina por lo que se estimó que ésta proteína estaría asociada

directa o indirectamente con la expulsión del fármaco de la célula^{69, 87}. Se sabe que transportadores transmembranales son regulados por señales intracelulares como cambios en la concentración de calcio libre citoplasmático⁸⁸. Se ha especulado también que el calcio iónico pueda tener un papel en la resistencia citotóxica a fármacos⁸⁹. Funcionalmente, la sorcina es una proteína de unión a calcio y esta puede tanto unir como secuestrar hasta 10% del calcio del citosol. Aunque se ha establecido que el calcio intracelular no tiene un papel principal en el transporte de fármacos y la concentración de calcio no tiene efecto en la acumulación de fármacos⁹⁰.

En varios estudios se ha encontrado que al bloquear canales de calcio tipo L se inhibe el crecimiento celular en cáncer y se incrementan los efectos pro apoptosis de fármacos como bortezomid en varios tumores malignos como linfoma de células de manto⁹¹. La transglutaminasa de tejido TG2 se ha asociado con la supervivencia de células cancerígenas y resistencia a fármacos⁹¹, así como también muestra efectos anti apoptóticos⁹² y se encontró que la inhibición de TG2 junto con bloqueadores de calcio se puede llegar a superar la resistencia a bortezomid en linfoma de células de manto⁹¹. El calcio tiene asociados mecanismos en la multiresistencia a fármacos en carcinoma hepatocelular, que involucran transición epitelio-mesénquimal y reparación de daño al ADN, las cuales son apoyadas por una acumulación del calcio libre intracelular⁹³. Se ha encontrado que la vía de señalización por ERK1/2 relacionada a calcio contribuye a la protección de las células de LLA ante la dexametasona al limitar la vía apoptótica mitocondrial⁹⁴.

La proteína de choque térmico mitocondrial 90 confiere resistencia a la muerte celular en cáncer al suprimir la respuesta al estrés inter-organelos iniciada por mitocondria y mediada por calcio, lo cual es posible al haber una coordinación entre las respuestas al estrés del

retículo endoplasmático y la mitocondria; La descoordinación de esto llega a ocurrir en células cancerígenas⁹⁵ lo que lleva a detener esta respuesta de muerte celular. Se encontró que la reducción del calcio intracelular mediante quelantes llevó a la resensibilización a ganitumab en células de cáncer de próstata al poder inhibir la progresión del ciclo celular, con lo que se sugirió un mecanismo de resistencia a la inhibición de IGF-1R que involucra los efectos de proliferación mediados por calcio⁹⁶.

6. Discusión de resultados

Con las 10 proteínas que encontramos en ambas réplicas podemos tener una visión de su participación en ayudar a la resistencia de las células CCRF-SB y así ayudar a su supervivencia. Tenemos que tener en claro que en nuestro experimento únicamente expusimos a la línea celular durante un periodo de 24 horas, lo cual resulta bastante corto como para que se desarrolle un mecanismo complejo o adaptado de supervivencia ante la acción citotóxica del fármaco, por lo que lo que esperamos observar en este experimento es una respuesta del tipo innata a la que tuvieron un acceso rápido las células leucémicas. Las proteínas identificadas pueden ser clasificadas de acuerdo con su función en aquellas asociadas con el tráfico vesicular (RAB21, RAB1B y TMED10), reparación y/o replicación del ADN (SSBP1, MSH6, RFC3 y RFC4), metabolismo y obtención de energía (HIBCH, ACADVL y NDUFA5). No es sorpresa que esta clasificación coincida con las categorías funcionales obtenidas de ambas réplicas (Figura 7) pero nos sirve para darnos cuenta de estos procesos celulares que están sobresaliendo en la supervivencia de las células.

De las 10 proteínas resalta que no se encontraron estudios relacionados con la resistencia en cáncer con las proteínas de obtención de energía,

HIBCH y ACADVL. Pero estas proteínas junto con las categorías funcionales de β -oxidación y el metabolismo mitocondrial y con la información recabada podemos decir que la obtención de energía mediante varios mecanismos, donde la mitocondria es organelo más importante, es una de los mecanismos celulares principales que tienen las células cancerígenas en para sobrevivir. Intrínsecamente las células cancerígenas llevan a cabo una aceleración en la obtención de energía debido a las altas demandas que existen y de acuerdo con los estudios de otros autores (mencionados anteriormente) durante procesos de resistencia a fármacos la obtención de energía se incrementa aún más. Dentro de nuestros resultados evidentemente vemos proteínas involucradas en la obtención de energía, lo que nos lleva a pensar que estos procesos se incrementan al momento en que la vincristina comienza a entrar en contacto con la línea celular CCRF-SB y aquellas células que logran sobrevivir comienzan una alta producción de energía para contrarrestar los efectos de este fármaco. Otro de los aspectos importantes de la mitocondria es la regulación sobre el proceso de apoptosis celular pero no se hallaron proteínas involucradas directamente en este proceso; Los que si se encontró fueron mecanismos celulares asociados con el calcio. El calcio celular cumple un papel importante en procesos como la señalización, regulación del transporte celular y en la apoptosis. Resalta el estudio en Zhang et al. (2010)⁸⁷, donde encontró un posible mecanismo de expulsión de la vincristina posiblemente mediado por la concentración de calcio intracelular. Pudiendo ser esta un mecanismo importante en la resistencia a la vincristina, el calcio también puede estar mediando o señalizando la acción de otras proteínas que se encarguen de la detoxificación de la vincristina.

Una de las categorías más sobresalientes en este estudio fue la reparación del ADN. Durante los procesos celulares normales, como la

replicación del ADN los desemparejamientos son un tipo de error inevitable, por lo que las proteínas asociadas a su reparación se encuentran constantemente expresadas en las células. En este experimento detectamos la presencia de proteínas asociadas a la reparación del ADN y debido a que la vincristina lleva a cabo su mecanismo de acción a nivel nuclear en las células durante la división células, el daño al ADN es inevitable, por lo que la sobreexpresión de mecanismo asociados a su reparación es algo que tiene sentido. Las proteínas SSBP1, MSH6, RFC3 y RFC4 resultaron tener relevancia en otros estudios por estar relacionadas directamente con la resistencia a distintos fármacos, y así asegurar la progresión del ciclo celular y el crecimiento. Las células CCRF al resentir los efectos de la vincristina comienzan una reparación acelerada del ADN con el objetivo de prevenir cualquier tipo de daño que pueda resultar en su muerte inminente.

Finalmente, el tráfico vesicular es otro de los procesos celulares que más resaltaron en este estudio. Este proceso resulta importante para la comunicación intracelular y de esta manera llevar a cabo la procesos que pudieran estar coordinados en llevar a la supervivencia de la células. El incremento del tráfico vesicular se puede estar llevando a cabo para que en distintos puntos de la célula se puedan activar diversos mecanismos que ayuden a asegurar la supervivencia de las células, como lo son la obtención de energía, la captación de nutrientes del medio, reparación del ADN entre otros. Aunque también se ha reportado que este tráfico puede tener la capacidad de acarrear fármacos fuera de la célula⁸⁰ no se encontraron proteínas asociadas directamente con esto en nuestro análisis.

En un estudio proteómico realizado en nuestro laboratorio, donde la misma línea celular CCRF-SB de LLA se adaptó gradualmente a vincristina durante 22 días hasta una concentración final de 6 nM⁹⁷. Se encontró que después de la adaptación a vincristina la producción de

ATP mitocondrial y la transducción de señales son mecanismos esenciales para lograr la tolerancia al fármaco. Dichos hallazgos coinciden con los encontrados en este estudio, dando una idea de que los mecanismos encontrados se inician desde el primer contacto con el fármaco y estos se van conservando durante la adaptación. Por otro lado hemos reportado el gran potencial que tienen este tipo de datos encontrados en estos estudios proteómicos para encontrar posibles biomarcadores en distintas neoplasias. Estos biomarcadores pueden ser útiles en el diagnóstico o para determinar el pronóstico de estas enfermedades, así como pueden ser predictivos para saber la respuesta ante un fármaco y también para saber el riesgo de una persona de padecer la enfermedad. Estos estudios también ayudan a comprender mejor la complejidad de muchas enfermedades como lo son las neoplasias⁹⁸. El estudio aquí presentado se encuentra solamente en la primera fase (Descubrimiento) para encontrar un posible biomarcador para determinar la resistencia a vincristina en la LLA. Faltaría llevar a cabo más estudios para la confirmación de un posible biomarcador, posteriormente se requeriría de una validación analítica para la identificación de dicho biomarcador con herramientas y técnicas disponibles en un laboratorio clínico, finalmente se lleva a cabo la confirmación de su utilidad en pruebas clínicas para finalmente obtener una aprobación regulatoria y comenzar su comercialización.

7. Conclusiones

En resumen la obtención de energía por ácidos grasos, la reparación del ADN, la comunicación a través del tráfico vesicular y otros señalizadores como el calcio, participan conjuntamente en las células CCRF-SB para asegurar la supervivencia al ser afectadas por la acción de la vincristina, para lo cual requieren que el material genético se encuentre casi íntegro

y así tener una progresión celular acelerada para lo cual se necesita una gran cantidad de ATP obtenida por distintas vías pero principalmente la β -oxidación; siendo aquí el tráfico vesicular el encargado de llevar a cabo las señalizaciones necesarias para la activación de estas vías en distintos lugares de la células.

Las 10 proteínas identificadas en este estudio pudieran ser o no factores importantes en esta primera respuesta de la línea celular CCRF-SB para la resistencia al fármaco, pero debido a la naturaleza del experimento en el que solo expusimos durante 24 horas, no sabemos con certeza si las células que encontramos vivas en efecto iban a sobrevivir en presencia constante de vincristina durante más tiempo, solamente sabemos que estas células encontraron mecanismos para sobrellevar la acción citotóxica de la vincristina. Aun así estos mecanismos y proteínas halladas pueden ser precursores clave en la generación de una resistencia adaptativa en la LLA ante la vincristina.

En los estudios proteómicos es necesario hacer una confirmación de los resultados con técnicas clásicas en bioquímica como Western-Blot, o SDS-page para asegurar que nuestros hallazgos son confiables. Los estudios proteómicos por la gran cantidad de información que proporcionan en un solo experimento funcionan más como escaneos a gran escala de los procesos biológicos que se están llevando a cabo, en este caso, en la línea celular CCRF-SB al entrar en contacto con la vincristina de manera súbita; por lo que es importante mencionar que lo que estamos observando con estos resultados es esa primera respuesta que tienen las células al entrar en contacto con este fármaco, por lo que no demostrarían una respuesta compleja que resultaría de una adaptación, pero nos sirve para saber si desde un inicio las células son capaces de defenderse ampliamente al fármaco y de ahí derivar un mecanismo o mecanismos más complejos.

Es importante mencionar que este estudio es solo una aproximación a lo que sucedería en un paciente, habría que considerar muchos otros factores, como la dosis administrada, los distintos fármacos que se utilizan junto con la vincristina, el microambiente que se da en los distintos tejidos del cuerpo, el estado fisiológico del paciente.

8. Bibliografía

1. Ernest Beutler, William Joseph Williams, *Williams Hematology* sixth ed. 2001, United States of America: McGraw Hill. 2047.
2. Hunger, S. P. and Mullighan, C. G., *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. *N Engl J Med*, 2015. 373(16): p. 1541-52.
3. Farber, S. and Diamond, L. K., *Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid*. *N Engl J Med*, 1948. 238(23): p. 787-93.
4. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. National Cancer Institute, SEER program, 1999.
5. SEER. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. (n.d.) National Cancer Institute. Consultado en Noviembre 2017, <https://seer.cancer.gov/>.
6. Lim, J. Y., Bhatia, S., Robison, L. L., and Yang, J. J., *Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer*, 2014. 120(7): p. 955-62.
7. Rivera-Luna, Roberto, Cárdenas-Cardos, Rocío, Olaya-Vargas, Alberto, Shalkow-Klincovstein, Jaime, et al., *El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas*. *An Med*, 2015. 60(2): p. 91-97.
8. Rose-Inman, H. and Kuehl, D., *Acute leukemia*. *Emerg Med Clin North Am*, 2014. 32(3): p. 579-96.
9. Liu, Y. L., Liu, H. B., Wang, W. J., Ma, L., et al., *[Analysis of bone marrow and peripheral blood cytologic features in hyperleukocytic acute leukemia]*. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2013. 21(3): p. 562-6.

10. Svoboda, G. H., Johnson, I. S., Gorman, M., and Neuss, N., *Current status of research on the alkaloids of Vinca rosea Linn. (Catharanthus roseus G. Don)*. J Pharm Sci, 1962. 51: p. 707-20.
11. Johnson, I. S., *Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest*. Cancer Chemother Rep, 1968. 52(4): p. 455-61.
12. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. *PubChem Substance and Compound databases*. Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093/nar/gkv951. Consultado en Noviembre 2017, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
13. Reitemeier, R. J., Moertel, C. G., and Blackburn, C. M., *VINCRISTINE (NSC-67574) THERAPY OF ADULT PATIENTS WITH SOLID TUMORS*. Cancer Chemother Rep, 1964. 34: p. 21-3.
14. Noble, R. L., Beer, C. T., and Cutts, J. H., *Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea*. Ann N Y Acad Sci, 1958. 76(3): p. 882-94.
15. Svoboda, G. H., *A note on several new alkaloids from Vinca rosea Linn. I. Leurosine, virosine, perivine*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc, 1958. 47(11): p. 834.
16. Said, R. and Tsimberidou, A. M., *Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2014. 10(3): p. 483-94.
17. Jordan, M. A. and Wilson, L., *Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy*. Curr Opin Cell Biol, 1998. 10(1): p. 123-30.
18. Gu, Q. and Yu, L. R., *Proteomics quality and standard: from a regulatory perspective*. J Proteomics, 2014. 96: p. 353-9.

19. Harris, Daniel C., *Quantitative Chemical Analysis*. Seventh ed. 2007, United States of America: W. H. Freeman and Company. 664.
20. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. *Curr Protoc Immunol*, 2015. 111: p. A3.B.1-3.
21. Sterck, L. (n.d.). *Calculate and draw custom Venn diagrams*. Consultado en Septiembre 2017, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.
22. DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis. (n.d.). Consultado en Septiembre 2017, <https://david.ncifcrf.gov/>.
23. European Bioinformatics Institute Protein Information Resource SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (n.d.). European Bioinformatics Institute. Consultado en Febrero 2018, <http://www.uniprot.org/>.
24. Richard, D. J., Bolderson, E., Cubeddu, L., Wadsworth, R. I., et al., *Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability*. *Nature*, 2008. 453(7195): p. 677-81.
25. Arakaki, N., Nishihama, T., Kohda, A., Owaki, H., et al., *Regulation of mitochondrial morphology and cell survival by Mitogenin I and mitochondrial single-stranded DNA binding protein*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1760(9): p. 1364-72.
26. Li, Q., Qu, F., Li, R., He, X., et al., *A functional polymorphism of SSBP1 gene predicts prognosis and response to chemotherapy in resected gastric cancer patients*. *Oncotarget*, 2017. 8(67): p. 110861-110876.
27. Wu, Y., Chen, H., Lu, J., Zhang, M., et al., *Acetylation-dependent function of human single-stranded DNA binding protein 1*. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(16): p. 7878-87.
28. Ye, Y., Huang, A., Huang, C., Liu, J., et al., *Comparative mitochondrial proteomic analysis of hepatocellular carcinoma from patients*. *Proteomics Clin Appl*, 2013. 7(5-6): p. 403-15.

29. Wang, Y., Hu, L., Zhang, X., Zhao, H., et al., *Downregulation of Mitochondrial Single Stranded DNA Binding Protein (SSBP1) Induces Mitochondrial Dysfunction and Increases the Radiosensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells*. *J Cancer*, 2017. 8(8): p. 1400-1409.
30. Xie, C., Sheng, H., Zhang, N., Li, S., et al., *Association of MSH6 mutation with glioma susceptibility, drug resistance and progression*. *Mol Clin Oncol*, 2016. 5(2): p. 236-240.
31. Jentzsch, T., Robl, B., Husmann, M., Bode-Lesniewska, B., et al., *Expression of MSH2 and MSH6 on a tissue microarray in patients with osteosarcoma*. *Anticancer Res*, 2014. 34(12): p. 6961-72.
32. Fujii, H., Honoki, K., Tsujiuchi, T., Kido, A., et al., *Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines*. *Int J Oncol*, 2009. 34(5): p. 1381-6.
33. Mar, B. G., Bullinger, L. B., McLean, K. M., Grauman, P. V., et al., *Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia*. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 3469.
34. He, Z. Y., Wu, S. G., Peng, F., Zhang, Q., et al., *Up-Regulation of RFC3 Promotes Triple Negative Breast Cancer Metastasis and is Associated With Poor Prognosis Via EMT*. *Transl Oncol*, 2017. 10(1): p. 1-9.
35. Hatfield, K. J., Reikvam, H., and Bruserud, O., *Identification of a subset of patients with acute myeloid leukemia characterized by long-term in vitro proliferation and altered cell cycle regulation of the leukemic cells*. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. 18(11): p. 1237-51.
36. Chae, H. D., Mitton, B., Lacayo, N. J., and Sakamoto, K. M., *Replication factor C3 is a CREB target gene that regulates cell*

- cycle progression through the modulation of chromatin loading of PCNA. *Leukemia*, 2015. 29(6): p. 1379-89.
37. Yao, Z., Hu, K., Huang, H., Xu, S., et al., *shRNA-mediated silencing of the RFC3 gene suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation*. *Int J Mol Med*, 2015. 36(5): p. 1393-9.
 38. Shen, H., Cai, M., Zhao, S., Wang, H., et al., *Overexpression of RFC3 is correlated with ovarian tumor development and poor prognosis*. *Tumour Biol*, 2014. 35(10): p. 10259-66.
 39. Shen, H., Xu, J., Zhao, S., Shi, H., et al., *ShRNA-mediated silencing of the RFC3 gene suppress ovarian tumor cells proliferation*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(8): p. 8968-75.
 40. Lockwood, W. W., Thu, K. L., Lin, L., Pikor, L. A., et al., *Integrative genomics identified RFC3 as an amplified candidate oncogene in esophageal adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(7): p. 1936-46.
 41. Arai, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Hada, A., et al., *The knockdown of endogenous replication factor C4 decreases the growth and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells*. *Liver Int*, 2009. 29(1): p. 55-62.
 42. Huang, L., Zheng, M., Zhou, Q. M., Zhang, M. Y., et al., *Identification of a 7-gene signature that predicts relapse and survival for early stage patients with cervical carcinoma*. *Med Oncol*, 2012. 29(4): p. 2911-8.
 43. Xiang, J., Fang, L., Luo, Y., Yang, Z., et al., *Levels of human replication factor C4, a clamp loader, correlate with tumor progression and predict the prognosis for colorectal cancer*. *J Transl Med*, 2014. 12: p. 320.
 44. Koene, S., Willems, P. H., Roestenberg, P., Koopman, W. J., et al., *Mouse models for nuclear DNA-encoded mitochondrial complex I deficiency*. *J Inherit Metab Dis*, 2011. 34(2): p. 293-307.

45. Huang, Y. P. and Chang, N. W., *PPARalpha modulates gene expression profiles of mitochondrial energy metabolism in oral tumorigenesis*. Biomedicine (Taipei), 2016. 6(1): p. 3.
46. Shimada, T., Moriuchi, R., Mori, T., Yamada, K., et al., *Identification of NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 5 capable to transform murine fibroblasts and overexpressed in human cervical carcinoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 339(3): p. 852-7.
47. He, H., Dai, F., Yu, L., She, X., et al., *Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues*. Gene Expr, 2002. 10(5-6): p. 231-42.
48. Yang, X. Z., Cui, S. Z., Zeng, L. S., Cheng, T. T., et al., *Overexpression of Rab1B and MMP9 predicts poor survival and good response to chemotherapy in patients with colorectal cancer*. Aging (Albany NY), 2017. 9(3): p. 914-931.
49. Johansson, H. J., Sanchez, B. C., Forshed, J., Stal, O., et al., *Proteomics profiling identify CAPS as a potential predictive marker of tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer*. Clin Proteomics, 2015. 12(1): p. 8.
50. Pellinen, T., Arjonen, A., Vuoriluoto, K., Kallio, K., et al., *Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins*. J Cell Biol, 2006. 173(5): p. 767-80.
51. Hooper, S., Gaggioli, C., and Sahai, E., *A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion*. Br J Cancer, 2010. 102(2): p. 392-402.
52. Pellinen, T., Tuomi, S., Arjonen, A., Wolf, M., et al., *Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis*. Dev Cell, 2008. 15(3): p. 371-85.

53. Liu, Q., Tang, H., Liu, X., Liao, Y., et al., *miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma*. *Med Oncol*, 2014. 31(3): p. 859.
54. Ye, F., Tang, H., Liu, Q., Xie, X., et al., *miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family*. *J Transl Med*, 2014. 12: p. 17.
55. Blum, R., Feick, P., Puype, M., Vandekerckhove, J., et al., *Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking*. *J Biol Chem*, 1996. 271(29): p. 17183-9.
56. Wang, H. and Kazanietz, M. G., *p23/Tmp21 differentially targets the Rac-GAP beta2-chimaerin and protein kinase C via their C1 domains*. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(8): p. 1398-408.
57. Wang, H., Xiao, L., and Kazanietz, M. G., *p23/Tmp21 associates with protein kinase Cdelta (PKCdelta) and modulates its apoptotic function*. *J Biol Chem*, 2011. 286(18): p. 15821-31.
58. Saran, S., Tran, D. D., Ewald, F., Koch, A., et al., *Depletion of three combined THOC5 mRNA export protein target genes synergistically induces human hepatocellular carcinoma cell death*. *Oncogene*, 2016. 35(29): p. 3872-9.
59. Xu, X., Gao, H., Qin, J., He, L., et al., *TMP21 modulates cell growth in papillary thyroid cancer cells by inducing autophagy through activation of the AMPK/mTOR pathway*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(9): p. 10824-31.
60. Casorelli, I., Bossa, C., and Bignami, M., *DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias*. *Int J Environ Res Public Health*, 2012. 9(8): p. 2636-57.

61. O'Grady, S., Finn, S. P., Cuffe, S., Richard, D. J., et al., *The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2014. 40(10): p. 1161-70.
62. Esposito, M. T. and So, C. W., *DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance*. *Chromosoma*, 2014. 123(6): p. 545-61.
63. Wang, P., Ma, D., Wang, J., Fang, Q., et al., *INPP4B-mediated DNA repair pathway confers resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia*. *Tumour Biol*, 2016. 37(9): p. 12513-12523.
64. Yao, C., Du, W., Chen, H., Xiao, S., et al., *The Fanconi anemia/BRCA pathway is involved in DNA interstrand cross-link repair of adriamycin-resistant leukemia cells*. *Leuk Lymphoma*, 2015. 56(3): p. 755-62.
65. Muller, M. R., Buschfort, C., Thomale, J., Lensing, C., et al., *DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(11): p. 2055-61.
66. Sampath, D. and Plunkett, W., *The role of DNA repair in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and chemotherapy resistance*. *Curr Oncol Rep*, 2007. 9(5): p. 361-7.
67. Bennett, M. J., *Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders*. *J Inherit Metab Dis*, 2010. 33(5): p. 533-7.
68. Sheng, X. and Mittelman, S. D., *The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia*. *Front Pediatr*, 2014. 2: p. 53.
69. Zhang, J., Ibrahim, M. M., Sun, M., and Tang, J., *Enoyl-coenzyme A hydratase in cancer*. *Clin Chim Acta*, 2015. 448: p. 13-7.
70. Baron, A., Migita, T., Tang, D., and Loda, M., *Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer?* *J Cell Biochem*, 2004. 91(1): p. 47-53.

71. Wu, X., Qin, L., Fako, V., and Zhang, J. T., *Molecular mechanisms of fatty acid synthase (FASN)-mediated resistance to anti-cancer treatments*. *Adv Biol Regul*, 2014. 54: p. 214-21.
72. Liu, H., Liu, Y., and Zhang, J. T., *A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction*. *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(2): p. 263-70.
73. Zeng, L., Biernacka, K. M., Holly, J. M., Jarrett, C., et al., *Hyperglycaemia confers resistance to chemotherapy on breast cancer cells: the role of fatty acid synthase*. *Endocr Relat Cancer*, 2010. 17(2): p. 539-51.
74. Staubert, C., Bhuiyan, H., Lindahl, A., Broom, O. J., et al., *Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: a metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine*. *J Biol Chem*, 2015. 290(13): p. 8348-59.
75. Tucci, Jonathan, Sheng, Xia, and Mittelman, Steven D., *Abstract 4339: Acute lymphoblastic leukemia cells stimulate adipocyte lipolysis and utilize adipocyte-derived free-fatty acids for proliferation*. *Cancer Research*, 2014. 74(19 Supplement): p. 4339-4339.
76. Liu, Y., *Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006. 9(3): p. 230-4.
77. Xie, B. X., Zhang, H., Wang, J., Pang, B., et al., *Analysis of differentially expressed genes in LNCaP prostate cancer progression model*. *J Androl*, 2011. 32(2): p. 170-82.
78. Giussani, P., Brioschi, L., Bassi, R., Riboni, L., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway regulates the endoplasmic reticulum to golgi traffic of ceramide in glioma cells:*

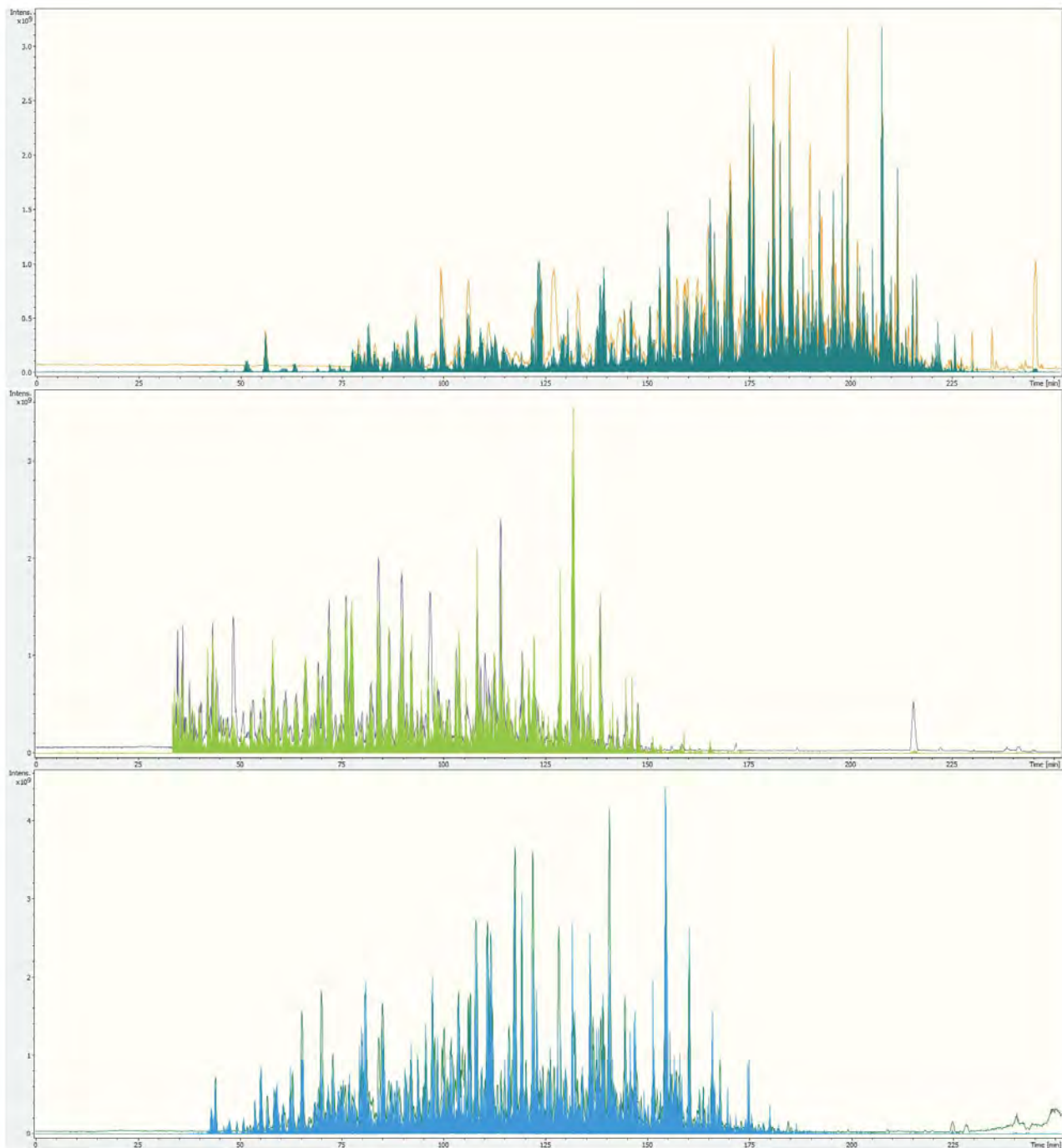
- a link between lipid signaling pathways involved in the control of cell survival. *J Biol Chem*, 2009. 284(8): p. 5088-96.
79. Opel, D., Westhoff, M. A., Bender, A., Braun, V., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 2008. 68(15): p. 6271-80.
 80. Wulf, G. G., Modlich, S., Inagaki, N., Reinhardt, D., et al., *ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport*. *Haematologica*, 2004. 89(11): p. 1395-7.
 81. Glowacki, S., Synowiec, E., and Blasiak, J., *The role of mitochondrial DNA damage and repair in the resistance of BCR/ABL-expressing cells to tyrosine kinase inhibitors*. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(8): p. 16348-64.
 82. Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., and Brenner, C., *Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1807(6): p. 735-45.
 83. Fulda, S., Galluzzi, L., and Kroemer, G., *Targeting mitochondria for cancer therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(6): p. 447-64.
 84. Green, D. and Kroemer, G., *The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?* *Trends Cell Biol*, 1998. 8(7): p. 267-71.
 85. Lamb, R., Harrison, H., Hulit, J., Smith, D. L., et al., *Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition*. *Oncotarget*, 2014. 5(22): p. 11029-37.
 86. Chen, X., Wei, S., Ma, Y., Lu, J., et al., *Quantitative proteomics analysis identifies mitochondria as therapeutic targets of multidrug-resistance in ovarian cancer*. *Theranostics*, 2014. 4(12): p. 1164-75.

87. He, Q., Zhang, G., Hou, D., Leng, A., et al., *Overexpression of sorcin results in multidrug resistance in gastric cancer cells with up-regulation of P-gp*. *Oncol Rep*, 2011. 25(1): p. 237-43.
88. Rasmussen, H. and Barrett, P. Q., *Calcium messenger system: an integrated view*. *Physiol Rev*, 1984. 64(3): p. 938-84.
89. Beck, W. T., *The cell biology of multiple drug resistance*. *Biochem Pharmacol*, 1987. 36(18): p. 2879-87.
90. Bouchelouche, P., Friche, E., Sehested, M., Jensen, P. B., et al., *Cytosolic free Ca²⁺ in daunorubicin and vincristine resistant Ehrlich ascites tumor cells. Drug accumulation is independent of intracellular Ca²⁺ changes*. *Biochem Pharmacol*, 1991. 41(2): p. 243-53.
91. Jung, H. J., Chen, Z., Wang, M., Fayad, L., et al., *Calcium blockers decrease the bortezomib resistance in mantle cell lymphoma via manipulation of tissue transglutaminase activities*. *Blood*, 2012. 119(11): p. 2568-78.
92. Boehm, J. E., Singh, U., Combs, C., Antonyak, M. A., et al., *Tissue transglutaminase protects against apoptosis by modifying the tumor suppressor protein p110 Rb*. *J Biol Chem*, 2002. 277(23): p. 20127-30.
93. Wen, L., Liang, C., Chen, E., Chen, W., et al., *Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 23269.
94. Abdoul-Azize, S., Dubus, I., and Vannier, J. P., *Improvement of dexamethasone sensitivity by chelation of intracellular Ca²⁺ in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells through the prosurvival kinase ERK1/2 deactivation*. *Oncotarget*, 2017. 8(16): p. 27339-27352.
95. Park, H. K., Lee, J. E., Lim, J., and Kang, B. H., *Mitochondrial Hsp90s suppress calcium-mediated stress signals propagating*

- from mitochondria to the ER in cancer cells. Mol Cancer, 2014. 13: p. 148.*
96. Fahrenholtz, C. D., Greene, A. M., Beltran, P. J., and Burnstein, K. L., *A novel calcium-dependent mechanism of acquired resistance to IGF-1 receptor inhibition in prostate cancer cells. Oncotarget, 2014. 5(19): p. 9007-21.*
97. Guzman-Ortiz, A. L., Aparicio-Ozores, G., Valle-Rios, R., Medina-Contreras, O., et al., *Proteomic changes in a childhood acute lymphoblastic leukemia cell line during the adaptation to vincristine. Bol Med Hosp Infant Mex, 2017. 74(3): p. 181-192.*
98. Quezada, H., Guzman-Ortiz, A. L., Diaz-Sanchez, H., Valle-Rios, R., et al., *Omics-based biomarkers: current status and potential use in the clinic. Bol Med Hosp Infant Mex, 2017. 74(3): p. 219-226.*

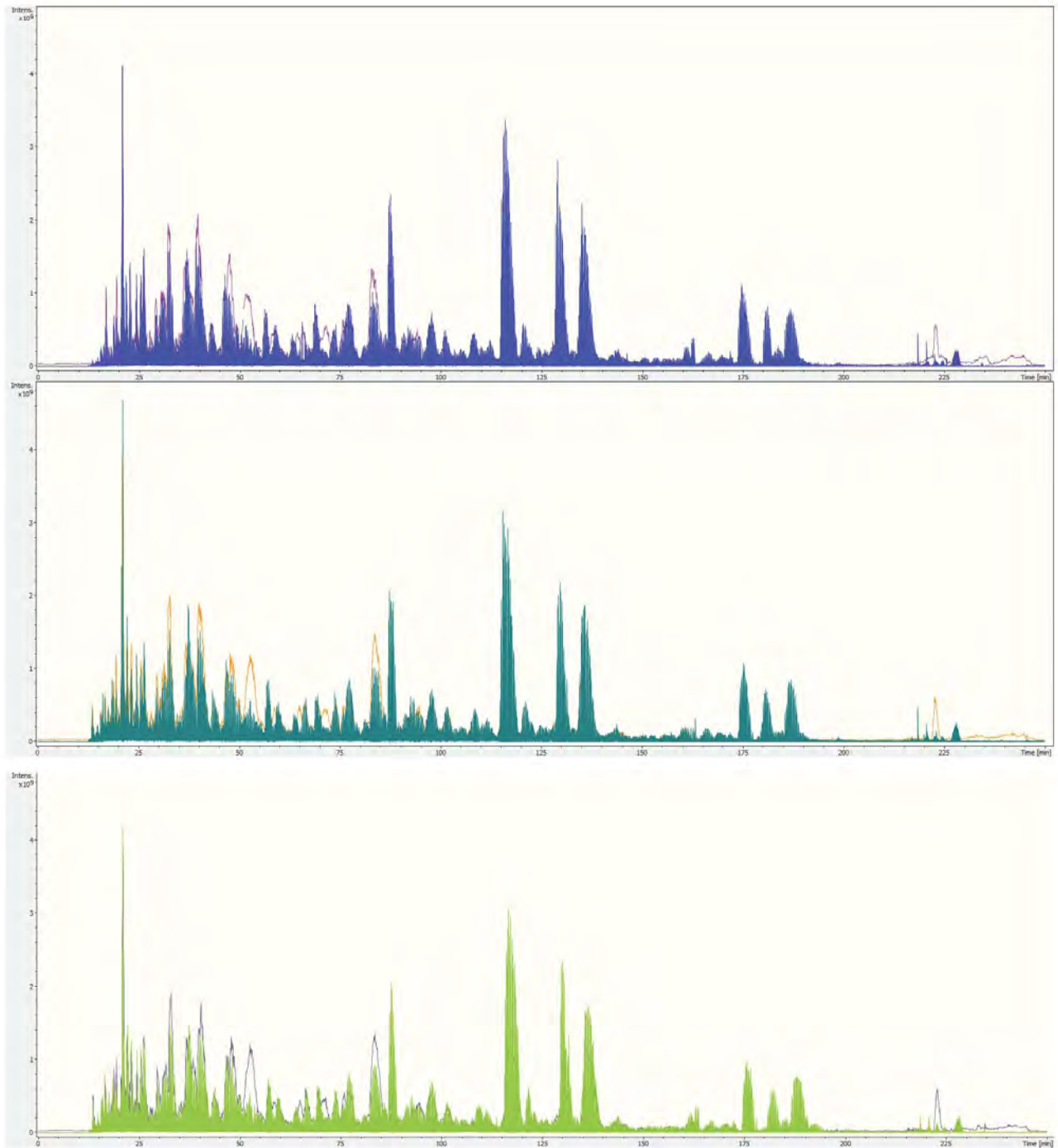
9. Anexos

9.1 ANEXO I. Cromatogramas de los estándares HeLa.

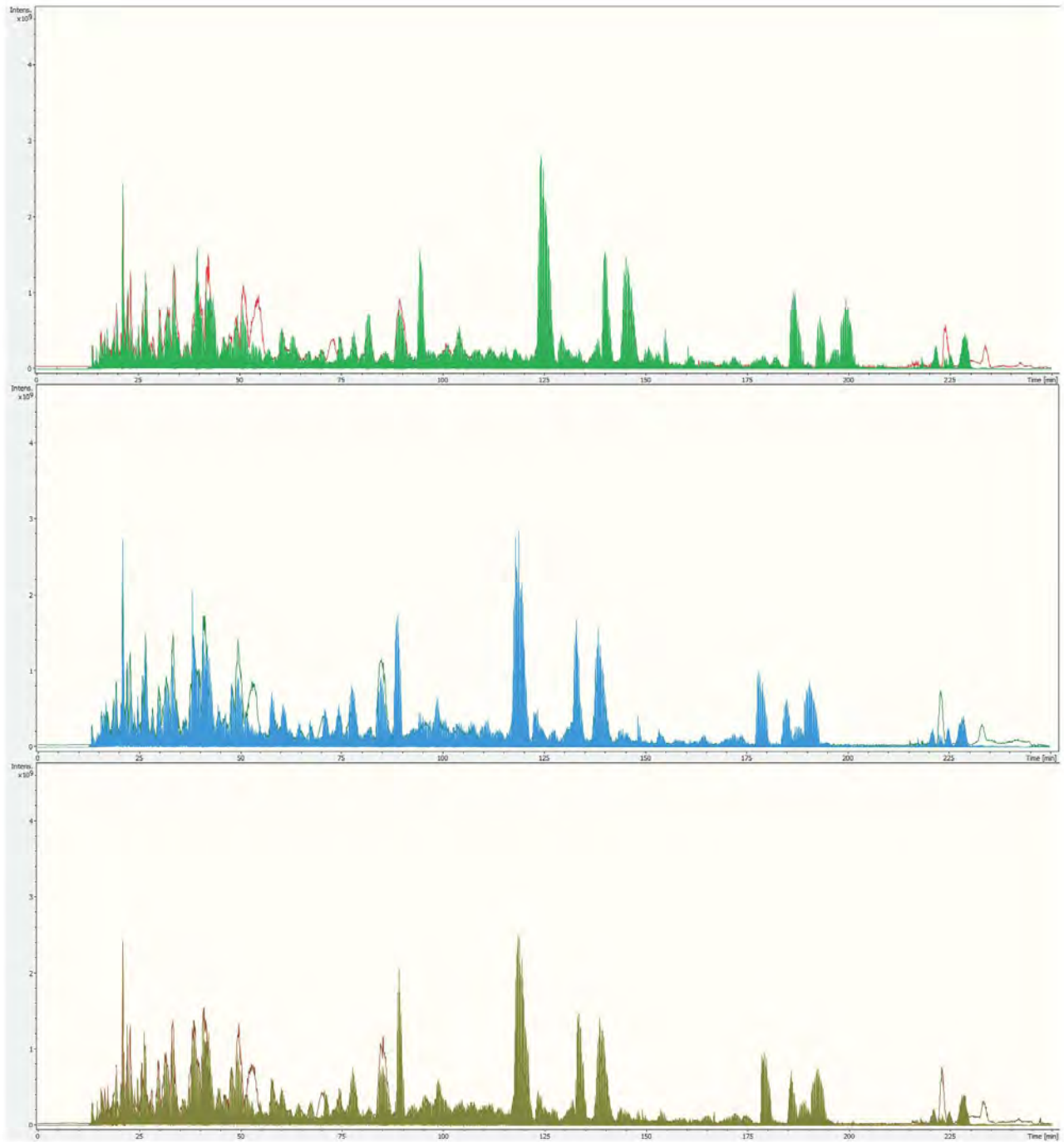


9.2 ANEXO II. Cromatogramas de las muestras en las réplicas 1 y 2.

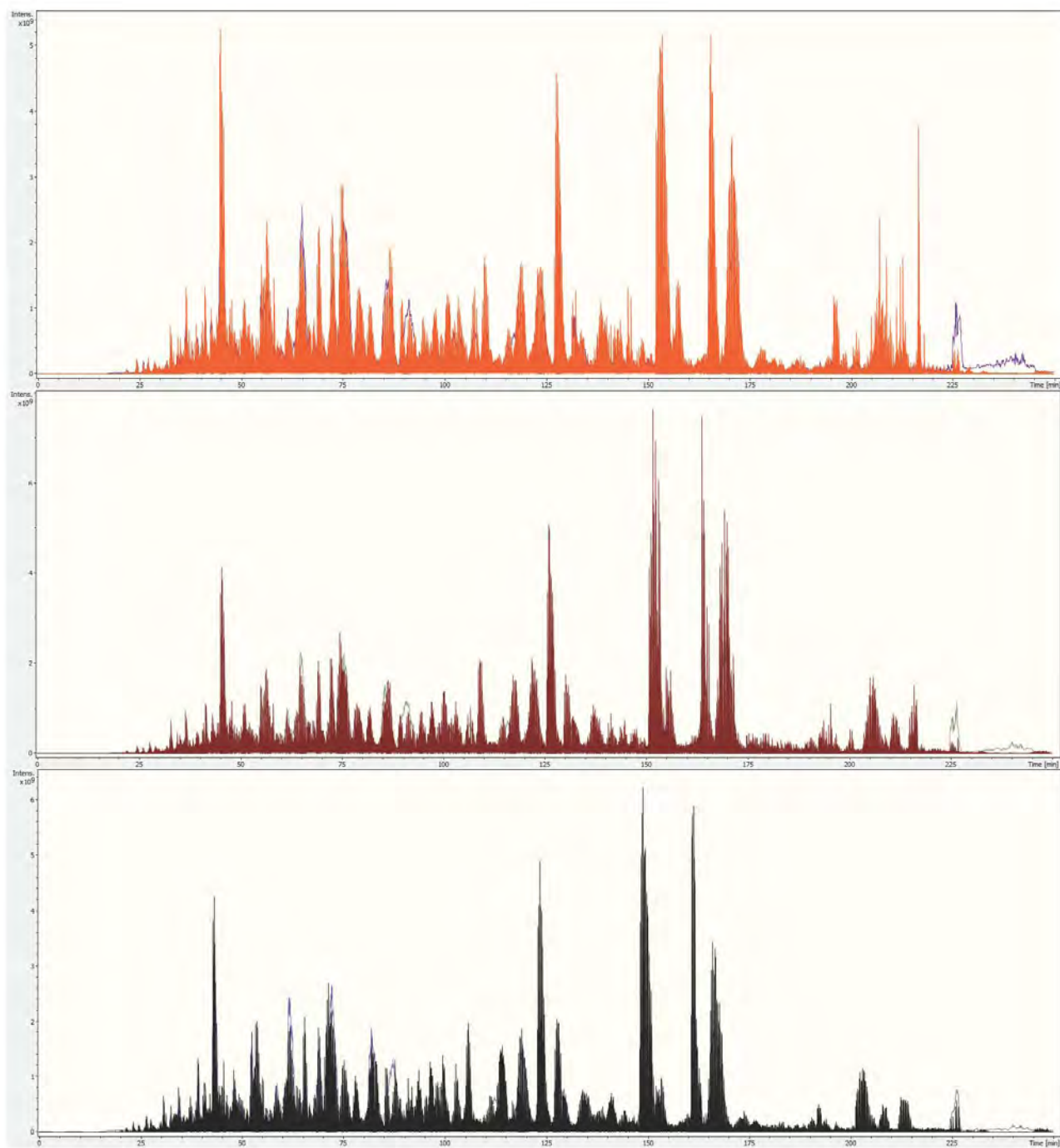
CÉLULAS CONTROL, RÉPLICA 1



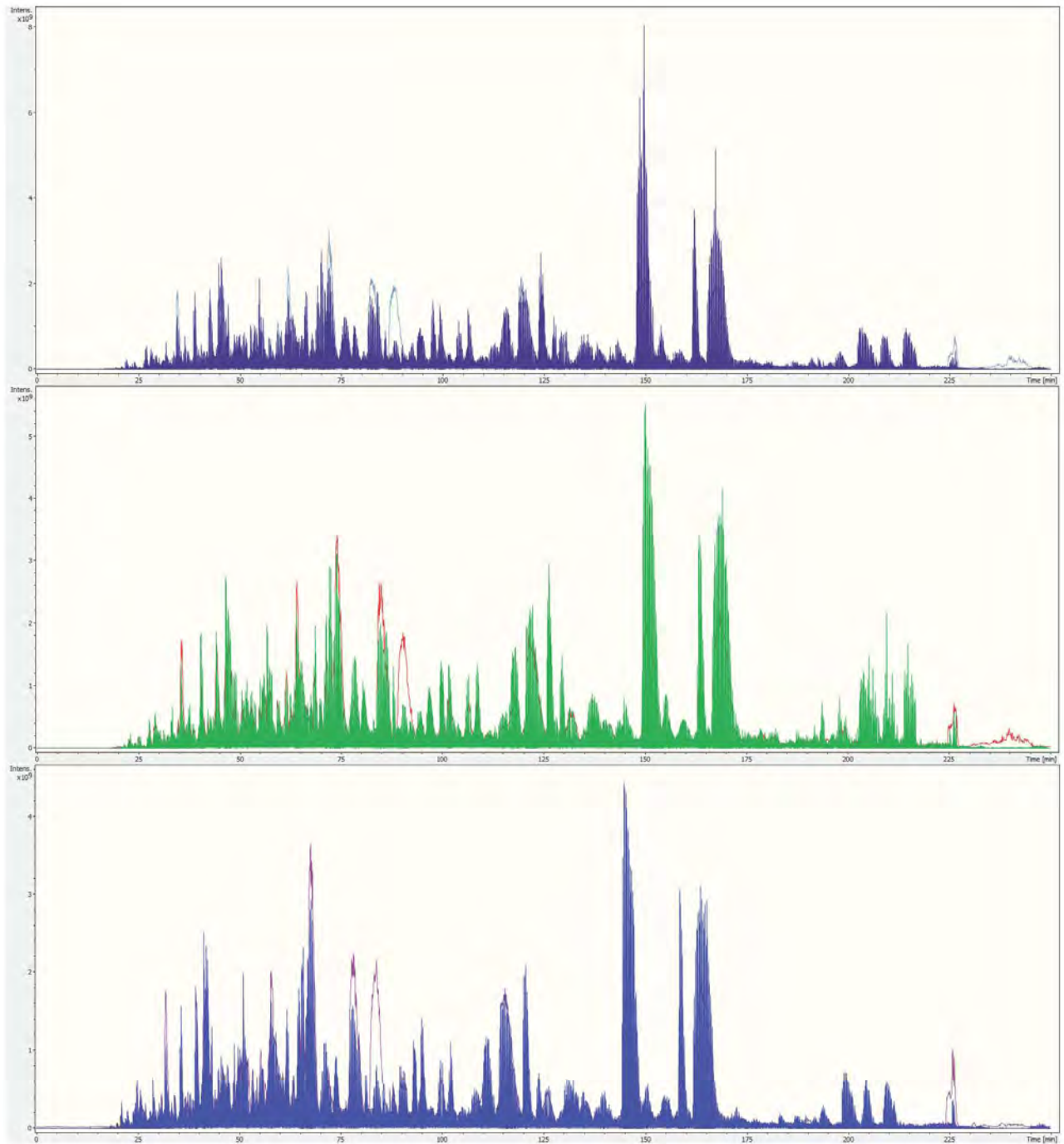
CÉLULAS EXPUESTAS A VINCRISTINA, RÉPLICA 1



CÉLULAS CONTROL, RÉPLICA 2



CÉLULAS EXPUESTAS A VINCRIPTINA, RÉPLICA 2



9.3 ANEXO III. Proteínas encontradas en las categorías funcionales sobrerrepresentadas.

Réplica 1	
Código UniProt	Nombre o nombres de la proteína
Q6NVY1	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (HIB-CoA hydrolase) (HIBYL-CoA-H)
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PP-1G) (EC 3.1.3.16) (Protein phosphatase 1C catalytic subunit)
Q8WY22	BRI3-binding protein (I3-binding protein) (Cervical cancer 1 proto-oncogene-binding protein KG19) (HCCRBP-1)
P60709	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed]
P18065	Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IBP-2) (IGF-binding protein 2) (IGFBP-2)
O14543	Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) (Cytokine-inducible SH2 protein 3) (CIS-3) (STAT-induced STAT inhibitor 3) (SSI-3)
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)
P68871	Hemoglobin subunit beta (Beta-globin) (Hemoglobin beta chain) [Cleaved into: LVV-hemorphin-7; Spinorphin]
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 (IGF2 mRNA-binding protein 3) (IMP-3) (IGF-II mRNA-binding protein 3) (KH domain-containing protein overexpressed in cancer) (hKOC) (VICKZ family member 3)
O95881	Thioredoxin domain-containing protein 12 (EC 1.8.4.2) (Endoplasmic reticulum resident protein 18) (ER protein 18) (ERp18) (Endoplasmic reticulum resident protein 19) (ER protein 19) (ERp19) (Thioredoxin-like protein p19) (hTLP19)
Q92973	Transportin-1 (Importin beta-2) (Karyopherin beta-2) (M9 region interaction protein) (MIP)
Q9Y5LO	Transportin-3 (Importin-12) (Imp12) (Transportin-SR) (TRN-SR)

P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (MFE-2) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4) (17-beta-HSD 4) (D-bifunctional protein) (DBP) (Multifunctional protein 2) (MPF-2) (Short chain dehydrogenase/reductase family 8C member 1) [Cleaved into: (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.n12); Enoyl-CoA hydratase 2 (EC 4.2.1.107) (EC 4.2.1.119) (3-alpha,7-alpha,12-alpha-trihydroxy-5-beta-cholest-24-enoyl-CoA hydratase)]
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (VLCAD) (EC 1.3.8.9)
P16219	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (SCAD) (EC 1.3.8.1) (Butyryl-CoA dehydrogenase)
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform (CPT1-L) (EC 2.3.1.21) (Carnitine O-palmitoyltransferase I, liver isoform) (CPT I) (CPTI-L) (Carnitine palmitoyltransferase 1A)
O14975	Very long-chain acyl-CoA synthetase (VLACS) (VLCS) (EC 6.2.1.-) (Fatty acid transport protein 2) (FATP-2) (Fatty-acid-coenzyme A ligase, very long-chain 1) (Long-chain-fatty-acid-CoA ligase) (EC 6.2.1.3) (Solute carrier family 27 member 2) (THCA-CoA ligase) (Very long-chain-fatty-acid-CoA ligase)
Q53H12	Acylglycerol kinase, mitochondrial (hAGK) (EC 2.7.1.107) (EC 2.7.1.94) (Multiple substrate lipid kinase) (HsMuLK) (MuLK) (Multi-substrate lipid kinase)
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Mt-SSB) (MtSSB) (PWP1-interacting protein 17)
P52701	DNA mismatch repair protein Msh6 (hMSH6) (G/T mismatch-binding protein) (GTBP) (GTMBP) (MutS protein homolog 6) (MutS-alpha 160 kDa subunit) (p160)
P40938	Replication factor C subunit 3 (Activator 1 38 kDa subunit) (A1 38 kDa subunit) (Activator 1 subunit 3) (Replication factor C 38 kDa subunit) (RF-C 38 kDa subunit) (RFC38)
P40937	Replication factor C subunit 5 (Activator 1 36 kDa subunit) (A1 36 kDa subunit) (Activator 1 subunit 5) (Replication factor C 36 kDa subunit) (RF-C 36 kDa subunit) (RFC36)
P35249	Replication factor C subunit 4 (Activator 1 37 kDa subunit) (A1 37 kDa subunit) (Activator 1 subunit 4) (Replication factor C 37 kDa subunit) (RF-C 37 kDa subunit) (RFC37)
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a (Ubiquitin carboxyl extension protein 80) [Cleaved into: Ubiquitin; 40S ribosomal protein S27a (Small ribosomal subunit protein eS31)]
POCOS5	Histone H2A.Z (H2A/z)
Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (CHD-4) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD4) (Mi-2 autoantigen 218 kDa protein) (Mi2-beta)

Q9Y230	RuvB-like 2 (EC 3.6.4.12) (48 kDa TATA box-binding protein-interacting protein) (48 kDa TBP-interacting protein) (51 kDa erythrocyte cytosolic protein) (ECP-51) (INO80 complex subunit J) (Repressing pontin 52) (Reptin 52) (TIP49b) (TIP60-associated protein 54-beta) (TAP54-beta)
O96019	Actin-like protein 6A (53 kDa BRG1-associated factor A) (Actin-related protein Baf53a) (ArpNbeta) (BRG1-associated factor 53A) (BAF53A) (INO80 complex subunit K)
Q9Y5B9	FACT complex subunit SPT16 (Chromatin-specific transcription elongation factor 140 kDa subunit) (FACT 140 kDa subunit) (FACTp140) (Facilitates chromatin transcription complex subunit SPT16) (hSPT16)
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase SMARCA2) (BRG1-associated factor 190B) (BAF190B) (Protein brahma homolog) (hBRM) (SNF2-alpha) (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 2)
P16402	Histone H1.3 (Histone H1c) (Histone H1s-2)
Q8IUE6	Histone H2A type 2-B
Q96PK6	RNA-binding protein 14 (Paraspeckle protein 2) (PSP2) (RNA-binding motif protein 14) (RRM-containing coactivator activator/modulator) (Synaptotagmin-interacting protein) (SYT-interacting protein)
Q9P287	BRCA2 and CDKN1A-interacting protein (P21- and CDK-associated protein 1) (Protein TOK-1)
O60814	Histone H2B type 1-K (H2B K) (HIRA-interacting protein 1)
PO6899	Histone H2B type 1-J (Histone H2B.1) (Histone H2B.r) (H2B/r)
O75431	Metaxin-2 (Mitochondrial outer membrane import complex protein 2)
O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70 (Mitochondrial precursor proteins import receptor) (Translocase of outer membrane 70 kDa subunit) (Translocase of outer mitochondrial membrane protein 70)
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3) (hVDAC3) (Outer mitochondrial membrane protein porin 3)
O75964	ATP synthase subunit g, mitochondrial (ATPase subunit g)
P12236	ADP/ATP translocase 3 (ADP, ATP carrier protein 3) (ADP,ATP carrier protein, isoform T2) (ANT 2) (Adenine nucleotide translocator 3) (ANT 3) (Solute carrier family 25 member 6) [Cleaved into: ADP/ATP translocase 3, N-terminally processed]
Q9UI12	V-type proton ATPase subunit H (V-ATPase subunit H) (Nef-binding protein 1) (NBP1) (Protein VMA13 homolog) (V-ATPase 50/57 kDa subunits) (Vacuolar proton pump subunit H) (Vacuolar proton pump subunit SFD)

Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 (Complex I subunit B13) (Complex I-13kD-B) (CI-13kD-B) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-B subunit)
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a (COPII-associated small GTPase)
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 (21 kDa transmembrane-trafficking protein) (S3111125) (S311125) (Tmp-21-I) (Transmembrane protein Tmp21) (p23) (p24 family protein delta-1) (p24delta1) (p24delta)
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B
Q15436	Protein transport protein Sec23A (hSec23A) (SEC23-related protein A)
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b (ER-Golgi SNARE of 24 kDa) (ERS-24) (ERS24) (SEC22 vesicle-trafficking protein homolog B) (SEC22 vesicle-trafficking protein-like 1)
P20339	Ras-related protein Rab-5A
O60664	Perilipin-3 (47 kDa mannose 6-phosphate receptor-binding protein) (47 kDa MPR-binding protein) (Cargo selection protein TIP47) (Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1) (Placental protein 17) (PP17)
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) (SR Ca(2+)-ATPase 2) (EC 3.6.3.8) (Calcium pump 2) (Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic reticulum type, slow twitch skeletal muscle isoform) (Endoplasmic reticulum class 1/2 Ca(2+) ATPase)
Q12879	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A (GluN2A) (Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-1) (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2A) (NMDAR2A) (NR2A) (hNR2A)
Q5T3F8	CSC1-like protein 2 (Transmembrane protein 63B)
Réplica 2	
Código UniProt	Nombre o nombres de la proteína
Q6NVY1	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (HIB-CoA hydrolase) (HIBYL-CoA-H)
P55809	Succinyl-CoA: 3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial (EC 2.8.3.5) (3-oxoacid CoA-transferase 1) (Somatic-type succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase) (SCOT-s)
Q6I514	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like (eIF-5A-1-like) (eIF-5A1-like) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1-like)
Q08752	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D (PPIase D) (EC 5.2.1.8) (40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (Cyclophilin-40) (CYP-40) (Cyclophilin-related protein) (Rotamase D)

Q6EEV6	Small ubiquitin-related modifier 4 (SUMO-4) (Small ubiquitin-like protein 4)
Q96T88	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1 (EC 2.3.2.27) (Inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa) (Nuclear protein 95) (Nuclear zinc finger protein Np95) (HuNp95) (hNp95) (RING finger protein 106) (RING-type E3 ubiquitin transferase UHRF1) (Transcription factor ICBP90) (Ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1) (hUHRF1) (Ubiquitin-like-containing PHD and RING finger domains protein 1)
P62861	40S ribosomal protein S30 (Small ribosomal subunit protein eS30)
O14920	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (I-kappa-B-kinase beta) (IKK-B) (IKK-beta) (IkbKB) (EC 2.7.11.10) (I-kappa-B kinase 2) (IKK2) (Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase beta) (NFKB1KB)
P63165	Small ubiquitin-related modifier 1 (SUMO-1) (GAP-modifying protein 1) (GMP1) (SMT3 homolog 3) (Sentrin) (Ubiquitin-homology domain protein PIC1) (Ubiquitin-like protein SMT3C) (Smt3C) (Ubiquitin-like protein UBL1)
P06239	Tyrosine-protein kinase Lck (EC 2.7.10.2) (Leukocyte C-terminal Src kinase) (LSK) (Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase) (Protein YT16) (Proto-oncogene Lck) (T cell-specific protein-tyrosine kinase) (p56-LCK)
P05534	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain (Aw-24) (HLA class I histocompatibility antigen, A-9 alpha chain) (MHC class I antigen A*24)
P43403	Tyrosine-protein kinase ZAP-70 (EC 2.7.10.2) (70 kDa zeta-chain associated protein) (Syk-related tyrosine kinase)
P07766	T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain (T-cell surface antigen T3/Leu-4 epsilon chain) (CD antigen CD3e)
Q8N4N8	Kinesin-like protein KIF2B
P07339	Cathepsin D (EC 3.4.23.5) [Cleaved into: Cathepsin D light chain; Cathepsin D heavy chain]
Q15287	RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (SR-related protein LDC2)
Q6UXN9	WD repeat-containing protein 82 (Protein TMEM113) (Swd2)
Q6UN15	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1 (hFip1) (FIP1-like 1 protein) (Factor interacting with PAP) (Rearranged in hypereosinophilia)
Q8IYD1	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B (Eukaryotic peptide chain release factor subunit 3b) (eRF3b) (G1 to S phase transition protein 2 homolog)
Q9Y450	HBS1-like protein (ERFS)
Q96EP5	DAZ-associated protein 1 (Deleted in azoospermia-associated

	protein 1)
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase RENT1) (Nonsense mRNA reducing factor 1) (NORF1) (Up-frameshift suppressor 1 homolog) (hUpf1)
P13987	CD59 glycoprotein (1F5 antigen) (20 kDa homologous restriction factor) (HRF-20) (HRF20) (MAC-inhibitory protein) (MAC-IP) (MEM43 antigen) (Membrane attack complex inhibition factor) (MACIF) (Membrane inhibitor of reactive lysis) (MIRL) (Protectin) (CD antigen CD59)
Q9C0C9	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme (EC 2.3.2.24) (E2/E3 hybrid ubiquitin-protein ligase UBE2O) (Ubiquitin carrier protein O) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 O) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 of 230 kDa) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2-230K) (Ubiquitin-protein ligase O)
PO4114	Apolipoprotein B-100 (Apo B-100) [Cleaved into: Apolipoprotein B-48 (Apo B-48)]
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0) (ATB(0)) (Baboon M7 virus receptor) (RD114/simian type D retrovirus receptor) (Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2) (Solute carrier family 1 member 5)
Q6NSJ5	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8E (Leucine-rich repeat-containing protein 8E)
P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 (Sodium/potassium-dependent ATPase subunit beta-3) (ATPB-3) (CD antigen CD298)
P27708	CAD protein [Includes: Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.5.5); Aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2); Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)]
O00505	Importin subunit alpha-4 (Importin alpha Q2) (Qip2) (Karyopherin subunit alpha-3) (SRP1-gamma)
Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205 (205 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup205)
Q13769	THO complex subunit 5 homolog (Functional spliceosome-associated protein 79) (fSAP79) (NF2/meningioma region protein pK1.3) (Placental protein 39.2) (PP39.2) (hTREX90)
P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (MCAD) (EC 1.3.8.7)
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial (EC 2.3.1.9) (Acetoacetyl-CoA thiolase) (T2)
PO9110	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta-ketothiolase) (Peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase)
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase,

	mitochondrial (VLCAD) (EC 1.3.8.9)
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Mt-SSB) (MtSSB) (PWP1-interacting protein 17)
P52701	DNA mismatch repair protein Msh6 (hMSH6) (G/T mismatch-binding protein) (GTBP) (GTMBP) (MutS protein homolog 6) (MutS-alpha 160 kDa subunit) (p160)
P40938	Replication factor C subunit 3 (Activator 1 38 kDa subunit) (A1 38 kDa subunit) (Activator 1 subunit 3) (Replication factor C 38 kDa subunit) (RF-C 38 kDa subunit) (RFC38)
P35249	Replication factor C subunit 4 (Activator 1 37 kDa subunit) (A1 37 kDa subunit) (Activator 1 subunit 4) (Replication factor C 37 kDa subunit) (RF-C 37 kDa subunit) (RFC37)
Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial (EC 6.3.4.3) (Formyltetrahydrofolate synthetase)
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Complex III subunit 1) (Core protein I) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1)
Q8TCS8	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial (EC 2.7.7.8) (3'-5' RNA exonuclease OLD35) (PNPase old-35) (Polynucleotide phosphorylase 1) (PNPase 1) (Polynucleotide phosphorylase-like protein)
P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial (ATPase subunit F6)
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2 (Cytochrome c oxidase polypeptide II)
P05496	ATP synthase F(0) complex subunit C1, mitochondrial (ATP synthase lipid-binding protein) (ATP synthase proteolipid P1) (ATP synthase proton-transporting mitochondrial F(0) complex subunit C1) (ATPase protein 9) (ATPase subunit c)
P08574	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Complex III subunit 4) (Complex III subunit IV) (Cytochrome b-c1 complex subunit 4) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit) (Cytochrome c-1)
P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta (Beta-ETF)
Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 (Complex I subunit B13) (Complex I-13kD-B) (CI-13kD-B) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-B subunit)
Q13596	Sorting nexin-1
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21
Q9BVK6	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 (GMP25) (Glycoprotein 25L2) (p24 family protein alpha-2) (p24alpha2) (p25)

P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 (21 kDa transmembrane-trafficking protein) (S3111125) (S311125) (Tmp-21-I) (Transmembrane protein Tmp21) (p23) (p24 family protein delta-1) (p24delta1) (p24delta)
Q15027	Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1 (Centaurin-beta-1) (Cnt-b1)
Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b (Chromatin-modifying protein 4b) (CHMP4b) (SNF7 homolog associated with Alix 1) (SNF7-2) (hSnf7-2) (Vacuolar protein sorting-associated protein 32-2) (Vps32-2) (hVps32-2)
P63010	AP-2 complex subunit beta (AP105B) (Adaptor protein complex AP-2 subunit beta) (Adaptor-related protein complex 2 subunit beta) (Beta-2-adaptin) (Beta-adaptin) (Clathrin assembly protein complex 2 beta large chain) (Plasma membrane adaptor HA2/AP2 adaptin beta subunit)
P61019	Ras-related protein Rab-2A
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B
Q92930	Ras-related protein Rab-8B
P84077	ADP-ribosylation factor 1
P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (Transducin beta chain 1)
Q96FJ2	Dynein light chain 2, cytoplasmic (8 kDa dynein light chain b) (DLC8b) (Dynein light chain LC8-type 2)
P52732	Kinesin-like protein KIF11 (Kinesin-like protein 1) (Kinesin-like spindle protein HKSP) (Kinesin-related motor protein Eg5) (Thyroid receptor-interacting protein 5) (TR-interacting protein 5) (TRIP-5)
Q93084	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 (SERCA3) (SR Ca(2+)-ATPase 3) (EC 3.6.3.8) (Calcium pump 3)
Q16720	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 (PMCA3) (EC 3.6.3.8) (Plasma membrane calcium ATPase isoform 3) (Plasma membrane calcium pump isoform 3)
P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH 1) (EC 1.4.1.3)
P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial (NAD-ME) (EC 1.1.1.38) (Malic enzyme 2)
Q9BQB6	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (EC 1.17.4.4) (Vitamin K1 2,3-epoxide reductase subunit 1)

Q9BTZ2	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 (EC 1.1.1.184) (NADPH-dependent carbonyl reductase/NADP-retinol dehydrogenase) (CR) (PHCR) (NADPH-dependent retinol dehydrogenase/reductase) (NRDR) (humNRDR) (Peroxisomal short-chain alcohol dehydrogenase) (PSCD) (SCAD-SRL) (Short chain dehydrogenase/reductase family 25C member 2) (Short-chain dehydrogenase/reductase family member 4)
Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1 (EC 2.5.1.18) (GST 13-13) (GST class-kappa) (GSTK1-1) (hGSTK1) (Glutathione S-transferase subunit 13)
P49448	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial (GDH 2) (EC 1.4.1.3)
P16083	Ribosyldihyronicotinamide dehydrogenase [quinone] (EC 1.10.5.1) (NRH dehydrogenase [quinone] 2) (NRH:quinone oxidoreductase 2) (Quinone reductase 2) (QR2)
Q8NBO5	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11 (EC 1.1.1.62) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 11) (17-beta-HSD 11) (17bHSD11) (17betaHSD11) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase XI) (17-beta-HSD XI) (17betaHSDXI) (Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen HD-CL-03) (CTCL-associated antigen HD-CL-03)
P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (TMABADH) (EC 1.2.1.47) (Aldehyde dehydrogenase E3 isozyme) (Aldehyde dehydrogenase family 9 member A1) (EC 1.2.1.3) (Gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase) (EC 1.2.1.19) (R-aminobutyraldehyde dehydrogenase) [Cleaved into: 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase, N-terminally processed]
PO4179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (EC 1.15.1.1)
P32322	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (P5C reductase 1) (P5CR 1) (EC 1.5.1.2)
P37268	Squalene synthase (SQS) (SS) (EC 2.5.1.21) (FPP:FPP farnesyltransferase) (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase)
PO0387	NADH-cytochrome b5 reductase 3 (B5R) (Cytochrome b5 reductase) (EC 1.6.2.2) (Diaphorase-1) [Cleaved into: NADH-cytochrome b5 reductase 3 membrane-bound form; NADH-cytochrome b5 reductase 3 soluble form]
PO0374	Dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3)
Q13423	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial (EC 1.6.1.2) (Nicotinamide nucleotide transhydrogenase) (Pyridine nucleotide transhydrogenase)