



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efecto del microambiente tumoral sobre la tolerancia a vincristina y el proteoma de células de leucemia linfoblástica aguda infantil

T E S I S

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

PRESENTA

ARIANA JOSHKEL LIMA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS

**DR. HÉCTOR QUEZADA PABLO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

ASESORA

**M. en C. ROSA ELBA GALVÁN DUARTE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**FES
ZARAGOZA**

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis, Dr. Héctor Quezada Pablo, por toda su dedicación, paciencia y apoyo, así mismo por su guía incondicional especialmente en los momentos difíciles de este proyecto.

A mi asesora, M. en C. Rosa Elba Galván Duarte por el tiempo dedicado a esclarecer mis dudas y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Laboratorio de Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, por brindarme acceso a sus recursos e instalaciones.

A mis padres, por todo el amor que siempre me han brindado y los valores que me han inculcado. Les agradezco infinitamente por dejarme el legado más preciado, la educación.

A mi hermana, quien siempre ha estado a mi lado incondicionalmente en los momentos buenos y malos. Eres el motor que me da energía para seguir adelante.

A mi abuela, por confiar en mis decisiones y brindarme su apoyo en cada paso del camino. Siempre será mi ejemplo por seguir de perseverancia, honestidad y bondad.

A mis tías porque siempre me han brindado su infinito cariño y a mi tío por sus invaluables consejos.

Finalmente me gustaría dedicar este trabajo a todas aquellas almas guerreras que se han enfrentado a la lucha contra la leucemia, quienes fueron mi inspiración para la realización de este proyecto. No sabemos lo fuertes que somos hasta que ser fuertes es la única opción que tenemos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 LEUCEMIA	9
2.1.1 <i>Definición.....</i>	9
2.1.2 <i>Antecedentes históricos</i>	9
2.1.3 <i>Clasificación</i>	10
2.1.4 <i>Epidemiología</i>	12
2.1.5 <i>Factores de riesgo.....</i>	14
2.1.6 <i>Manifestaciones clínicas.....</i>	15
2.1.7 <i>Diagnóstico y subclasificación.....</i>	17
2.1.8 <i>Tratamiento</i>	23
2.1.9 <i>Vincristina.....</i>	25
2.1.10 <i>Quimio resistencia</i>	29
2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL.....	30
2.3 LÍNEAS CELULARES	34
2.2.1 <i>CCRF-SB.....</i>	34
2.2.2 <i>OP9</i>	35
2.4 PROTEÓMICA	36
2.3.1 <i>Cromatografía líquida de alta eficacia</i>	37
2.3.2 <i>Espectrometría de masas.....</i>	38
2.3.3 <i>Bioinformática</i>	42
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
4. HIPÓTESIS	45
5. OBJETIVOS.....	46
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	46
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	46
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	47
6.1.1 <i>Tipo de estudio.....</i>	47
6.1.2 <i>Universo</i>	47
6.1.3 <i>Variables</i>	47
6.1.4 <i>Análisis estadístico.....</i>	48
6.2 MATERIAL Y MÉTODO.....	48
6.2.1 <i>Cultivo celular.....</i>	48
6.2.2 <i>Evaluación de la sensibilidad a vincristina del monocultivo CCRF-SB</i>	49
6.2.3 <i>Generación estructuras tridimensionales tipo organoide (cocultivos 3D)</i>	50
6.2.4 <i>Evaluación de la sensibilidad a vincristina del cocultivo CCRF-SB y OP9.....</i>	50
6.2.5 <i>Obtención de biomasa para análisis proteómico</i>	51
6.2.6 <i>Extracción del proteoma total.....</i>	51
6.2.7 <i>Separación por nano HPLC.....</i>	52
6.2.8 <i>Espectrometría de masas.....</i>	53

6.2.9 Análisis bioinformático.....	54
7.RESULTADOS.....	55
7.1 GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES TIPO ORGANOIDE	55
7.2 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A VINCRISTINA EN CÉLULAS CCRF- SB.....	57
7.2.1 <i>Monocultivo de CCRF-SB</i>	57
7.2.2 <i>Cocultivo de CCRF-SB con OP9</i>	58
7.3 PROTEÍNAS ENCONTRADAS EN MONOCULTIVO CCRF-SB Y EN COCULTIVO DE CCRF-SB CON OP9	60
7.3.1 <i>Monocultivo de CCRF-SB</i>	60
7.3.2 <i>Cocultivo de CCRF-SB con OP9</i>	60
7.4 RUTAS BIOLÓGICAS ENCONTRADAS EN PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE MONOCULTIVO CCRF-SB Y COCULTIVO DE CCRF-SB CON OP9.....	61
7.5 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO UTILIZANDO PERSEUS COMPARANDO MONOCULTIVO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE VINCRISTINA	66
7.6 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO UTILIZANDO PERSEUS COMPARANDO COCULTIVO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE VINCRISTINA	70
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	79
9.CONCLUSIONES	84
10. REFERENCIAS.....	85
11. ANEXOS	89

ABREVIATURAS

ABC: Ammonium Bicarbonate (Bicarbonato de amonio)

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

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

CIGn: Cloruro de guanidinio

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

CO₂: dióxido de carbono

CoA: coenzima A

DTT: Ditioneitol

ESI: Electro Spray Ionization (Ionización por electrospray)

FDR: False Discovery Rate (Tasa de identificaciones falsas)

Fig.: Figura

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 laser asistida por matriz)

mg: Miligramos

min: Minutos

miR: Micro RNA

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MS: Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas)

N₂: Nitrógeno

Nano HPLC: Nano High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de nanoflujos)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Solución amortiguadora de fosfatos salina)

Q: Quadrupole (Cuadrupolo)

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

SDS: Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sodio)

TFA: Trifluoroacetic acid (Ácido trifluoroacético)

TOF: Time of flight (Tiempo de vuelo)

Tris: Tris-hidroximetil aminometano

VCN: Vincristina

°C: Grados Celsius

µg: Microgramos

µL: Microlitros

µm: Micrómetros

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de mortalidad en niños de 5 a 14 años en México

Figura 2. Tipos de cáncer en niños de 0 a 18 años en México.

Figura 3. Tipos de leucemias en niños de 0 a 18 años en México.

Figura 4. Manifestaciones clínicas en leucemia.

Figura 5. Variantes morfológicas comunes de LLA en médula ósea.

Figura 6. Variantes morfológicas comunes de LMA en médula ósea.

Figura 7. Vincristina Estructura.

Figura 8. Mecanismo de acción de vincristina.

Figura 9. Eliminación de vincristina.

Figura 10. Cinética y tratamiento clínico de LLA pediátrica.

Figura 11. Composición del nicho de la médula ósea

Figura 12. Desarrollo de resistencia adquirida en el microambiente tumoral

Figura 13. Células de CCRF-SB vistas al microscopio.

Figura 14. Células de OP9 vistas al microscopio.

Figura 15. HPLC Equipo de cromatografía de líquidos de alta eficacia.

Figura 16. Ionización por Electrospray.

Figura 17. Trampa de iones.

Figura 18. Cuadrupolo.

Figura 19. Tiempo de vuelo con reflector.

Figura 20. Esquema del Impact II Bruker Daltonics.

Figura 21. Curva dosis-respuesta en monocultivo celular con exposición a 24 h de Vincristina.

Figura 22. Curva dosis-respuesta en cocultivo celular con exposición a 24 h de Vincristina.

Figura 23 Diagrama tipo Venn de proteínas exclusivas y compartidas de monocultivo sin exposición a vincristina y de monocultivo con exposición a vincristina 3nM.

Figura 24. Diagrama tipo Venn de proteínas exclusivas y compartidas de cocultivo sin exposición a vincristina y de monocultivo con exposición a vincristina 40 nM.

Figura 25. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de monocultivo sin exposición a vincristina 0 nM.

Figura 26. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de monocultivo con exposición a vincristina 3 nM.

Figura 27. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de cocultivo sin exposición a vincristina 0 nM.

Figura 28. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de cocultivo con exposición a vincristina 40 nM.

Figura 29. Diferenciación de grupos por agrupamiento PCA en monocultivo en ausencia de vincristina y monocultivo a exposición 3 nM.

Figura 30. Diferenciación de proteínas significativas por diagrama volcano en monocultivo en ausencia de vincristina y monocultivo a exposición 3 nM.

Figura 31. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por agrupamiento jerárquico en monocultivo con ausencia de vincristina y monocultivo a exposición 3 nM.

Figura 32. Diferenciación de grupos por agrupamiento PCA en cocultivo en ausencia de vincristina y cocultivo a exposición 40 nM.

Figura 33. Diferenciación de proteínas significativas por diagrama volcano en cocultivo en ausencia de vincristina y cocultivo a exposición 40 nM.

Figura 34. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por agrupamiento jerárquico en cocultivo en ausencia de vincristina y cocultivo a exposición 40 nM.

Figura 35. Diferenciación de grupos por agrupamiento PCA en monocultivo y cocultivo en ausencia de vincristina.

Figura 36. Diferenciación de proteínas significativas por diagrama volcano en monocultivo y cocultivo en ausencia de vincristina.

Figura 37. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por agrupamiento jerárquico en monocultivo y cocultivo en ausencia de vincristina.

Figura 38. Diferenciación de grupos por agrupamiento PCA en monocultivo y cocultivo en presencia de vincristina.

Figura 39. Diferenciación de proteínas significativas por diagrama volcano en monocultivo y cocultivo en presencia de vincristina.

Figura 40. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por heatmap en monocultivo y cocultivo en presencia de vincristina.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente de HPLC para la separación del proteoma total.

Tabla 2. Establecimiento del cocultivo de esferoides de células estromales de médula ósea (OP9) con células leucémicas de LLA (CCRF-SB).

Tabla 3. Resultados de dosis - respuesta obtenidos en la exposición a 24h de vincristina con células leucémicas de LLA (CCRF-SB) medidas a una Absorbancia de 450/620 nm.

Tabla 4. Controles utilizados como blanco para los cálculos de viabilidad.

Tabla 5. Resultados de dosis - respuesta obtenidos en la exposición a 24h de vincristina en cocultivo de esferoides de células estromales de médula ósea (OP9) con células leucémicas de LLA (CCRF-SB) medidas a una Absorbancia de 450/620 nm.

Tabla 6. Controles utilizados como blanco para los cálculos de viabilidad.

Tabla 7. Comparación de las concentraciones inhibitorias 50 de células CCRF-SB con vincristina.

1.INTRODUCCIÓN

En el año 2020 se registraron 1,086,743 defunciones en México, de las cuales 8% (90,603) fue a causa de tumores malignos. La tasa de defunciones por esta causa aumentó durante la última década, al pasar de 6.18 defunciones por cada 10 mil personas en 2010 a 7.17 defunciones por cada 10 mil en 2020. Al analizar la información por grupos de edad, destaca que, el principal tipo de cáncer que afecta a la población de entre 0 y 14 años es la leucemia, en específico la LLA, que comprende aproximadamente la mitad de todos los casos reportados en los últimos cinco años. La supervivencia global estimada para todos los tipos de cáncer en menores de edad es del 56 %. Si bien esto representa un avance significativo en relación con años previos, México aún se encuentra por debajo de los estándares encontrados en países desarrollados, donde se espera que el 80 % de los pacientes se cure. La principal causa de muerte no evitable en los pacientes con LLA es la recaída o falta de remisión, debido a la quimio resistencia que pueden generar las células leucémicas durante el tratamiento.

Actualmente muchos pacientes con cáncer pediátrico son tratados con vincristina como parte de su esquema de quimioterapia en enfermedades hematológicas o tumores sólidos, debido al mayor nivel de sensibilidad y a la mejor tolerancia de los niños a dosis relevantemente mayores de vincristina en comparación con el tratamiento en adultos.

Una de las razones de la quimio resistencia a vincristina en LLA es la protección que las células de la médula ósea brindan a los blastos malignos durante los cursos de quimioterapia. Las proteínas extracelulares y procesos intracelulares a través de las cuales se lleva a cabo esa protección no han sido completamente caracterizadas. La identificación de esas proteínas podría facilitar en el futuro el diseño de estrategias para bloquear las señales involucradas y así reducir la tolerancia a fármacos

2.MARCO TEÓRICO

2.1 LEUCEMIA

2.1.1 Definición

La leucemia es una enfermedad que se distingue por una proliferación descontrolada de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea, debido a mutaciones en el proceso de regulación celular.¹

2.1.2 Antecedentes Históricos

No existe una sólida evidencia de casos clínicos descritos que satisficieran la descripción de leucemia antes del siglo XIX.

El primer informe se atribuye a Velpeau, escrito en 1827, en donde observó un paciente de 63 años con fiebre, debilidad y crecimiento descomunal del abdomen. Él encontró en la autopsia que el hígado y bazo eran enormes (el bazo pesó 4 kilos), y la "sangre era como una papilla de avena que recordaba la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto".

Un cambio de rumbo en la hematología ocurrió en 1845, cuando John Bennett, en Edimburgo, señaló una serie de pacientes que murieron con los bazos aumentados y cambios en los colores y estados de su sangre; él utilizó el término "leucocythemia" para describir esta condición patológica.²

Virchow introdujo el término "leucemia" (griego: "sangre blanca") después de publicar su segundo caso en 1847, donde describió el exceso anormal de los glóbulos blancos en pacientes con el síndrome clínico descrito por Velpeau y Bennett. El mismo Virchow informó un tercer caso en 1849, el de un paciente con esplenomegalia, y concluyó que había dos tipos de la enfermedad, la esplénica y la linfática, según fuera el sitio de origen.^{2,3}

En 1857, Friedrich Würzburg usó por primera ocasión el término leucemia aguda (LA) para describir la enfermedad de un paciente de 46 años que falleció después de sólo seis semanas de evolución. En 1868, Ernst Neumann informó los cambios que presenta la médula ósea (MO) en la leucemia y estableció una relación entre la fuente de la sangre y la MO. Neumann efectuó dos aportaciones fundamentales al estudio de la hematopoyesis: que las células de la sangre se originan en la MO y que la hematopoyesis es un proceso continuo.

En 1877 Paul Ehrlich desarrolló un método de tinción triácida, capaz de distinguir por vez primera entre el núcleo, el citoplasma y los demás componentes celulares, como los gránulos. Ehrlich introdujo los términos: acidófilo (eosinófilo), basófilo y neutrófilo para describir los tres tipos de granulocitos. La disponibilidad de estas tinciones ayudó a simplificar la clasificación de las leucemias en dos grandes grupos, el mieloide, de células de la MO, y el linfóide, de células no granulosas.³

Entonces, hacia finales del siglo XIX, se había descrito el origen de la sangre; se descubrieron los medios y técnicas para identificar las distintas células sanguíneas y algunos de sus precursores inmediatos; se establecieron las dos grandes estirpes celulares; y se realizó la clasificación de los diferentes tipos de leucemia.

2.1.3 Clasificación

Se clasifican según la estirpe celular afectada en mieloide o linfóide, su evolución varía desde las que evolucionan con lentitud, hasta las que conducen rápidamente a la muerte y se les conoce como crónicas o agudas respectivamente.⁴

A) Leucemias agudas y crónicas

El nombre de las leucemias corresponde a la rapidez con la que se forma y empeora la enfermedad:

- **Agudas:** El número de las células leucémicas aumenta rápidamente. Existe una alta concentración en la médula ósea de células inmaduras que no realizan el trabajo de los glóbulos blancos normales, por lo que las personas

que padecen este tipo de leucemia, suelen sentirse fatigadas y contraen infecciones fácilmente.

- Crónicas: La leucemia crónica se forma lentamente. La mayor parte de las células anormales son maduras y realizan funciones semejantes a los glóbulos blancos normales. En la mayoría de los casos no se presenta sintomatología, pero si no es tratada a tiempo puede desplazar a las células normales del torrente sanguíneo.⁵

B) Leucemias mieloides y linfoides

- Mieloides: Este tipo de cáncer afecta a alguno de los siguientes tipos de células tempranas
 - Mieloblastos: forman los glóbulos blancos llamados granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos).
 - Monoblastos: estas células normalmente se convierten en los glóbulos blancos llamados monocitos y macrófagos.
 - Eritroblastos: al madurar se convierten en glóbulos rojos
 - Megacarioblastos: son llamados megacariocitos después de la etapa de maduración, finalmente producen las células llamadas plaquetas.
- Linfoides: Se ven afectadas las células productoras de linfocitos, que se llaman linfoblastos, forman parte del sistema inmune para combatir agentes extraños.^{6,7}

Con base en la clasificación anterior se tienen cuatro principales grupos:

1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
2. Leucemia mieloide aguda (LMA)
3. Leucemia linfoblástica crónica (LLC)
4. Leucemia mieloide crónica (LMC)

La determinación del tipo de leucemia es útil para predecir el pronóstico del paciente, así como facilitar la elección del tratamiento.

2.1.4 Epidemiología

El cáncer infantil en México es un problema de salud pública, al ser la principal causa de muerte por enfermedad entre los 5 y 14 años de edad, cobrando más de 2,000 vidas anuales (Figura 1). Comparado con las enfermedades neoplásicas en los adultos, el cáncer en la infancia y adolescencia representa una proporción baja, ya que solo el 5 % de los casos de cáncer ocurren en niños. Sin embargo, esta enfermedad provoca un mayor número de años de vida potencialmente perdidos, ya que se estima que por cada niño que no sobrevive al cáncer, se pierden en promedio 70 años de fuerza laboral y tiempo productivo a nivel sociedad. Además de ser un factor negativo para la salud emocional y la dinámica familiar.⁸

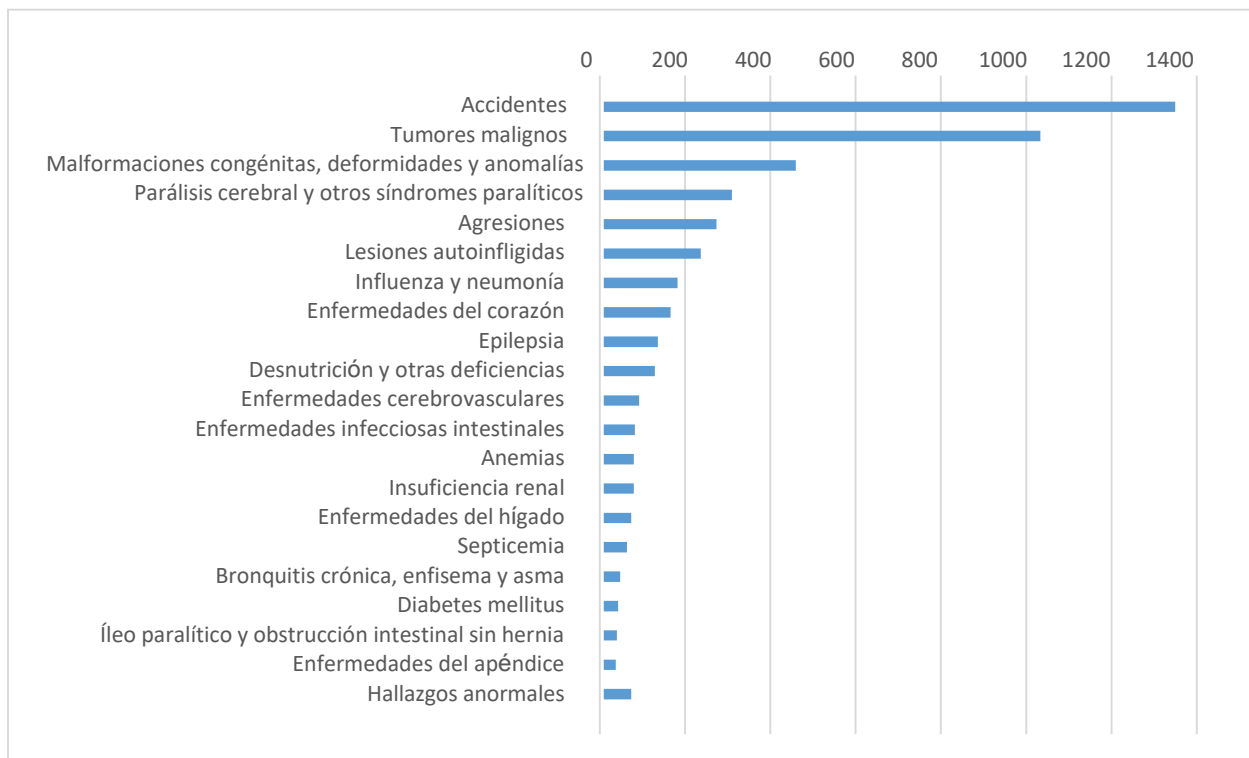


Figura 1. Principales causas de mortalidad en niños de 5 a 14 años en México. Modificado de INEGI ⁹

En México, de acuerdo con los registros del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA), la supervivencia global estimada a 5 años para todos los tipos de cáncer en menores de edad, en Unidades Médicas Acreditadas (UMA) para la atención de esta enfermedad, es del 56 %. Si bien esto representa un avance significativo en relación con años previos, México aún se encuentra por debajo de los estándares encontrados en países desarrollados, donde se espera que el 80 % de los pacientes se curen. En los países desarrollados, el cáncer es la segunda causa de muerte en niños solo precedido por accidentes. El tipo más común es la LLA, que comprende aproximadamente la mitad de todos los casos.¹⁰

En un estudio realizado en pacientes de la base de datos oficial de niños con cáncer de 0 a 18 años registrados ante el Seguro Popular se encontró que, en un total de 14,178 pacientes con cáncer, el más común correspondió a leucemia (49 %), seguido de linfomas (11 %) y tumores del sistema nervioso central (9.4 %) Figura 2. Cuando todos estos niños fueron agrupados por edad, se mostró que la máxima incidencia en el año fue entre 0 y 4 años con 57.1, de 5 a 9 años de 45.2, entre 10 a 14 años de 38.2 y de 15 a 18 años de 27.5. La incidencia por edad se definió por el número total de casos de cada grupo / población total registrada en ese grupo de edad por 1,000,000 de población /año. En relación con el género, predominó el masculino con 7,868 casos (55.5 %) mientras que el femenino fue de 6,310 pacientes (44.5 %) con una relación Masculino: Femenino de 1.2:1.¹¹

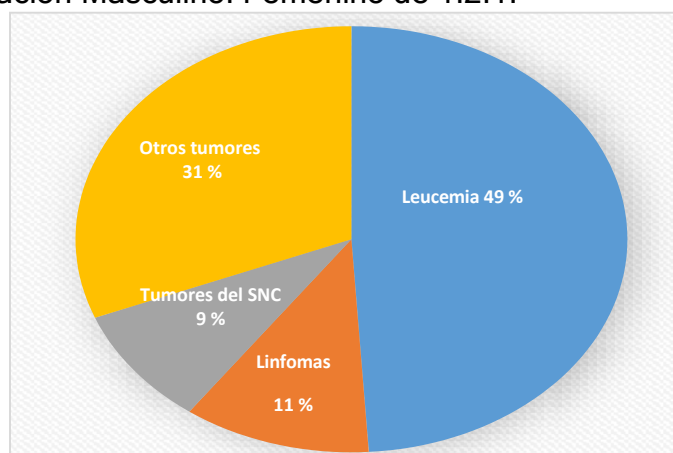


Figura 2. Tipos de cáncer en niños de 0 a 18 años en México. En un total de 14,178 pacientes, (6,947) 9% corresponden a Leucemia, (1,560)11% a linfomas, (1,276) 9% a tumores del SNC y (4,395) 31% a otros tumores Modificado de Rivera-Luna R. et.al. ¹¹

La prevalencia de la leucemia en los 6 años del registro fue de 49.8 %, con predominio de la LLA en comparación con otros tipos en la población pediátrica (Figura 3).¹²

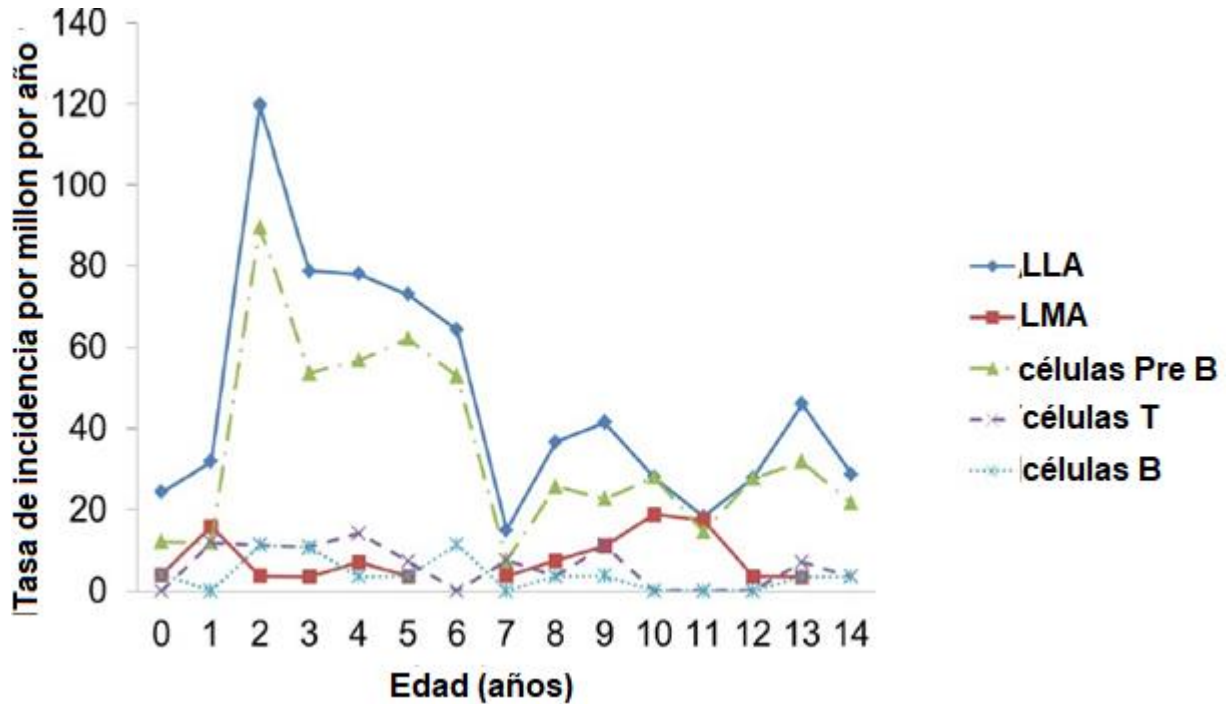


Figura 3. Tipos de leucemias en niños de 0 a 18 años en México.

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) Leucemia mieloide aguda (LMA) Leucemia de células Pre B (células Pre B), Leucemia de células T (células T) y leucemia de células B (células B). Modificado de Pérez-Saldívar M.R. et.al.¹²

2.1.5 Factores de riesgo

Aunque las causas de la mayoría de las leucemias pediátricas son desconocidas, se han realizado estudios que sugieren la relación de síndromes genéticos con mayor riesgo de manifestar LLA, tales como el síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, inmunodeficiencia hereditaria o adquirida, por ejemplo; deficiencia de inmunoglobulina A, agammaglobulinemia y síndrome de Wiskott-Aldrich.¹³

El factor hereditario es raro, sólo juega un papel pequeño sobre el origen de este padecimiento (5 %). Sin embargo, hay varios factores de riesgo para padecer leucemia linfoblástica, entre los cuales se destacan:

- Ambientales: Exposición a rayos X en útero, o a reacciones nucleares.
- Ocupacionales: Principalmente en tareas agrícolas, de soldadura, en la industria de la madera, al igual que el uso de pesticidas, plaguicidas, tintes de cabello y solventes.
- Quimioterapia y radioterapia previas.
- Algunos fármacos como la fenitoína.
- Tabaquismo antes y durante el embarazo, consumo materno de alcohol en el embarazo.
- Dieta rica en nitratos ⁴

No existe una manera conocida de prevenir la leucemia, sin embargo, hacer cambios en el estilo de vida puede evitar ciertos factores de riesgo.

2.1.6 Manifestaciones clínicas

La aparición de LLA varía según sus manifestaciones clínicas, que reflejan el grado de insuficiencia de la médula ósea, de infiltración extramedular y de agudeza. Casi la mitad de los pacientes cursa con fiebre y la tercera parte tiene como origen de la fiebre un foco infeccioso.

Otros síntomas frecuentes son astenia y adinamia debidas a anemia. Del 33 al 43 % tiene sangrado por trombocitopenia y 25 % refiere dolor articular u óseo debido a la infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación. Los síntomas menos comunes son cefalea, vómito, alteraciones de las funciones mentales, oliguria y anuria. ³

Los signos que se observan en la piel y las mucosas son petequias y equimosis. El hígado, bazo y los ganglios linfáticos son los sitios extramedulares más afectados, y el grado de organomegalia es más importante en niños que en adultos: en 17 % se encuentra hepatomegalia; en 44 % esplenomegalia, y en 15 % linfadenopatía. ³

Otras manifestaciones clínicas que aparecen en pacientes con leucemia linfoblástica son:

- Masa mediastínica, observada en 7 a 10 % de niños y 15 % de adultos, que se localiza en el mediastino anterior como resultado de infiltración del timo. Esta masa puede llegar a comprimir los grandes vasos y la tráquea e incluso ocasionar síndrome de vena cava superior, o síndrome mediastínico superior, que se manifiesta con tos, disnea, ortopnea, disfagia, estridor, cianosis, edema facial, aumento de la tensión intracraneal y en ocasiones síncope.
- Engrosamiento escrotal que puede ser signo de leucemia testicular o hidrocele secundario a obstrucción linfática, ambas se diagnostican por ultrasonografía.
- Afecciones oculares, debidas a la infiltración leucémica de la órbita, retina, córnea, nervio óptico o conjuntiva.⁴

La LLA casi siempre produce signos o síntomas y se detecta en el examen rutinario (Figura 4). La anemia, la neutropenia y la trombocitopenia son hallazgos comunes que muestran grave afección de la médula ósea por células leucémicas.

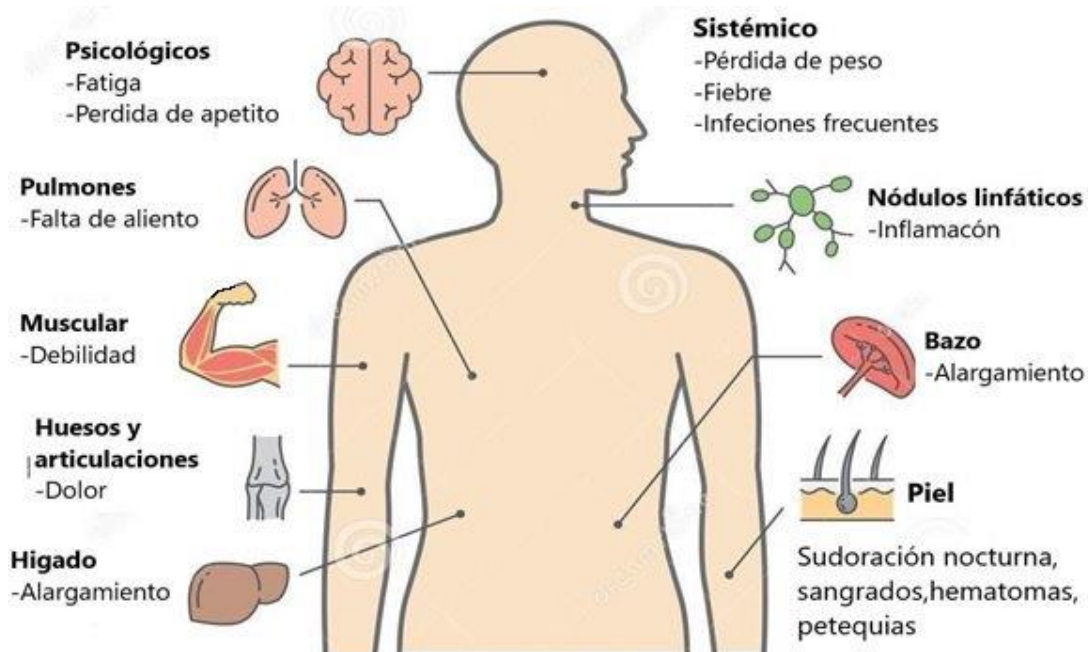


Figura 4. Manifestaciones clínicas en Leucemia. Modificado de Dreamstime. ¹⁴

2.1.7 Diagnóstico y subclasificación

Es indispensable valorar los estudios de laboratorio: biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos completos y pruebas de la función hepática. La punción lumbar es una prueba importante que debe practicarse a todo paciente con leucemia linfoblástica, en especial la que se origina en estirpe B. El aspirado de médula ósea es el procedimiento diagnóstico por excelencia, pues sirve para el estudio morfológico de las células leucémicas.⁴

Los siguientes son algunos procesos que también se consideran de importancia:

- Radiografía de tórax: Necesaria para detectar crecimiento del timo, de ganglios y masas mediastínicas, o derrame pleural. Los pacientes pueden manifestar anormalidades óseas como osteólisis y osteopenia.
- Ultrasonografía: Útil para valorar la manifestación de hepatoesplenomegalia o edema testicular.
- Tomografía: Principalmente para localizar ganglios retroperitoneales

Además de estos exámenes, se debe realizar uno de tipo citogenético para identificar en el cariotipo anomalías cromosomales y el inmunofenotipo por citometría de flujo para identificar algunos marcadores de superficie que ayuden a diagnosticar el subtipo de la leucemia.⁷

Toda leucemia se diagnostica con base en su aparición clínica y el resultado del aspirado de médula ósea, que se clasifica de acuerdo con los siguientes criterios:

A) Clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB) de la leucemia linfoblástica aguda

Según la FAB, la LLA presenta tres variantes morfológicas definidas: L-1, L-2 y L-3. La diferencia entre un grupo y otro se basa en el tamaño, el grado de maduración del núcleo y la presencia de nucleolos y vacuolas. (Figura 5)

- LLA típica o LLA-L1: Los linfoblastos son pequeños y las características nucleares y citoplásmicas son uniformes con escaso citoplasma azul, forma nuclear regular, cromatina parcialmente condensada con nucléolos apenas visibles y alta relación nucleocitoplásmica.
- LLA atípica o LLA-L2: Los linfoblastos son de tamaño variable con contornos nucleares irregulares, cromatina de encaje heterogénea, citoplasma moderadamente abundante débilmente basófilo y relación nucleocitoplasmática variable.
- LLA tipo Burkitt o LLA-L3: Los linfoblastos son muy grandes y bastante homogéneos con cromatina nuclear punteada finamente granular con nucléolos prominentes. El citoplasma es azul y está vacuolado; la mayoría de estos casos ahora se reconoce que representan el linfoma no Hodgkin en lugar de LLA.⁷

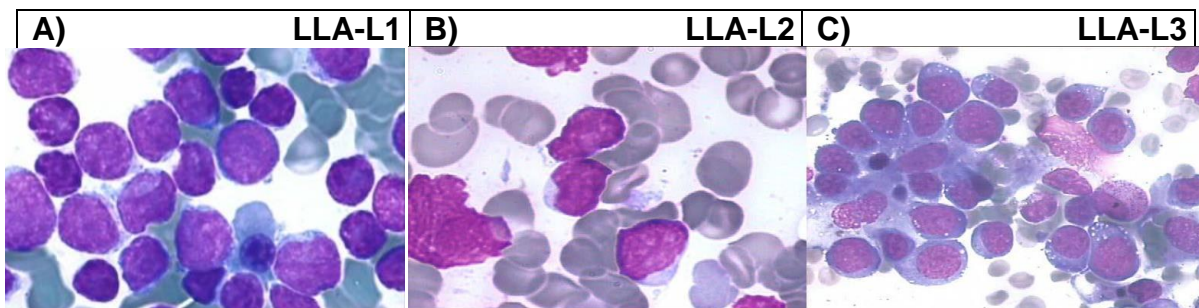


Figura 5. Variantes morfológicas comunes de LLA en médula ósea. Modificado de Chiaretti S. et.al.⁷

Esta clasificación se propuso hace más de 20 años un grupo franco-americanobritánico (FAB) de investigadores; es la clasificación morfológica de mayor aceptación internacional. Sin embargo, la morfología ofrece poca objetividad y numerosas variantes en la interpretación; no revela con claridad las características biológicas de la célula, y es poco útil para predecir con certeza el pronóstico de la enfermedad; por ello, en la hematología moderna las leucemias linfoblásticas se clasifican en subtipos, no sólo de acuerdo con criterios morfológicos, claramente insuficientes, también sin perder de vista su origen inmunológico y las características genéticas de la diferenciación del linfoblasto.

B) Clasificación basada en el inmunofenotipo de LLA

Nuevos tipos de pruebas de laboratorio pueden ayudar a determinar el subtipo de LLA y el pronóstico del paciente. Estas pruebas ayudan a dividir la LLA en grupos con base en el inmunofenotipo de la leucemia.

En términos inmunológicos se reconocen tres tipos o subgrupos de LLA: ²

- “Pre-B temprano o LLA pro-B”: 65 %, CD10+ (antígeno común de la LLA, CALLA+).
- “Pre-B”: 20 %, Ig citoplásmica+ (cig+).
- “B madura o tipo Burkitt”: (2 %), CD19, CD22 e Ig de superficie+ (sig+).
- “Pre-T”: 13 %, CD2+, CD3+ y CD7+.

En alrededor de 80 % a 85 % de los niños con LLA, la leucemia comienza en las células B. Aproximadamente de 15 a 20 % de los niños con diagnóstico de LLA presentan un inmunofenotipo positivo a células T. Este tipo de leucemia afecta a los niños más que a las niñas, y generalmente afecta a niños de más edad que la LLA de células B. Este tipo de leucemia causa con frecuencia un agrandamiento del timo, lo que algunas veces puede causar problemas respiratorios. También se puede propagar al líquido cefalorraquídeo en las etapas tempranas de la enfermedad ⁶

C) Clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB) de la leucemia mieloide aguda

El sistema antiguo FAB divide a la LMA en subtipos, según el tipo de célula de la que se originó la leucemia y la madurez de esta. Se conocen 8 para LMA: de M0 a M7.

- ❖ M0: Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
- ❖ M1: Leucemia mieloblástica aguda con maduración mínima
- ❖ M2: Leucemia mieloblástica aguda con maduración (el subtipo más común de AML en niños)
- ❖ M3: Leucemia promielocítica aguda (APL)
- ❖ M4: Leucemia mielomonocítica aguda (más común en niños menores de dos años de edad)
- ❖ M5: Leucemia monocítica aguda (más común en niños menores de dos años de edad)
- ❖ M6: Leucemia eritroide aguda
- ❖ M7: Leucemia megacarioblástica aguda

Los subtipos M0 al M5 comienzan todos en formas inmaduras de glóbulos blancos. La LMA M6 comienza en formas inmaduras de glóbulos rojos, mientras que la AML M7 se inicia en formas inmaduras de células que producen plaquetas.⁶(Figura6)

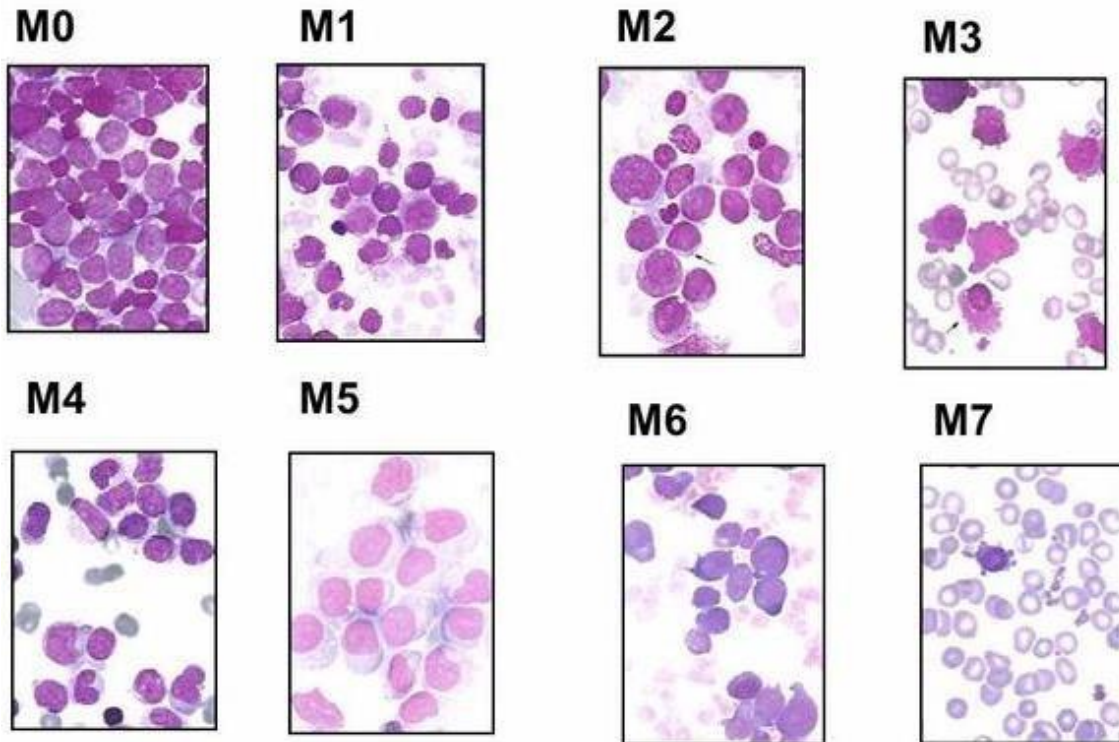


Figura 6. Variantes morfológicas comunes de LMA en médula ósea. Modificado de ACS.⁶

D) Clasificación de la LMA de la Organización Mundial de la Salud (WHO)

El sistema de clasificación FAB se sigue usando comúnmente para agrupar la LMA en subtipos. Sin embargo, no toma en cuenta muchos otros factores que actualmente se sabe afectan el pronóstico, tal como cambios cromosómicos en las células leucémicas. El sistema más reciente de la Organización Mundial de la Salud (WHO) incluye algunos de estos factores para ayudar a clasificar mejor la LMA basándose en el pronóstico de una persona.⁶

- ❖ LMA con ciertas anomalías genéticas:
 - LMA con ciertas anomalías genéticas
 - LMA con una translocación entre los cromosomas 8 y 21
 - LMA con una translocación o inversión en el cromosoma 16
 - LMA con una translocación entre los cromosomas 9 y 11
 - APL (M3) con una translocación entre los cromosomas 15 y 17
 - LMA con una translocación entre los cromosomas 6 y 9
 - LMA con una translocación o inversión en el cromosoma 3
 - LMA (megacarioblástica) con una translocación entre los cromosomas 1 y 22
- ❖ LMA con cambios relacionados con mielodisplasia
- ❖ LMA relacionado con administración previa de quimioterapia o radiación
- ❖ LMA no especificada de otra manera (Esto incluye casos de LMA que no corresponde a uno de los grupos anteriores, y es similar a la clasificación FAB.)
 - LMA con maduración mínima (M1)
 - LMA con maduración (M2)
 - LMA con maduración (M2)
 - Leucemia mielomonocítica aguda (M4)
 - Leucemia monocítica aguda (M5)
 - Leucemia eritroide aguda (M6)
 - Leucemia megacarioblástica aguda (M7)
 - Leucemia basófila aguda
 - Panmielosis con fibrosis aguda

El desarrollo y estandarización de nuevas herramientas de diagnóstico en el campo de las neoplasias malignas hematológicas han permitido realizar diagnósticos cada vez más rápidos y preciso durante la última década, varias técnicas moleculares han aportado nuevas perspectivas en la clasificación y el seguimiento de la efectividad del tratamiento de este tipo de patologías. ⁶

2.1.8 Tratamiento

Los pacientes con sospecha de leucemia deben ser referidos con un especialista en hemato-oncología para confirmar el diagnóstico. El tipo de tratamiento dependerá en la clasificación de la leucemia, así como, en los resultados de los estudios citogenéticos y moleculares, edad del paciente y condiciones comórbidas.

El esquema puede incluir quimioterapia, radiación, uso de anticuerpos monoclonales o trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. El manejo óptimo de los pacientes con leucemia requiere, además, la minuciosa atención de puntos importantes en el cuidado de soporte, la prevención de complicaciones metabólicas o infecciosas y la administración de derivados de productos sanguíneos.^{1, 4}

La duración del tratamiento es de aproximadamente 2-2.5 años y comprende tres fases: Inducción a la remisión, intensificación o consolidación y continuación o mantenimiento, aunque algunos autores refieren una cuarta fase que consiste en terapia dirigida al sistema nervioso central (SNC) para la prevención de recaídas.^{15,16}

A) Inducción a la remisión

El objetivo principal es destruir a la mayor parte de células leucémicas y reestablecer la hematopoyesis. Los agentes más empleados son vincristina, corticoesteroides (prednisona o dexametasona) y L-asparaginasa, se pueden incluir antracíclicos como daunorrubicina o mitoxantroma. Esta fase tiene una duración aproximada de 4 a 6 semanas.¹⁶

B) Consolidación

Se inicia justo después de recuperar la hematopoyesis normal y su principal objetivo es eliminar las células residuales que hayan superado la etapa de remisión, dura de entre 6 a 9 meses y es administrada sin necesidad de internamiento hospitalario. Incluye quimioterapéuticos no utilizados en la fase de inducción en combinaciones que maximizan la sinergia y minimizan los efectos de resistencia. Entre ellos se incluyen mercaptopurina, metrotexate, ciclofosfamida, citarabina y tioguanina.¹³

C) Mantenimiento.

Tiene como objetivo destruir las últimas células residuales leucémicas y es a largo plazo (2-3 años). Se utilizan fármacos que afectan la síntesis de ADN, como 6-mercaptopurina administrado vía oral diariamente y metrotexato semanal, también se puede incluir vincristina y prednisona administradas cada 3 meses.¹³

D) Terapia dirigida a Sistema Nervioso Central SNC

A pesar de que se logre alcanzar una remisión completa, muchos pacientes generan recaída debido a la infiltración de la enfermedad en el SNC. Esto puede evitarse mediante un tratamiento profiláctico dirigido, el cual consiste en administración intratecal de quimioterapia, ya que de forma sistémica el fármaco no es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica. Comúnmente se emplea metrotexate solo o en combinación con citarabina e hidrocortisona.¹⁶

2.1.9 Vincristina

Este fármaco es un alcaloide natural presente en pequeñas cantidades en las hojas de la planta *Catharantus roseus*. Desde el siglo XVII ha sido conocida por sus propiedades medicinales, algunos extractos eran utilizados para detener las hemorragias, sanar el escorbuto, úlceras diabéticas, aliviar el dolor de muelas, y bajar el nivel de azúcar en sangre.¹⁷

La estructura molecular de vincristina es asimétrica y dimérica, compuesta de un núcleo de dihidroindol, vindolina, unida por un enlace carbono-carbono a un núcleo indol, catarantina (Figura 7), es comercializada como sulfato de vincristina, que es la sal de sulfato 1: 1 del alcaloide extraído de la planta.

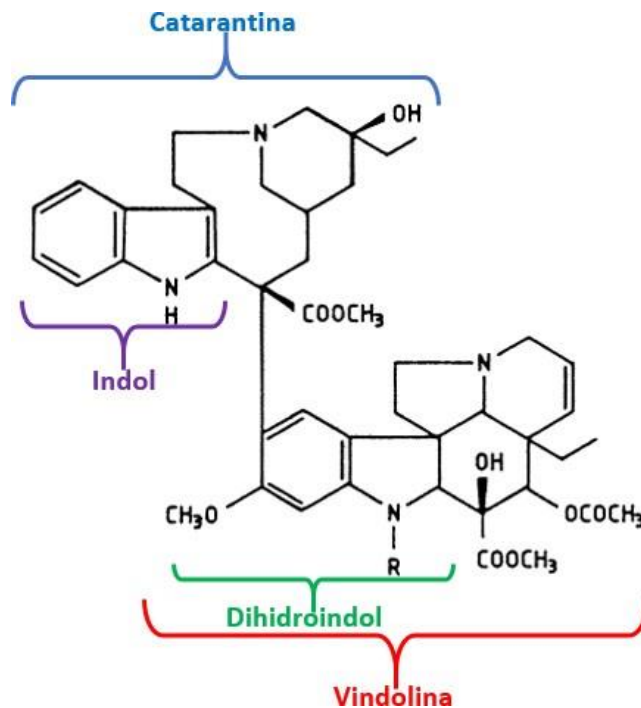


Figura 7. Estructura química de la Vincristina. Modificado de Watt J. et.al.¹⁷

En 1957 Noble demostró que al administrar en ratas ciertas fracciones de *Catharanthus roseus* se producía granulocitopenia periférica y supresión de medula ósea. Esto no solo prolongaba la vida, sino que también curaba la leucemia en ratones con un rango aceptable de efectos secundarios. En 1962 se publicó por primera vez el uso de la vincristina, entonces llamada leucrostina. Desde entonces se han encontrado varias aplicaciones clínicas como quimioterapéutico del cáncer.^{18,19}

Actualmente muchos pacientes con cáncer pediátrico son tratados con este fármaco en su esquema de quimioterapia para enfermedades hematológicas o tumores sólidos, debido a un mayor nivel de sensibilidad y a una mejor tolerancia de los niños a dosis relativamente mayores, en comparación con el tratamiento en adultos.²⁰

A) Mecanismo de acción

La vincristina ejerce muchos efectos sobre las células, usando una gran variedad de mecanismos para generar el efecto antitumoral. El mecanismo más común es la interferencia con los microtúbulos del huso mitótico, que tiene como consecuencia la inhibición de la mitosis y provoca la muerte celular.²¹

Son estructuras muy dinámicas que están involucradas en varios procesos celulares, tales como movimiento celular, transporte intracelular y división. Están constituidos por una estructura básica de heterodímeros de tubulina, los cuales se conforman por α y β tubulina.²²

Los alcaloides de la vinca se unen a la subunidad β de la α - β tubulina en la fase S del ciclo, provocando su desestabilización, lo cual evita la polimerización de tubulina e induce la despolimerización de los microtúbulos formados. Una vez que se suprime la dinámica microtubular se provoca un bloqueo en la transición metafase-anafase durante la mitosis, lo cual es detectado por el punto de regulación celular e induce la apoptosis.²³ (Figura 8)

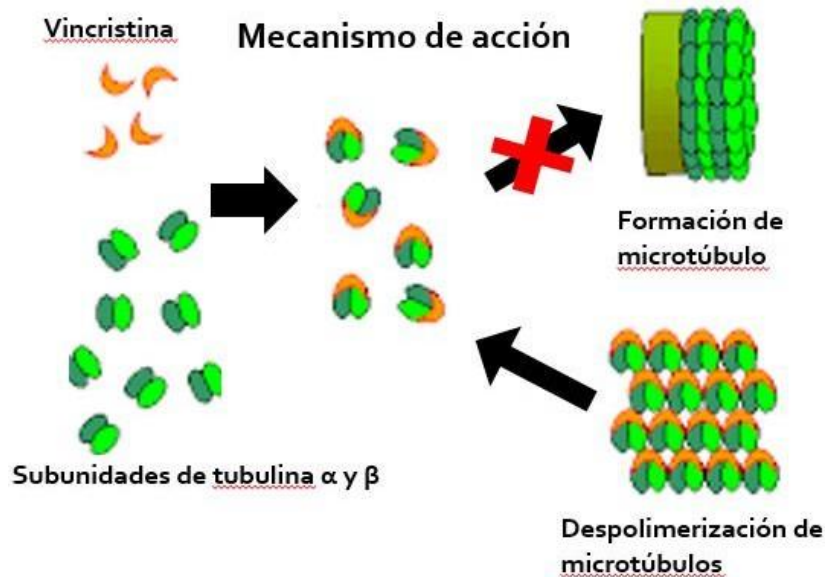


Figura 8. Mecanismo de acción de vincristina. Modificado de Ying Z. et.al. ²⁴

B) Farmacocinética

La vincristina se administra exclusivamente por vía parenteral. Se distribuye ampliamente en los tejidos corporales y se fija rápidamente a los eritrocitos y plaquetas. Se admite que el fármaco experimenta una cinética tricompartmental, con semividas plasmáticas de 0.8, 7.4 y 164 min. No atraviesa la barrera hematoencefálica, no puede ser eliminada del líquido cefalorraquídeo, por lo que la administración intratecal accidental produce inexorablemente la muerte del paciente.²⁵

C) Farmacodinamia

Aproximadamente el 50 % de la dosis es metabolizada en el hígado, siendo excretada en su mayor parte en la bilis y las heces, bien como fármaco nativo, o en forma de metabolitos. El 66 % de la dosis es eliminada por vía biliar en las 72 horas siguientes a su administración. La semivida final de eliminación oscila entre 23 y 85 horas. Esta larga semivida de eliminación es la responsable de la neurotoxicidad que inducen las dosis repetidas, por la acumulación del fármaco (Figura 9) ²⁵

Debido a su extensa eliminación por vía biliar, los pacientes con obstrucciones biliares pueden necesitar un reajuste de la dosis. Se utiliza usualmente una reducción del 75 % de la dosis cuando los niveles de bilirrubina directa son > 3 mg/dL.²⁵

D) Posología en pacientes pediátricos con LLA

Niños > 10 kg: $1.5\text{--}2$ mg/m² (máximo = 2 mg) semanalmente durante la fase de inducción.

Niños < 10 kg: 0.05 mg/kg una vez a la semana, con un aumento progresivo de la dosis hasta un máximo de 2 mg, durante la fase de inducción.²⁵

La sobredosis con vincristina produce extensiones de efectos adversos comunes. Las dosis que son 10 veces mayor a la dosis habitual recomendada han sido letales en niños menores de 13 años de edad, y se han observado manifestaciones graves de toxicidad después de la administración de $3\text{--}4$ mg/m² en este grupo de edad. Se puede esperar que dosis únicas de 3 mg/m² produzcan manifestaciones tóxicas graves en adultos.²⁶

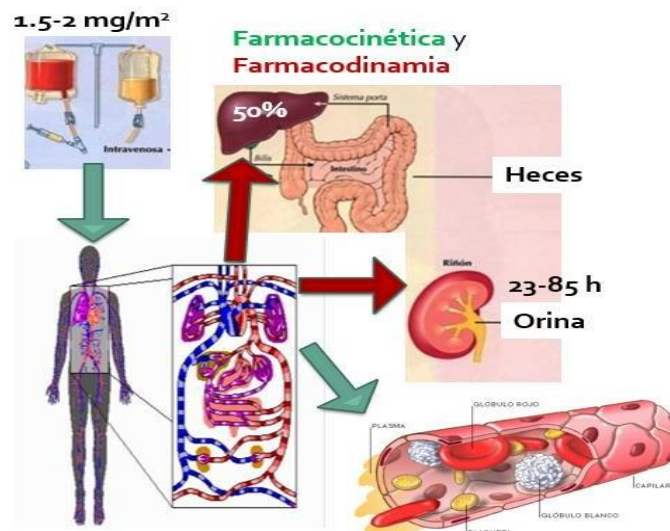


Figura 9. Eliminación de vincristina. Modificado de Dreamstime. 14

2.1.10 Quimio resistencia

Los mecanismos involucrados en la resistencia *in vitro* incluyen la retención intracelular del fármaco, así como cambios en la tubulina, que producen deficiencia de afinidad en la unión entre la tubulina y la vincristina, lo cual interfiere en la acumulación del fármaco en la célula. De igual manera estos cambios alteran el equilibrio entre los microtúbulos que están polimerizados y los que no lo están, esta estabilidad es esencial durante los procesos de mitosis, por lo que la citotoxicidad del fármaco se puede ver alterada.²³

La sobreexpresión anormal de β III tubulina puede afectar la respuesta de agentes tubulares de unión a células tumorales. Las proteínas que regulan los microtúbulos como la estatmina, también están asociada a la resistencia a vincristina.²³

En la figura 10 se representa: en líneas punteadas azules el curso de la hematopoyesis normal y en líneas punteadas café la contraparte leucémica en individuos sensibles a la quimioterapia, la línea sólida roja muestra la permanencia de la hematopoyesis leucémica a expensas de la normal en situaciones de quimio resistencia a vincristina

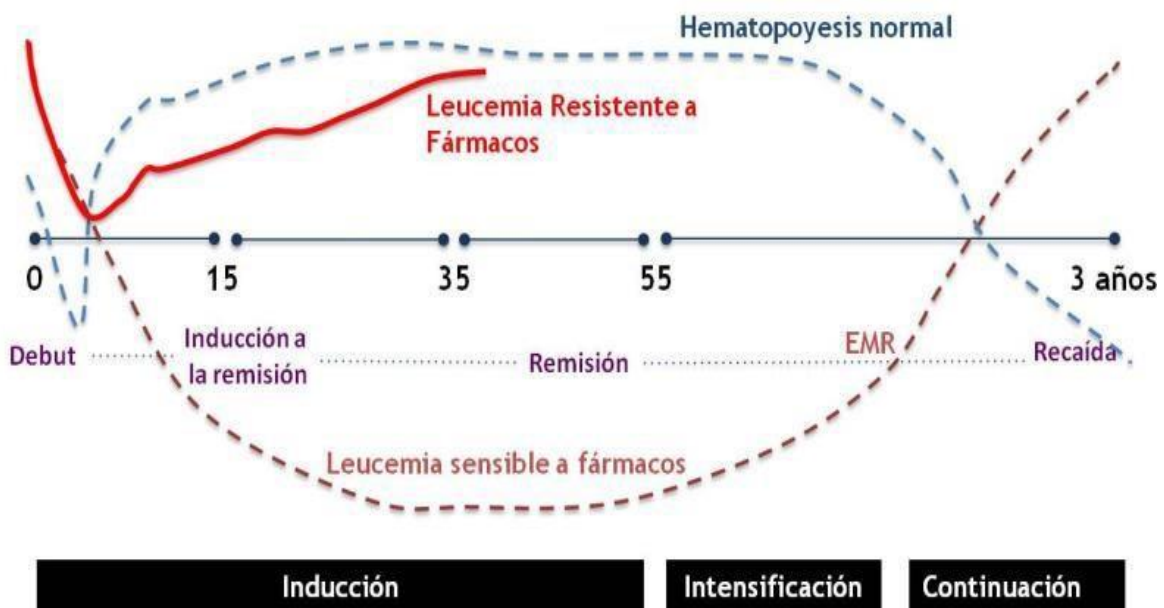


Figura 10. Cinética y tratamiento clínico de LLA pediátrica. Modificado de Rivera-Luna R. et.al.¹¹

2.2MICROAMBIENTE TUMORAL

Los regímenes de tratamiento de LLA han mejorado drásticamente la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, la enfermedad mínima residual que es quimio resistente puede persistir una vez que la terapia termina, esto contribuye a una recaída agresiva. El microambiente de la médula ósea (BMM) es un "sitio de santuario" para la LLA, esta ubicación anatómica le confiere señales que contribuyen a la resistencia a los medicamentos. ²⁷¹

Dado que la leucemia no se propaga en cualquier parte del cuerpo y es difícil de crecer *ex vivo*, se pensó que las células cancerosas dependen del microambiente de la médula ósea (BMM). Además, también se pensó que las células madre leucémicas (LSC) interactúan con el BMM de maneras que pueden afectar tanto al LSC como al BMM, tal vez modulando las vías moleculares de las que dependen las células normales. Examinar el BMM puede proporcionar oportunidades para alterarlo de tal manera que sea menos hospitalario para las células malignas. ²⁷

La composición del BMM es compleja e incluye múltiples poblaciones de células diferentes que se ha informado que participan en el soporte de células progenitoras y hematopoyéticas normales. Estos incluyen células de tipo arteriolar y sinusoidal, células endoteliales, células de oste linaje, osteoclastos, osteocitos, adipocitos, neuronas simpáticas, células de Schwann no mielinizantes, células madre mesenquimales, células reticulares abundantes en Cxcl12, macrófagos, megacariocitos y la matriz extracelular (Figura 11). Estos elementos afectan el número de células madre / progenitoras hematopoyéticas (HSC), la ubicación, la proliferación, la autorrenovación y la diferenciación, y probablemente alteren parámetros similares de las LSC. ²⁷

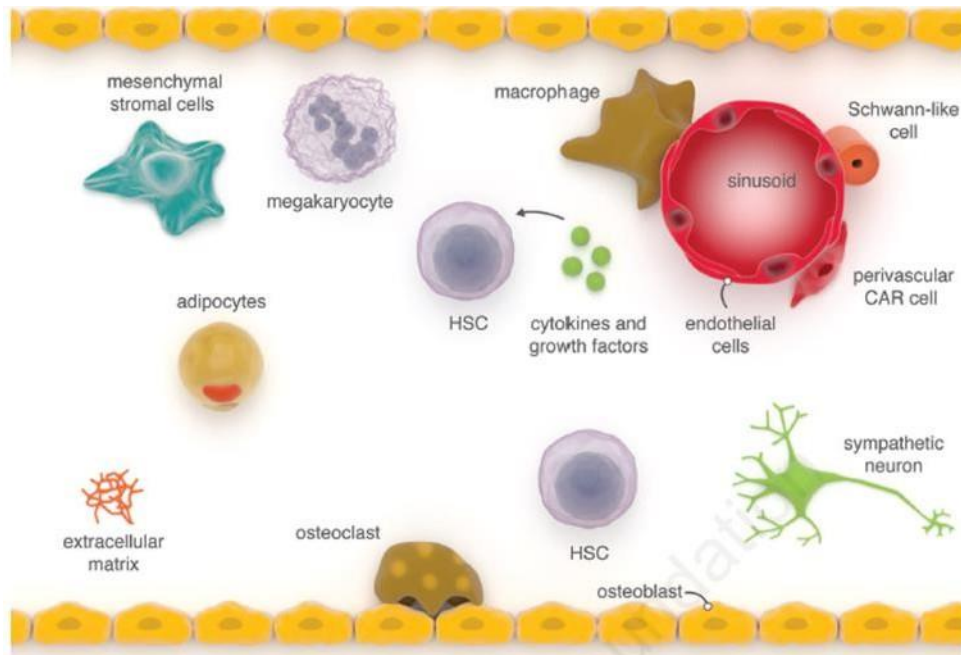


Figura 11 Composición del nicho de la médula ósea ²⁷

Según hallazgos en la médula ósea normal, se probó la alteración del BMM y se descubrió que conducía a anomalías hematológicas. Así como el BMM puede influir en la leucemia, esta puede moldear el BMM de la manera más beneficiosa para la supervivencia de las células leucémicas.

Se han descrito varios mecanismos que conducen a la quimio resistencia en las células leucémicas mediadas por el BMM. En un modelo murino de LLA y en pacientes humanos, quedaron pequeños focos de células propagadoras de leucemia después de la quimioterapia. El microambiente tumoral también inhibe el ataque de las células tumorales, que han sido atacadas por anticuerpos, macrófagos y muerte mediada por macrófagos. ²⁸

La evidencia continúa demostrando que las interacciones dinámicas entre las células B y su microambiente tumoral (MAT) influyen profundamente en el comportamiento del otro. Hace más de una década, se propuso el concepto de resistencia a los medicamentos mediada por la adhesión celular para delinear una forma de resistencia a los medicamentos mediada por MAT que protege los tumores malignos de células B y otras células tumorales hematopoyéticas del efecto inicial de diversas terapias. ²⁹

Desde entonces, se han afirmado estos hallazgos y han demostrado que los efectos de MAT en la respuesta al fármaco son multifactoriales, involucrando: citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento e interacciones malignas de células B con otros constituyentes de MAT, incluidas, pero no limitadas, a células estromales. Por lo tanto, el término Resistencia a los Medicamentos Mediada por el Microambiente, (EMDR) por sus siglas en inglés, se ha utilizado como un término más amplio para describir los múltiples aspectos que contribuyen a la influencia de MAT en la respuesta y resistencia a los medicamentos (además de la adhesión celular). ³⁰

Cómo tal, se ha planteado la hipótesis de que, aunque la mayoría de las células tumorales sucumben a la terapia, un subconjunto de células malignas tiene refugio dentro del MAT. Dentro de estos santuarios, las células malignas sobreviven al estrés de la terapia, lo que resulta en una enfermedad mínima residual. Con el tiempo, la inestabilidad genética inherente a las células de cáncer combinada con la fuerte presión selectiva de la terapia (y MAT) conducen a cambios sucesivos que causan el desarrollo de fenotipos de resistencia adquirida más complejos, diversos y permanentes. Estas células tumorales persistentes eventualmente causan recurrencia de la enfermedad y son mucho menos propensas a responder a la terapia posterior después de que se desarrolla la resistencia adquirida (Figura 12)³¹

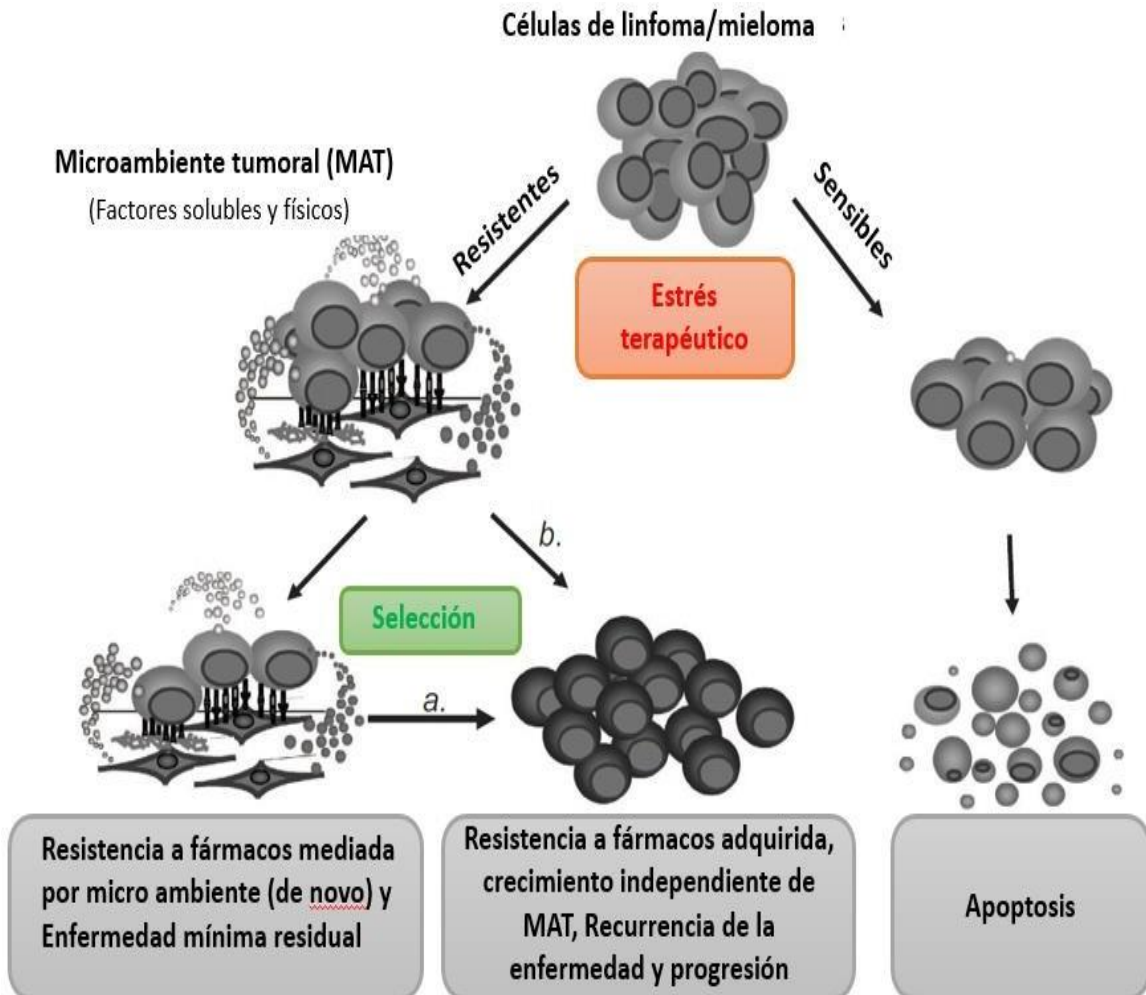


Figura 12. Desarrollo de resistencia adquirida en el microambiente tumoral ³¹

2.3 LINEAS CELULARES

2.3.1 CCRF - SB

La línea celular CCRF-SB fue obtenida a partir de sangre periférica de humano *Homo sapiens* género masculino de edad 11.5 años con LLA diagnosticada de estirpe celular Linfoblasto B.

Dicha línea celular se mantiene en suspensión y se propaga en medio de crecimiento RPMI 1640 al 90 % con suero fetal bovino al 10 % o con medio modificado de Iscove's Dubelco's al 90 % y suero fetal bovino al 10 %.³²

ATCC Number: CCL-120

Designation: CCRF-SB [CCRF SB]

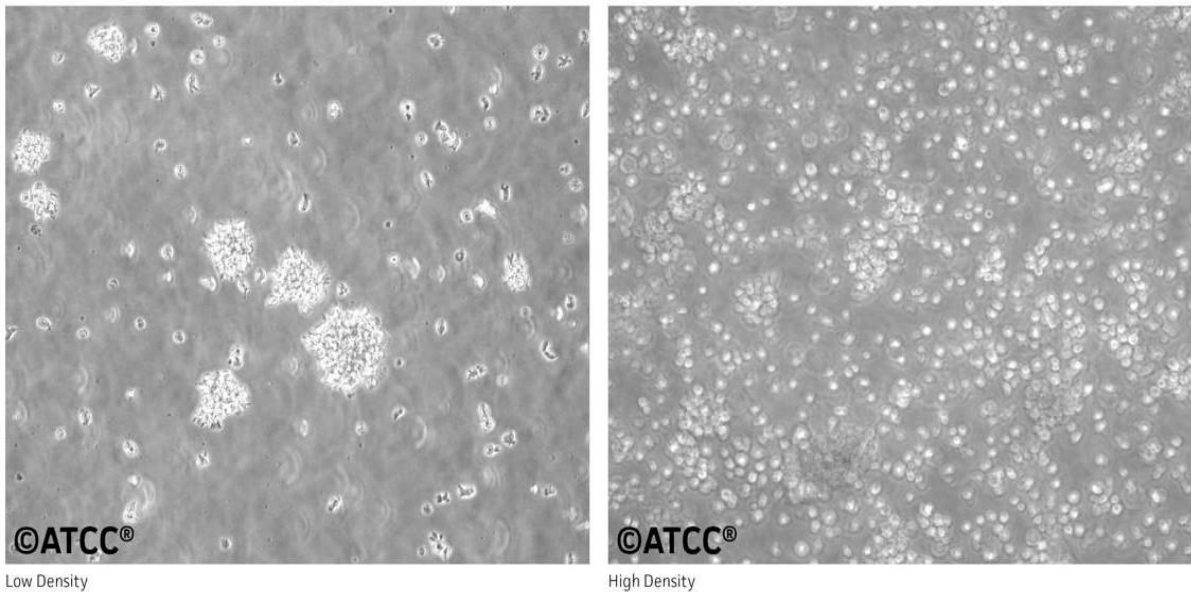


Figura 13. Células de CCRF-SB. CCL-120 vistas al microscopio. Su morfología se distingue por tener un citoplasma escaso y nucléolos indistinguibles.³²

2.3.2 OP9

La línea celular OP9 es obtenida de médula ósea de ratón *Mus musculus* de linaje (C57BL/6 x C3H)F2 op/op en etapa embrionaria.

Esta línea celular se propaga en medio de crecimiento Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) con ausencia de ribonucleósidos y deoxiribonucleósidos y 2.2 g/L de bicarbonato de sodio, el medio de crecimiento se complementa con suero fetal bovino a una concentración final de 20 %. ³³

ATCC Number: **CRL-2749**™
Designation: **OP9**

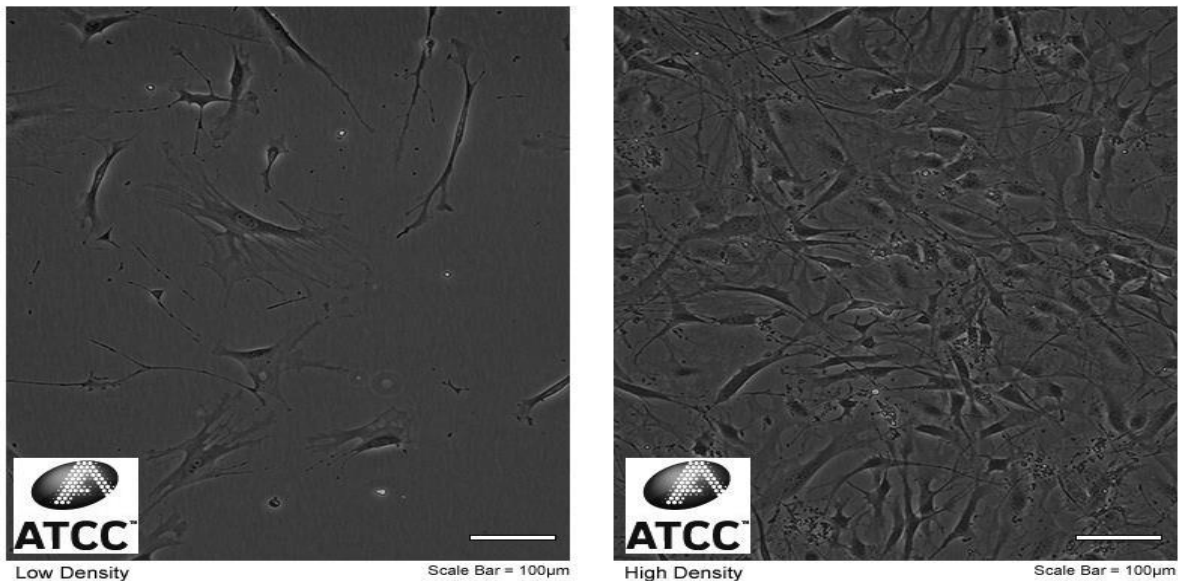


Figura 14. Células de OP9. CRL-2749 vistas al microscopio. Son células madre embrionarias de tipo adherentes con morfología similar a fibroblasto ³³

2.4 PROTEÓMICA

La comprensión de las neoplasias hematológicas a nivel de proteínas es importante ya que el desarrollo de tratamientos dirigidos debe basarse en el conocimiento sobre la patogenia del tumor, la variación genética heredada y el modo de acción de los fármacos.³⁴

La proteómica es un conjunto de metodologías empleadas para la separación, identificación y caracterización de las proteínas expresadas en un genoma específico con respecto a su función y a las interacciones que se establecen entre ellas. El análisis proteómico proporciona una mejor comprensión de la regulación de la función celular a través de las señalizaciones y la respuesta a estímulos específicos para poder entender los procesos celulares tales como; proliferación, apoptosis, motilidad y desarrollo; y poder relacionar estos cambios en las proteínas con estados normales y procesos patológicos.³⁵

Uno de los métodos utilizados para separar mezclas muy complejas de proteínas es la electroforesis bidimensional, tras su separación inicial por su punto isoeléctrico seguida de una separación por su masa molecular. Otra técnica de separación muy útil es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La identificación de proteínas se hace por espectrometría de masas (MS). La proteólisis con tripsina genera numerosos péptidos que se convierten en iones en fase gaseosa por técnicas de ionización suave. Si la muestra es sólida se usa la ionización por desorción láser asistida con matriz (MALDI), si es líquida la ionización por electrospray (ESI). La separación de iones por su relación masa/carga (m/z) en un analizador de masas (tiempo de vuelo, TOF, cuadrupolo, Q, o trampa iónica, TI) permite determinar las masas y obtener un espectro que refleja la abundancia de los iones frente al valor m/z . Usando un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS), que combina dos analizadores diferentes, se puede llevar a cabo la fragmentación de los iones peptídicos seleccionados. Una vez que se obtiene el espectrograma, se puede utilizar una base de datos para relacionar el espectro con secuencias peptídicas contenidas en las bases de datos y a su vez identificar las proteínas que se encuentran presentes dentro de la muestra.^{36,37}

2.4.1 Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia es altamente compatible con el posterior análisis de espectrometría de masas debido a que proporciona una separación de alta resolución de la muestra. Este proceso se basa en la hidrofobicidad del analito con respecto a la fase estacionaria, la cual consiste en una columna con cadenas de alquilo de 8 o 18 carbonos de longitud. Este sistema está acoplado a un espectrómetro de masas en el cual se realiza el análisis. Las moléculas de la muestra deben estar cargadas eléctricamente y secas, para que esto ocurra se utiliza una ionización por electrospray (ESI).³⁸



Figura 15. HPLC Equipo de cromatografía de líquidos de alta eficacia. Thermo Fisher Ultimate 3000. En este estudio se utilizó un cromatógrafo como éste en configuración de nanoflujo (250 nL/min).³⁹

2.4.2 Espectrometría de masas

Por definición, un espectrómetro de masas consiste en una fuente de iones, un analizador de masas que mide la relación masa-carga (m / z) de los analitos ionizados, y un detector que registra el número de iones en cada valor de m / z . Las mediciones de espectrometría de masas se llevan a cabo en fase gaseosa de los analitos ionizados.

Para la identificación de péptidos en mezclas complejas, la medición de la masa del péptido por sí solo no es suficientemente informativo, el enfoque más aplicable implica el análisis de la fragmentación de componentes. En un escaneo inicial, las masas de los componentes intactos se miden, y luego, en un escaneo subsiguiente, los componentes individuales se aíslan en el espectrómetro de masas y luego se fragmentan. Una selección de diferentes configuraciones en los instrumentos puede ser empleada para realizar este tipo de análisis.⁴⁰

A) Fuente de iones

La ionización por electrospray ESI es un proceso de nebulización continua que produce iones directamente desde la solución y facilita la interacción de cromatografía líquida (LC) con MS ya que convierte la muestra líquida en una niebla de carga por medio de gotas pequeñas. Se inyecta la muestra a una velocidad de 1 a 10 $\mu\text{L} / \text{min}$ a través de un capilar mantenido a un alto potencial con respecto al contraelectrodo. El fuerte campo eléctrico obtenido induce la acumulación de carga en la superficie del líquido situada en el extremo del capilar y conduce a la formación de una niebla de gotitas altamente cargadas. Estas gotas se encogen a medida que el solvente se evapora y expulsan más iones en la fase gaseosa, el proceso se detiene cuando la densidad de carga en la gota alcanza un nivel crítico. (Figura 14) ESI generalmente se opera a presión ambiental, mientras que el espectrómetro de masas está funcionando en alto vacío. El proceso ESI resulta en la formación de iones con carga múltiple. Esta es una de las principales ventajas de este método, ya que permite el análisis de iones de moléculas de alta masa molecular, como proteínas y péptidos, utilizando espectrómetros de masas con un rango de relación m / z limitado.³⁸

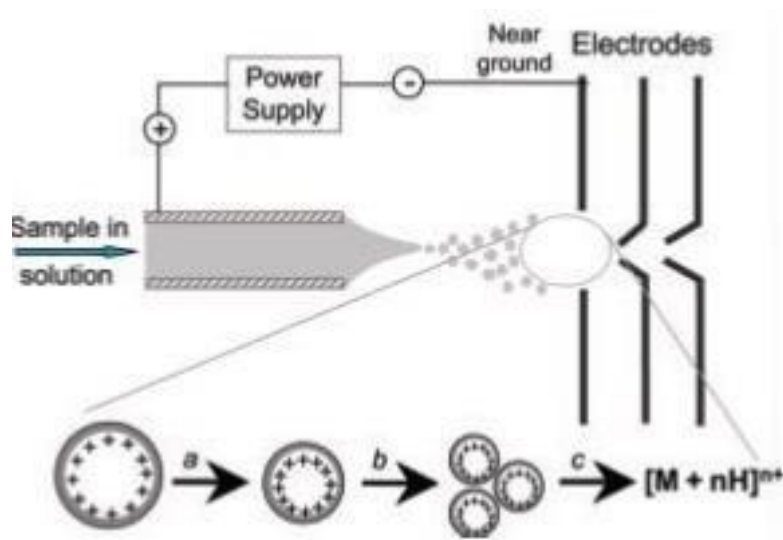


Figura 16. Ionización por Electrospray. Modificado de Cristea I.M. et al.⁴⁰

B) Analizador de masas

El analizador de masas es, la parte central de la tecnología en el contexto de la proteómica, sus parámetros clave son sensibilidad, resolución, precisión de masa y la habilidad generar espectros de masa ricos en información a partir de los fragmentos de péptidos. Hay varios tipos de analizador de masas, actualmente los más utilizados en la investigación proteómica son la trampa de iones, tiempo de vuelo (TOF) y cuadrupolo, todos son muy diferentes en diseño y rendimiento, cada uno con su propia fuerza y debilidad. Estos analizadores pueden ser independientes, en algunos casos se encuentran unidos en tándem.³⁶

- Trampa de iones (IT)

En los analizadores de trampa de iones, los iones son primero capturados durante un cierto intervalo de tiempo y luego son liberados selectivamente para ser sometidos a un análisis MS o MS / MS. Una desventaja de las trampas de iones es que su precisión de masa es relativamente baja, debido en parte a la cantidad limitada de iones que se pueden acumular antes de que la carga espacial distorsione su distribución y, por lo tanto, la precisión de la medición de masa. La trampa de iones "lineal" o "bidimensional" es un desarrollo reciente donde los iones se

almacenan en un volumen cilíndrico que es considerablemente más grande que el de las tradicionales trampas de iones tridimensionales, lo que permite aumentar sensibilidad, resolución y precisión de masa, un ejemplo de estas trampas es la reciente orbitrap.³⁶

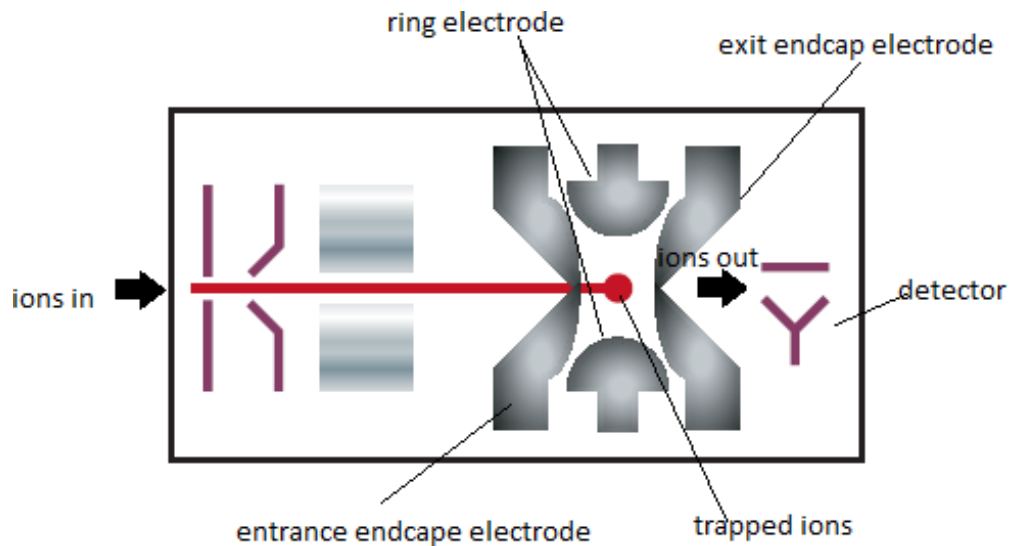


Figura 17. Trampa de iones. Modificado de Aebersold R. et al.³⁶

- Cuadrupolo (Q)

Es un conjunto de cuatro barras lineales, similar a una trampa de iones lineal, pero sin las tapas finales. Las variaciones existen con seis (hexápolo) u ocho barras (octópolo), pero todas son funcionalmente iguales. Básicamente seleccionan campos eléctricos variables en un determinado tiempo, lo que permite una trayectoria estable solo para iones de m/z particular, los cuales atraviesan con éxito la cámara. Un cuadrupolo puede ser operado en modo de selección masiva, donde todos los iones de un cierto m/z pueden separarse de los demás y atravesar la cámara, o en un modo de escaneo, donde los voltajes se amplifican en un rango de valores y en un tiempo determinado. Los iones que atraviesan la cámara pueden ser posteriormente inducidos en una celda de colisión para ser fragmentados.⁴¹(Figura16)

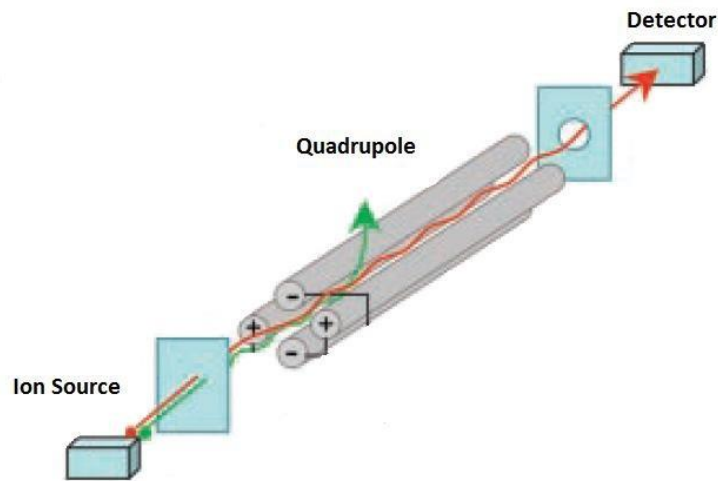


Figura 18. Cuadrupolo. Los valores de radiofrecuencias en un momento dado permiten el paso de los iones con trayectoria anaranjada, mientras que los de trayectoria verde son desviados y descartados. Unos milisegundos más tarde los valores de radiofrecuencias cambian y permiten el paso y detección de iones con valores de m/z diferentes. Modificado de Cristea I.M. et al.⁴⁰

- Tiempo de vuelo (TOF)

La base del análisis de masa por tiempo de vuelo (TOF) reside en el hecho de que cuando los iones se aceleran con la misma energía cinética, los iones de mayor m/z tendrán una velocidad menor. Por lo tanto, al medir el tiempo que tardan los iones en viajar a lo largo de una trayectoria de vuelo hacia un detector es posible determinar su m/z . La mayoría de los espectrómetros de masas TOF, en lugar de tener una ruta de vuelo lineal simple para el detector, emplean un espejo iónico o un reflector que "rebota" los iones hacia un detector en el otro extremo del tubo. Este es un mecanismo que permite la compensación parcial de cualquier variación en la energía cinética inicial que los iones puedan haber tenido; si dos iones de la misma m/z tienen energías cinéticas iniciales ligeramente diferentes, entonces el que tiene una energía cinética más alta tendrá una velocidad ligeramente más alta y así penetrará más profundamente en el reflector de iones, por lo que le tomara más tiempo reflejarse. Si se tiene el detector posicionado con un enfoque correcto, los dos iones con el mismo m/z , pero energías cinéticas iniciales ligeramente diferentes serán detectados al mismo tiempo (Figura 17). El uso de un reflector mejora la

resolución y la precisión en la detección de la masa de los espectrómetros de masas TOF, proporcionando un rendimiento mejor en comparación con el de una trampa de iones cuadrupolar.⁴²

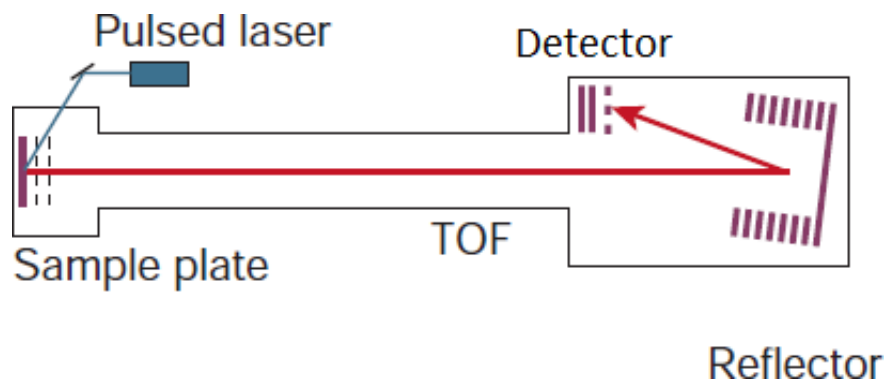


Figura 19. Tiempo de vuelo con reflector. Modificado de Cristea I.M. et al.⁴⁰

C) Detector

Los detectores convierten el flujo de iones en una señal eléctrica que puede ser amplificada, almacenada y presentada de forma que se pueda interpretar. Sus características más importantes son: sensibilidad, exactitud, resolución, tiempo de respuesta, estabilidad, amplio intervalo dinámico y un nivel de ruido bajo. Debido a la cantidad de información que se genera se necesita un sistema informático para el control del equipo, así como para la adquisición, almacenamiento y presentación de espectros. Se incluyen software para la interpretación de espectros e identificación de compuestos mediante la utilización de bibliotecas de espectros.⁴³

2.4.3 Bioinformática

Una vez que los datos de LC-MS / MS han sido adquiridos, necesitan ser procesados y convertidos antes de realizar una búsqueda en la base de datos que conlleve a la identificación de péptidos y proteínas. Una vez que se ha determinado una lista de todas las proteínas presentes en una muestra, se puede utilizar un software bioinformático referente a la función, localización, e interacciones conocidas⁴⁴

Producir una lista de alta calidad a partir de los datos brutos es crucial para obtener un resultado de datos de proteínas que sea confiable. La lista de picos ideal debería contener los fragmentos de los iones peptídicos en el espectro MS / MS y sin picos de ruido o masas extrañas, pero en la práctica esto puede ser difícil de lograr y no siempre es necesario ya que los motores de búsqueda de las bases de datos pueden hacer frente a una buena cantidad de ruido.³⁵

Hay varios métodos diferentes para identificar las proteínas en la muestra, y el más utilizado es la búsqueda de datos no interpretados. Para realizar este método con datos de MS / MS no interpretados de un solo péptido o de una ejecución completa de LC-MS / MS, se utiliza software que relaciona listas de fragmentos de iones de masa y valores de intensidad a péptidos en una base de datos. La masa precursora se utiliza como filtro para encontrar una lista de secuencias peptídicas candidatas en una base de datos de digestiones teóricas. Se utilizan una variedad de sistemas diferentes para puntuar el espectro experimental de MS / MS frente a los espectros predichos a partir de las secuencias peptídicas candidatas. Los algoritmos de puntuación van desde filtros simples a algoritmos de correlación cruzada a métodos probabilísticos verdaderos, y se usa un umbral de identidad para determinar qué péptidos son significativos.^{45, 46}

La información sobre proteínas se almacena en una variedad de fuentes en todo el mundo. Las fuentes de datos utilizadas en este proyecto provienen de programas como: MaxQuant, MASCOT, DAVID, Reactome y String. La información que proveen dichos programas varía desde la secuencia de ADN o aminoácidos hasta la estructura tridimensional de una proteína, las modificaciones postraduccionales conocidas, la función, localización y las interacciones⁴⁷

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la población infantil mexicana, el cáncer es la segunda causa de muerte en niños solo precedida por accidentes. El tipo más común de cáncer es la LLA, que comprende aproximadamente la mitad de todos los casos reportados en los últimos cinco años.

La supervivencia global estimada para todos los tipos de cáncer en menores de edad es del 56 %. Si bien esto representa avance significativo en relación con años previos, México aún se encuentra por debajo de los estándares encontrados en países más desarrollados, ya que en estos lugares se estima que el 80 % de los pacientes alcance la remisión completa.

La principal causa de muerte no evitable en los pacientes con LLA es la recaída o falta de remisión, debido a la quimio resistencia que pueden generar las células leucémicas durante el tratamiento. Una de las razones de la quimio resistencia en LLA es la protección que las células de la médula ósea brindan a los blastos malignos durante los cursos de quimioterapia. Las proteínas extracelulares y los procesos intracelulares a través de las cuales se lleva a cabo esa protección no han sido completamente caracterizadas. La identificación de los cambios proteómicos que ocurren durante esa protección podría facilitar en el futuro el diseño de estrategias para bloquear las señales involucradas y así reducir la tolerancia a fármacos. Especialmente a Vincristina que es utilizado mayormente en los esquemas de quimioterapia infantil.

4. HIPÓTESIS

El análisis proteómico de las señales celulares en cocultivos de células leucémicas y células estromales de médula ósea, en presencia y ausencia de vincristina, permitirá identificar algunas proteínas clave en el fenómeno de quimio resistencia inducida por el microambiente tumoral.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las proteínas a través de las cuales se establece la comunicación intercelular que conduce a la proliferación y quimio resistencia de células leucémicas cuando se cocultivan con células estromales de médula ósea.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar estructuras tridimensionales tipo organoide (cocultivos 3D) que simulan el contexto del microambiente tumoral en la médula ósea.
- Determinar la sensibilidad de las células del cocultivo 3D a las 24 horas de exposición a vincristina.
- Determinar la sensibilidad de las células CCRF-SB en monocultivo a las 24 horas de exposición a vincristina.
- Conocer el nivel de protección que brinda el microambiente tumoral a las células CCRF-SB mediante la comparación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) en monocultivo y cocultivo.
- Extraer y purificar el proteoma total de los cultivos celulares expuestos a vincristina durante 24 horas.
- Analizar el proteoma en un equipo de nanoHPLC-MS para identificar los péptidos y las proteínas presentes.
- Relacionar las proteínas presentes con los mecanismos de proliferación y quimio resistencia mediante un análisis bioinformático en las principales bases de datos.

6.METODOLOGIA

6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

6.1.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio utilizado tiene una finalidad analítica, secuencia temporal longitudinal y prospectiva, y con control de asignación experimental.

6.1.2 Universo

En cada experimento se utilizaron muestras provenientes de una línea celular CCRF-SB de LLA estirpe B establecida a partir de sangre periférica de un paciente masculino caucásico de 11.5 años. Así como de una línea celular OP9 correspondiente a células estromales de medula ósea de tipo adherente obtenidas de ratón. Ambas líneas fueron obtenidas comercialmente.

6.1.3 Variables

➤ Independientes

- Concentración de vincristina (nM)
- Tiempo de exposición
- Número de células empleadas

➤ Dependientes

- Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)
- Viabilidad celular
- Proteínas y péptidos expresados

6.1.4 Análisis estadístico

Todos los resultados experimentales fueron expresados como la media de los datos obtenidos. Se utilizó la prueba de normalidad U de Mann-Whitney debido a que se tiene una n menor a 30. Para comparar los dos grupos de datos se usó la prueba de t de Student, esta prueba se utiliza ya que los dos grupos son independientes entre sí. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

6.2 MATERIAL Y MÉTODO

6.2.1 Cultivo celular

La línea celular CCRF-SB fue el modelo de célula leucémica ya que proviene de linfocitos B malignos de un paciente pediátrico de LLA, y la línea OP9 de célula estromal debido a que su origen es de células estromales de médula ósea no tumorales.

Las células CCRF-SB 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 estreptomicina), se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂.

El mismo proceso se utilizó para OP9, se colocaron en cajas para cultivo de 15 cm² con medio α -MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1 mM de piruvato, 1 mM de glutamina y 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomicina), se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂.

Se mantuvieron ambas líneas celulares en estas condiciones con cambios de medio de cultivo, cada segundo o tercer día en una confluencia no menor a 85 % de sobrevida.

6.2.2 Evaluación de la sensibilidad a vincristina del monocultivo CCRF- S

Se utilizó el ensayo colorimétrico XTT para evaluar la viabilidad de las células CCRF-SB después de la exposición a vincristina de 24 horas. El ensayo mide la disminución de la viabilidad de las células debido a que las células viables y con metabolismo activo convierten el reactivo del XTT (amarillo), por medio de la deshidrogenasa mitocondrial, en formasa (naranja), cuya absorbancia puede ser detectada.

Para determinar la IC_{50} se colocan las células en una placa de 96 pozos de fondo plano, en cada pozo se colocan 50,000 células con una viabilidad inicial superior al 85 %. En cada pozo se coloca una concentración diferente de vincristina (3, 6, 9, 12, 15 y 100 nM) en un volumen total de 100 μ L de medio RPMI. Como controles se utilizan células sin vincristina y medio sin células. El ensayo se realizó por triplicado. Se incuban a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas, pasado este tiempo se agregan 50 μ L el reactivo XTT y se incuba en las mismas condiciones por 4 horas. Finalmente se mide la absorbancia de cada pozo en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de referencia de 620 nm y una longitud de onda de fondo de 450nm.

Para calcular la viabilidad se restó la absorbancia obtenida del control de medio sin células a todas las demás absorbancias de los pozos. Posteriormente, la viabilidad celular se expresó como el porcentaje tomando de referencia el control de células sin fármaco.

6.2.3 Generación estructuras tridimensionales tipo organoide (cocultivos 3D)

Se generaron esferoides de la línea celular OP-9 cultivando de 2 a 4 millones de células hasta alcanzar una confluencia del 80 %, en ese momento la monocapa se tripsinizó y se colocaron 50,000 células (en suspensión con medio α -MEM) por pozo en placas de 96 pozos con fondo redondo y recubrimiento de agarosa al 1 %, la formación de esferoides ocurrió a las 24 horas. Transcurrido este tiempo se agregaron 50,000 células CCRF-SB (en suspensión con medio RPMI) y se cocultivaron por 24 horas hasta que se observó al microscopio óptico la asociación de células CCRF-SB alrededor de los esferoides.

6.2.4 Evaluación de la sensibilidad a vincristina del cocultivo CCRF-SB y OP9

Para determinar la IC_{50} se generó el cocultivo 3D como se menciona en el punto anterior, una vez que se observó la asociación de las células CCRF-SB alrededor de los esferoides se colocó en cada pozo una concentración diferente de vincristina (50, 100, 200, 350 y 450 nM) en un volumen total de 100 μ L de medio RPMI. Se decidió utilizar estas concentraciones debido a que la curva dosis-respuesta en cocultivo presentó una tendencia lineal a concentraciones bajas del fármaco. Como controles se utilizaron células sin vincristina y medio sin células. El ensayo se realizó por triplicado. Se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a disgregar los esferoides para obtener únicamente las células CCRF-SB, las cuales se colocaron en placas de 96 pozos de fondo plano con medio RPMI a un volumen final de 100 μ L y 50,000 células por pozo. Posteriormente se agregaron 50 μ L el reactivo XTT y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 4 horas, pasado este tiempo se midió la absorbancia de cada pozo en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de referencia de 620 nm y una longitud de onda de fondo de 450 nm.

Para calcular la viabilidad se restó la absorbancia obtenida del control de medio sin células a todas las demás absorbancias de los pozos. Posteriormente, la viabilidad celular se expresó como el porcentaje tomando como referencia el control de células sin fármaco.

6.2.5 Obtención de biomasa para análisis proteómico

Para el monocultivo se utilizaron 2×10^6 células CCRF-SB en dos cajas para cultivo de 15 cm^2 (1×10^6 células en cada caja). El número de células se determina contando en una cámara de Neubauer usando azul de Tripán. A una de las cajas se le agregó vincristina en concentración final de 3 nM (aproximadamente 65 % de viabilidad después de 24 horas de exposición a Vincristina) y la otra sin fármaco.

Para el cocultivo se generaron 40 esferoides para obtener 2×10^6 células CCRF-SB. A 20 de los esferoides se les agregó vincristina en concentración final de 40 nM (aproximadamente 65 % de viabilidad después de 24 horas de exposición a Vincristina) y a los esferoides restantes no se les agregó fármaco. Transcurrido el tiempo de exposición se disgregaron los esferoides para obtener únicamente células leucémicas.

Una vez obtenidas las células en condición de monocultivo y cocultivo, con y sin fármaco, se les extrajo el proteoma celular para analizarlo.

6.2.6 Extracción del proteoma total

Para llevar a cabo la lisis de las células, se transfirió la suspensión celular a un tubo falcon y se centrifugó a 600 rpm 5 min para eliminar las células muertas, se descartó el sobrenadante y se lavó el botón celular con 4 mL de solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 1X, la viabilidad celular en este punto fue de 85-90 %. Se recuperó el botón celular y se añadieron 300 μL de solución amortiguadora de lisis, se resuspendió el botón y se transfirió a un tubo eppendorf en donde se sonicó en frío.

Posteriormente se llevó a cabo la reducción dejando en incubación a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min para que actuara el ditioneitol DTT transcurrido el tiempo se le agregó Tris pH 8.6 para llevarlo a 300 mM y Iodoacetamida IAM a 200 mM para alquilar los grupos tiol recién generados por el DTT y evitar que se vuelvan a formar los puentes disulfuro, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min. Posteriormente se tomó todo el volumen del extracto de proteínas y se añadieron 9 volúmenes de alcohol etílico absoluto grado biología molecular, se incubó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche para que precipitaran las proteínas.

Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 15 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados con alcohol etílico al 90 % (no frío). Después de tres lavados se retira el sobrenadante y se deja secar el botón a temperatura ambiente.

Se resuspendió el botón en bicarbonato de amonio (ABC) y cloruro de guanidinio (GndCl) a una concentración final de 50 mM, posteriormente se cuantificó la proteína por el método de Bradford y se realizaron los cálculos necesarios para estimar la concentración de proteína del extracto celular crudo. Una vez conocida la cantidad de proteína se añadió tripsina 1 µg por cada 50 µg de proteína y se incubó a 37 ° C en agitación por 18 horas. Transcurrido este tiempo se acidificó la muestra con ácido fórmico al 0.1 % hasta pH 2-3.

6.2.7 Separación por nano HPLC

Las muestras fueron centrifugadas a 11000 xG por 5 min, se extrajo el sobrenadante y se colocó en un vial de inyección con inserto cónico para realizar la separación por medio de un Ultimate 3000 RSLC nano HPLC de Thermo Scientific Inc., el cual tiene una columna de preconcentración de C18 PepMap 100, 5 µm, 100 Å conectada a columna analítica C18 de 75 µm de diámetro interior y 25 cm de longitud, ambas columnas de Thermo Scientific Inc. Para la separación se muestra se utilizó un gradiente que consistía en una fase B compuesta por acetonitrilo / ácido fórmico al 0.1 % y una fase A compuesta de Agua MilliQ / ácido fórmico al 0.1 %, los porcentajes se especifican en la Tabla 1

Tabla 1. Gradiente de HPLC para la separación del proteoma total

Flujo µL/min	Tiempo	% Fase A	% Fase B
0.250	0	98.0	2.0
0.250	5	95.0	5.0
0.250	95	68.0	32.0
0.250	100	5.0	95.0
0.250	110	5.0	95.0
0.250	111	98.0	2.0
0.250	125	98.0	2.0

Los perfiles de elución de péptidos de las corridas cromatográficas se muestran en los Anexos 1-8.

6.2.8 Espectrometría de masas

El nanoHPLC estuvo acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo-TOF modelo Impact II de Bruker Daltonics. Se utilizó una fuente CaptiveSpray nanoBooster operada con ionización por electrospray acoplada a un embudo de iones doble, un hexápolo y un cuadrupolo para la separación de iones. Este equipo utiliza un analizador de tiempo de vuelo con reflector para identificar los iones que son fragmentados por la celda de colisión, este sistema está configurado para la detección de iones positivos. El esquema del equipo se muestra en la Figura 18. Cada una de las muestras se inyecta por triplicado en el equipo.

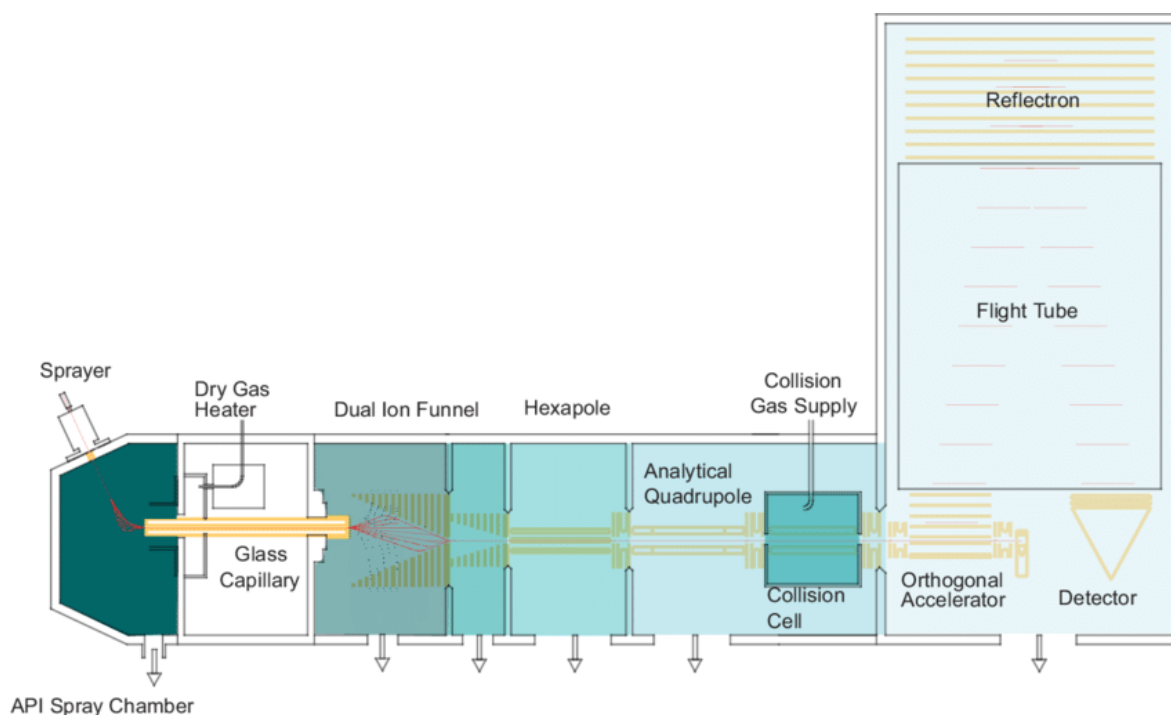


Figura 20. Esquema del Impact II Bruker Daltonics. Modificado de S. Beck et al. ⁴⁸

6.2.9 Análisis Bioinformático

Los espectrogramas obtenidos mediante el Impact II Bruker Daltonics fueron procesados mediante el software Data analysis, utilizando los parámetros o-TOFDefault.m para generar un archivo TXT. Posteriormente se utilizó el software Protein Scape para generar una lista de proteínas presentes en la muestra mediante la herramienta Protein Search la cual usa el motor de búsqueda MASCOT y contrastando con la base de datos Maxis-Human. Esta lista de proteínas se exportó a un archivo Excel y fue utilizada para comparar la presencia o ausencia de proteínas en las diferentes muestras analizadas mediante el uso de diagramas de Venn generados mediante el software Gene Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) perteneciente a Genth University Venn. Para obtener las categorías funcionales de las proteínas se utilizó el programa DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>). Se obtuvieron datos relacionados con cada una de las proteínas como nombre, función y localización mediante la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

7.RESULTADOS

7.1 GENERACIÓN ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES TIPO ORGANOIDE (CO-CULTIVOS 3D)

El modelo de esferoide celular en 3D ilustrado en la Tabla 2 simula la arquitectura de la médula ósea y la interacción microambiente-linfoblasto. Este modelo fue estandarizado durante la elaboración de este trabajo y se ha encontrado la relación adecuada entre la cantidad de células leucémicas y células estromales, creando un ambiente favorable para la comunicación extracelular. Se utilizó el modelo para evaluar la sensibilidad de las células leucémicas en exposición a vincristina con el objetivo de identificar el efecto protector que ejercen las células estromales sobre las células leucémicas.


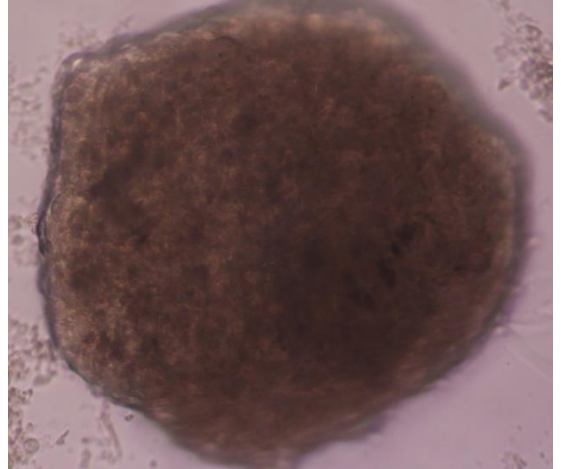

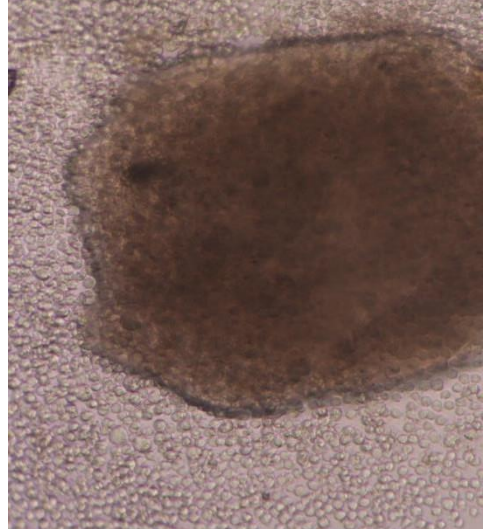

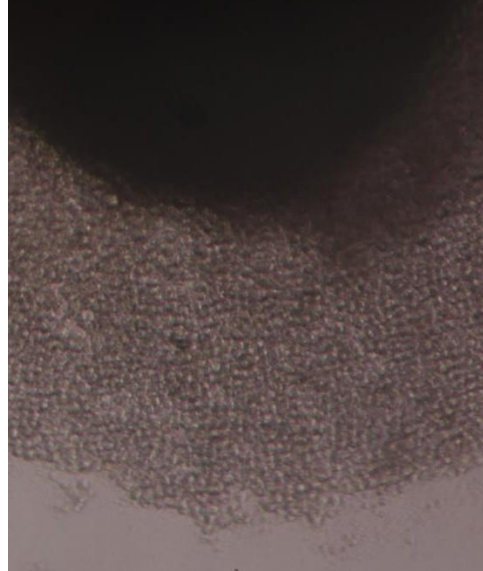
Esferoide de línea celular OP-9		
Adición de células leucémicas (CCRF-SB) a esferoides		
Obtención de co-cultivo 3D		

Tabla 2. Establecimiento del cocultivo de esferoides de células estromales de médula ósea (OP9) con células leucémicas de LLA (CCRF-SB)

7.2 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A VINCRISTINA EN CÉLULAS CCRF-SB

7.2.1 Monocultivo de CCRF-SB

Tabla 3. Resultados de dosis - respuesta obtenidos en la exposición a 24h de vincristina con células leucémicas de LLA (CCRF-SB) medidas a una absorbancia de 450/620 nm

Vincristina [nM]	Absorbancia 450 / 620			Promedio	Desv Std	Resta blanco	Viabilidad %
	n 1	n 2	n 3				
0	2.706	2.838	2.803	2.7823	0.0684	2.48367	100
3	2.052	1.861	1.82	1.911	0.1238	1.59	64.0183
6	1.425	1.526	1.369	1.44	0.0796	1.119	45.0544
9	1.422	1.444	1.36	1.4087	0.0436	1.08767	43.7928
12	1.239	1.633	0.983	1.285	0.3274	0.964	38.8136
15	0.906	1.689	0.901	1.1653	0.4535	0.84433	33.9954
100	0.933	1.061	0.853	0.949	0.1049	0.628	25.2852

Tabla 4 . Controles utilizados como blanco para los cálculos de viabilidad

Controles	Absorbancia 450/620			Promedio	Desv Std
	n 1	n 2	n 3		
Medio c /XTT	0.318	0.309	0.269	0.2987	0.15084
Medio c /vincris + XTT	0.346	0.299	0.318	0.321	0.16166

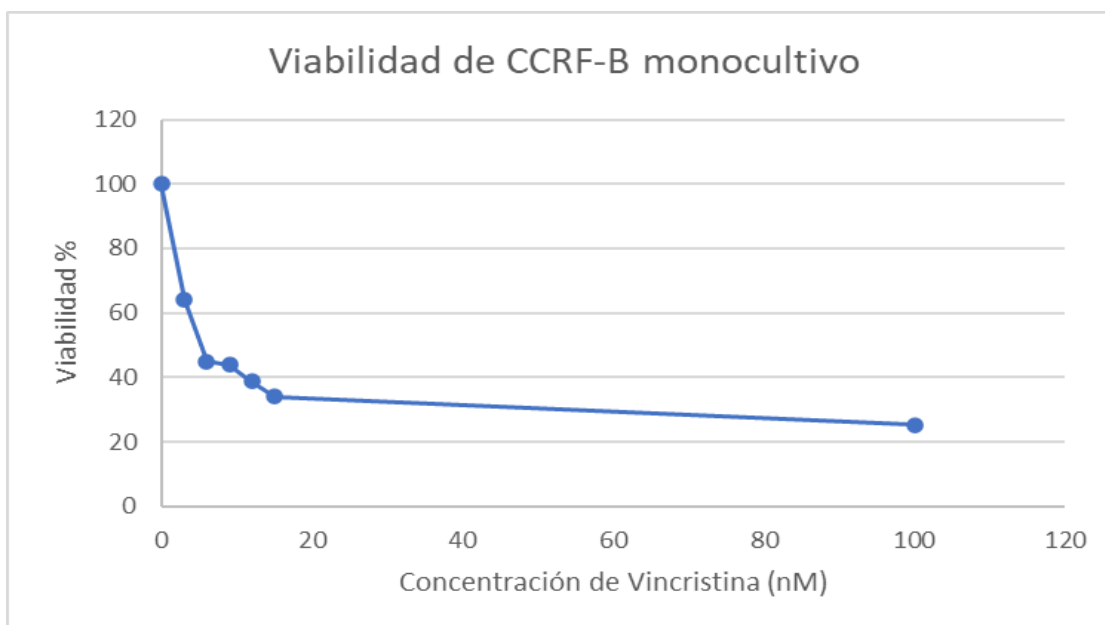


Figura 21. Curva dosis-respuesta en monocultivo celular con exposición a 24 h de vincristina

7.2.2 Cocultivo de CCRF-SB con OP-9

Tabla 5. Resultados de dosis - respuesta obtenidos en la exposición a 24h de vincristina en cocultivo de esferoides de células estromales de médula ósea (OP9) con células leucémicas de LLA (CCRF-SB) medidas a una absorbancia de 450/620 nm

Vincristina [nM]	Absorbancia n1	Absorbancia n 2	Promedio	Desv Std	Resta blanco	Porcentaje
0	1.673	1.726	1.6995	0.0375	1.3822	100
50	1.097	1.247	1.172	0.1061	0.846	61.2082
100	1.069	1.053	1.061	0.0113	0.735	53.1774
200	1.107	1.008	1.0575	0.07	0.7315	52.9242
350	1.088	1.023	1.0555	0.046	0.7295	52.7795
450	1.225	0.996	1.1105	0.1619	0.7845	56.7587

Tabla 6. Controles utilizados como blanco para los cálculos de viabilidad

Controles	n 1	n 2	n 3	Promedio	Desv Std
Medio c/XTT	0.302	0.316	0.334	0.3173	0.01604
Medio c/vincrisXTT	0.326	0.309	0.343	0.326	0.017

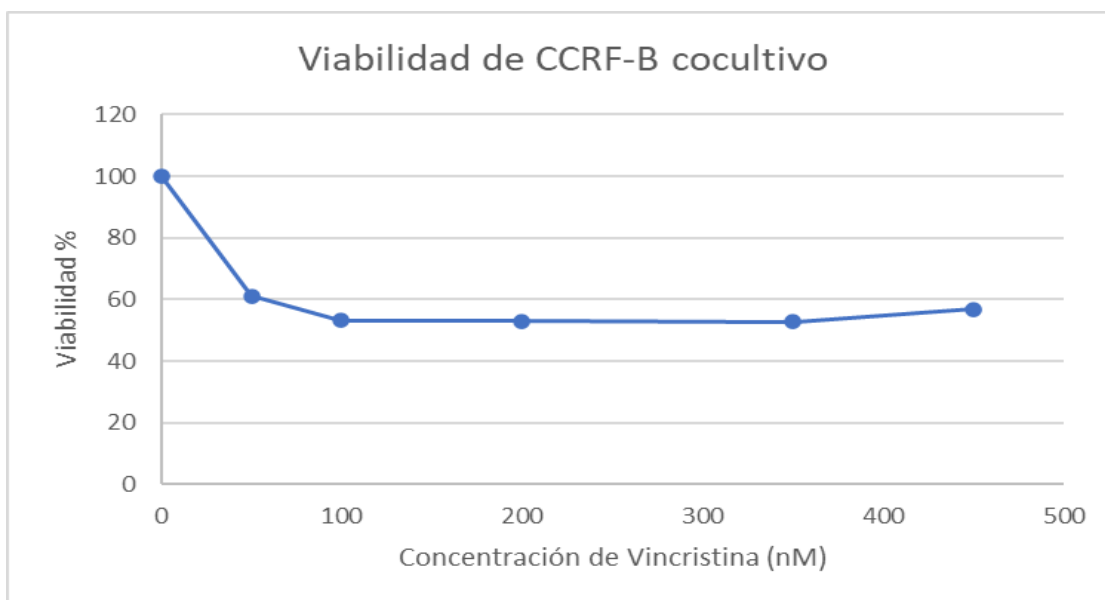


Figura 22. Curva dosis-respuesta en cocultivo celular con exposición a 24 h de Vincristina

Con base en los resultados de la dosis-respuesta en el monocultivo y cocultivo (Tabla 3 y 5), se logró estimar la concentración de vincristina a la cual la viabilidad era del 50 %, así como el nivel de protección que se confiere en el cocultivo (Tabla 7),

Tabla 7. Comparación de las concentraciones inhibitorias 50 de células CCRF-SB con vincristina

IC50 en monocultivo	IC50 en cocultivo 3D	Nivel de protección
5.21 nM	113.88 nM	21.85 X

7.3 PROTEÍNAS ENCONTRADAS EN MONOCULTIVO CCRF-SB Y COCULTIVO DE CCRF-SB CON OP-9

7.3.1 Monocultivo CCRF-SB

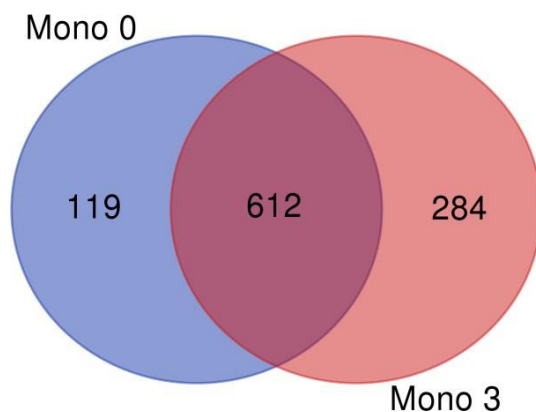


Figura 23. Diagrama tipo Venn de proteínas exclusivas y compartidas de monocultivo sin exposición a vincristina (Mono 0) y de monocultivo con exposición avincristina 3nM (Mono 3). Las listas de proteínas exclusivas de cada grupo se muestran en el Anexo 9.

7.3.2 Cocultivo CCRF-SB y OP-9

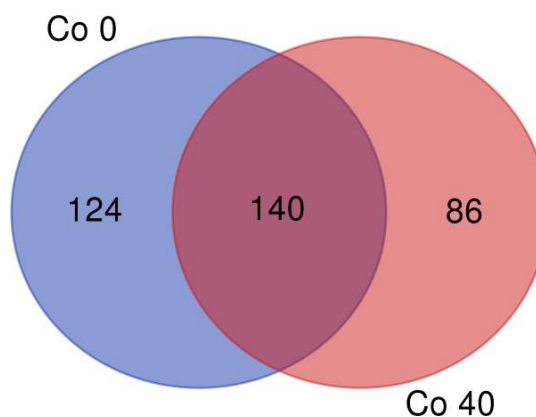


Figura 24. Diagrama tipo Venn de proteínas exclusivas y compartidas resultantes del análisis de proteoma de CCRFB en cocultivo en ausencia de vincristina (Co 0) y en presencia a vincristina 40nM (Co 40). Las listas de proteínas exclusivas de cada grupo se muestran en el Anexo 9.

7.4 RUTAS BIOLÓGICAS ENCONTRADAS EN PROTEINAS EXCLUSIVAS DE MONOCULTIVO CCRF-SB Y COCULTIVO DE CCRF-SB CON OP-9

Se utilizó el programa de Reactome (<https://reactome.org/>) para identificar las rutas biológicas en las cuales participan las proteínas que se expresan de forma significativa en cada análisis. Siendo así las de coloración amarilla aquellas que se encuentran sobre expresadas y de color gris las que no se ven activadas.

7.4.1 Monocultivo CCRF-SB sin exposición a vincristina



Figura 25. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de monocultivo sin exposición a vincristina 0nM (<https://reactome.org/>). Las cinco categorías más representadas fueron: Metabolism of RNA ($p=1.11E-16$), Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA ($p=1.05E-12$), mRNA Splicing Major Pathway ($p=3.42E-12$), mRNA Splicing ($p=8.92E-12$), NOTCH signaling ($p=2.05E-11$)

7.4.2 Monocultivo CCRF-SB con exposición a vincristina 3nM



Figura 26. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de monocultivo con exposición a vincristina [3nM] (<https://reactome.org/>). Las cinco categorías más representadas fueron: Amino acid metabolism ($p=0.0722$), RUNX1 regulates expression of components of tight junctions ($p=0.0722$), HIF signaling ($p=0.0722$), G2/M DNA replication checkpoint ($p=0.0722$), Translation ($p=0.0722$).

7.4.3 Cocultivo CCRF-SB y OP-9 sin exposición a vincristina

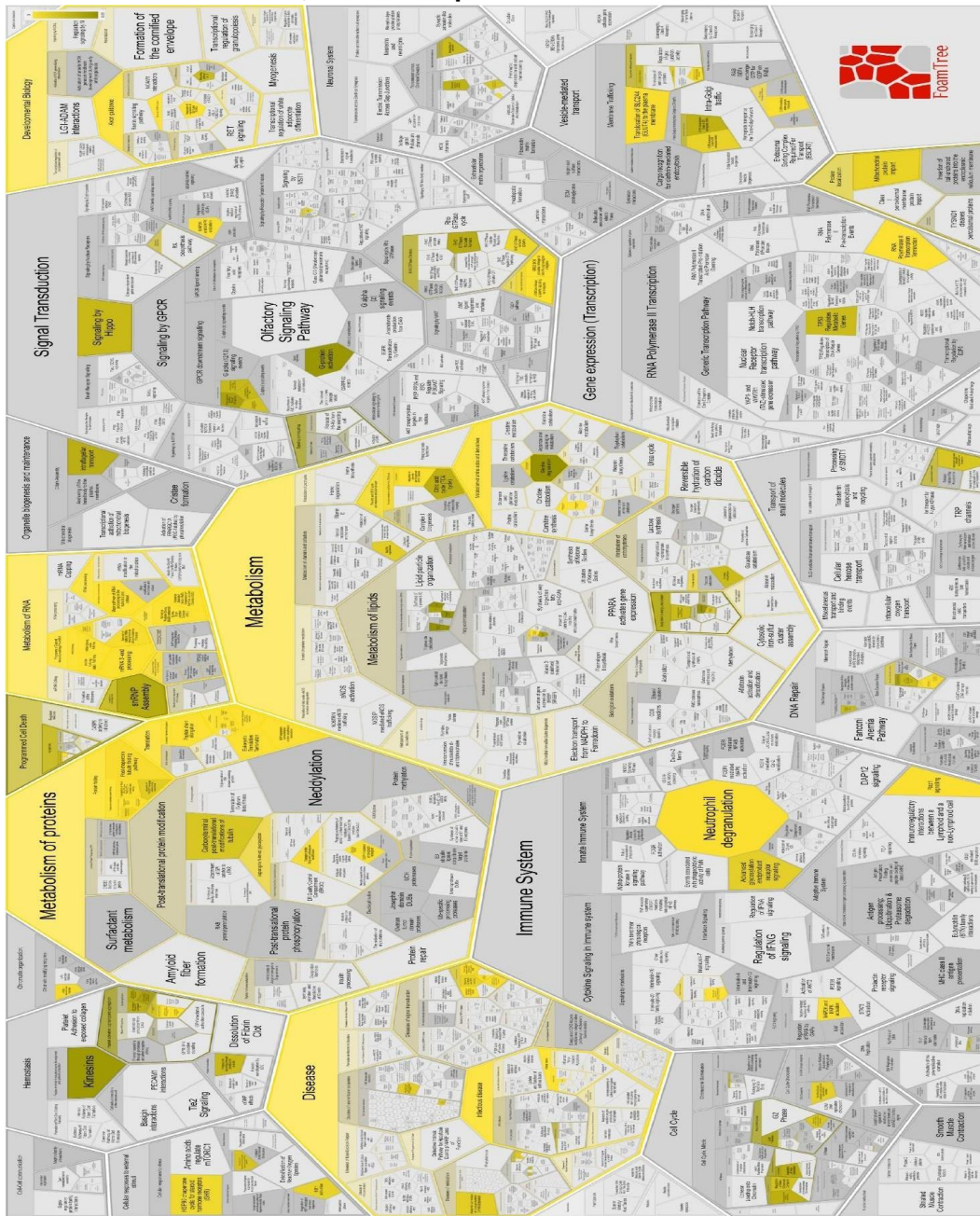


Figura 27. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de cocultivo sin exposición a vincristina [0nM] (<https://reactome.org/>). Las cinco categorías más representadas fueron: Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC ($p=1.90E-04$), Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC ($p=2.52E-04$), Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding ($p=4.66E-04$), Chaperonin-mediated protein folding ($p=4.98E-04$), Beta oxidation of palmitoyl-CoA to myristoyl-CoA ($p=4.98E-04$)

7.4.4 Cocultivo CCRF-SB y OP-9 con exposición a vincristina [40nM]



Figura 28. Descripción general de las rutas biológicas donde se encuentran las proteínas exclusivas de cocultivo con exposición a vincristina [40nM] (<https://reactome.org/>). Las cinco categorías más representadas fueron: Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC ($p=5.26E-01$), VEGFA-VEGFR2 Pathway ($p=5.33E-01$), Mitotic Anaphase ($p=5.38E-01$), COPI-mediated anterograde transport ($p=5.40E-01$), Mitotic Metaphase and Anaphase ($p=5.41E-01$).

7.5 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO COMPARANDO EL PROTEOMA DE CELULAS CCRF-SB DE MONOCULTIVO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE VINCRISTINA

Los análisis proteómicos que se realizaron permiten identificar proteínas que se hayan detectado exclusivamente en una condición como se muestra en las Figuras 21 y 22. Además, con las proteínas que son comunes, es decir las proteínas en los traslapes de los diagramas de Venn, se puede estimar si hay diferencias en su abundancia relativa mediante la herramienta “cuantificación libre de etiquetas”. Para ello, se calcula un valor llamado intensidad de cuantificación libre de etiquetas (LFQI, label free quantification intensity). Ese valor se basa en la intensidad de la señal de los picos cromatográficos de los péptidos y en el número de veces que se haya identificado cada péptido. El valor de LFQI sirve como un indicador de la abundancia de cada proteína en las muestras y permite hacer cálculos estadísticos para estimar la similitud entre muestras con el Análisis de Componentes Principales (PCA) y además, buscar diferencias significativas en abundancia. Una de las maneras más comunes de mostrar las proteínas con diferencias significativas en abundancia es el diagrama tipo volcano. Además del PCA, otra manera de hacer una estimación de la similitud entre las muestras es con el uso del agrupamiento jerárquico no supervisado en donde se forma un dendograma en la parte superior que se va dividiendo en ramas compartidas entre muestras similares. Los gráficos para este tipo de comparación a menudo son en forma de diagrama de calor (heat map) en donde se usa el color rojo para muestras con mayor abundancia y el color verde para muestras con menor abundancia.

7.5.1 Análisis PCA

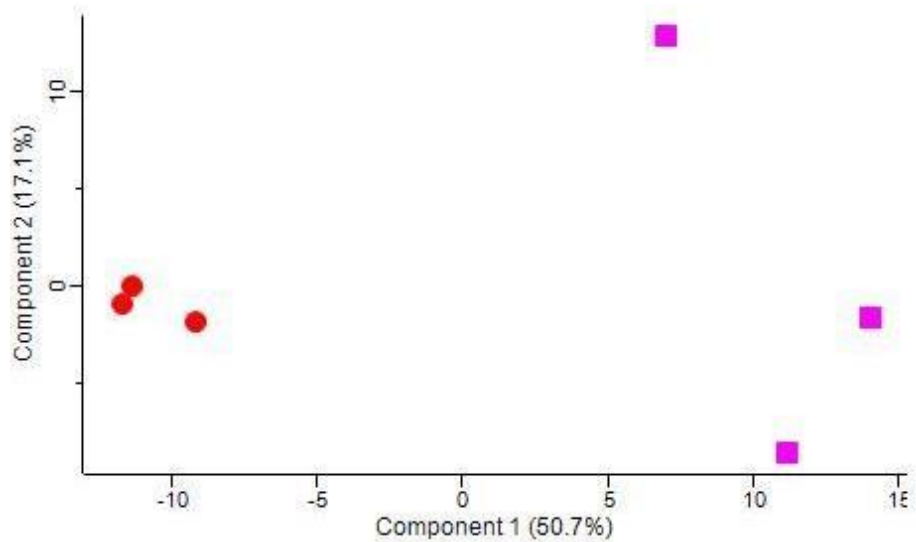


Figura 29. Diferenciación de grupos por agrupamiento de análisis de componentes principales (PCA). Círculos rojos, triplicado de analítico de monocultivo de células CCRF-SB en ausencia de vincristina. Cuadros violetas, triplicado de analítico de monocultivo a exposición de vincristina en concentración [3nM]. Las muestras más similares se agrupan entre ellas. En este análisis se consideran todas las proteínas identificadas y sus valores de LFQI.

7.5.2 Diagrama volcano

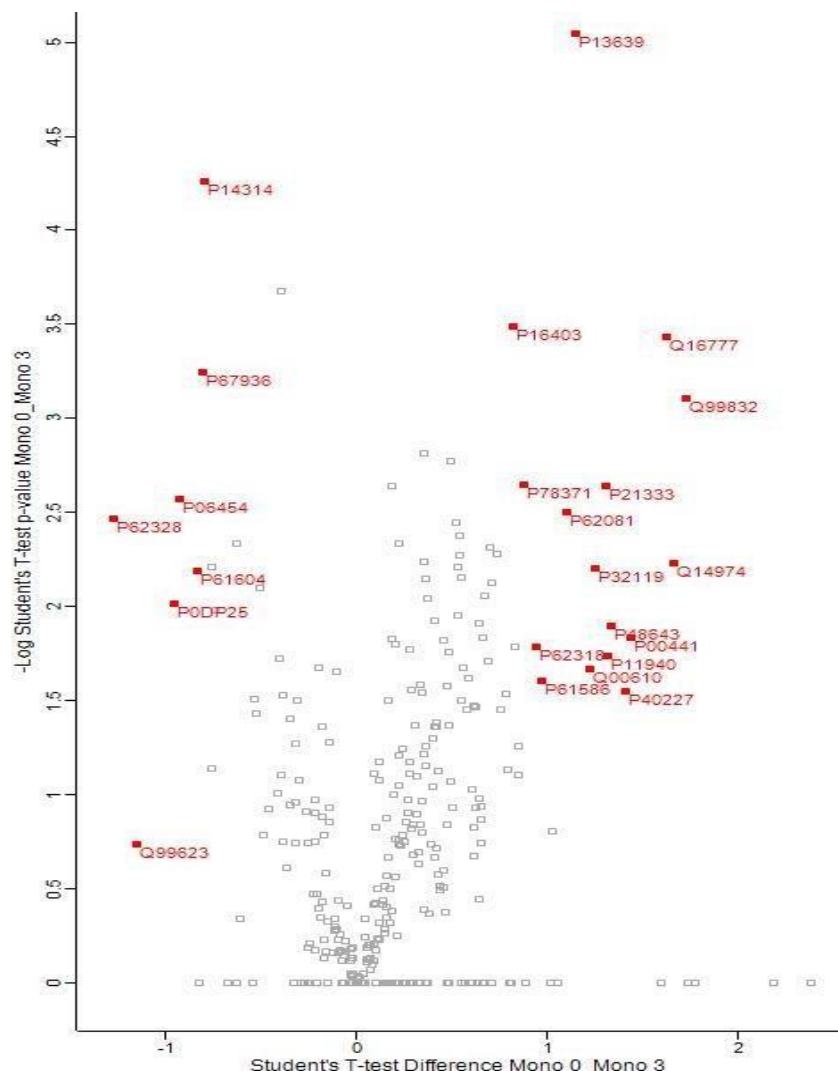


Figura 30. Proteínas con diferencias significativas en su abundancia por diagrama volcano en monocultivo de células CCRF-SB en ausencia de vincristina y monocultivo a exposición de vincristina en concentración 3nM. Las proteínas con diferencias significativas se indican en rojo. Las proteínas rojas del lado derecho fueron más abundantes sin vincristina que con vincristina. Las proteínas del lado izquierdo mostraron el patrón inverso de regulación, los nombres de las proteínas señaladas se indican en el Anexo 9.

La significancia estadística se determina por la prueba t de Student con la herramienta de False Discovery Rate basada en permutaciones. FDR= 0.05 y un fold change >1.5. Los cuadros representan proteínas, los cuadros rojos son las proteínas con diferencias significativas en su abundancia. Las letras y números representan las claves de acceso de cada proteína en la base de datos UNIPROT.

7.5.3 Diferenciación por agrupamiento jerárquico no supervisado

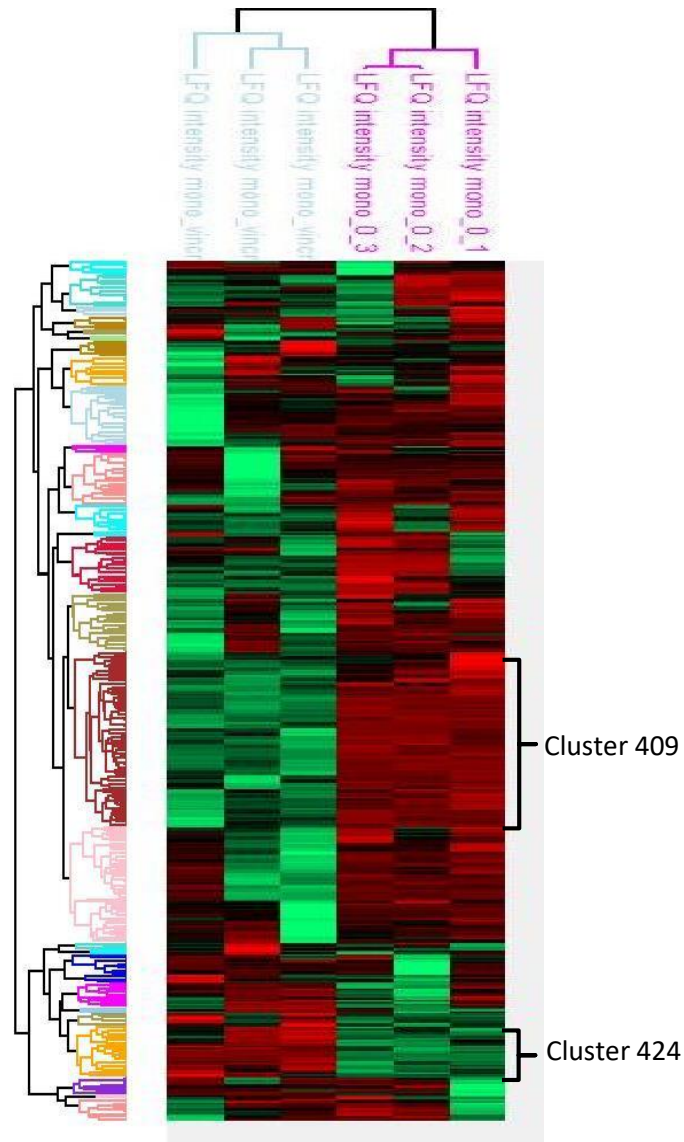


Figura 31. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por la herramienta de agrupamiento jerárquico no supervisado (heat map) en monocultivo con ausencia de vincristina y monocultivo a exposición de vincristina en concentración [3nM] , los nombres de las proteínas en los clústers se indican en el Anexo 9.

Se señalan los grupos de proteínas con regulación diferencial como Clúster 429 en el que las proteínas son más abundantes en monocultivo sin vincristina que con 3 Nm, y el Clúster 424 en el que la regulación es inversa

7.6 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO COMPARANDO EL PROTEOMA DE CELULAS CCRF-SB DEL COCULTIVO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE VINCRISTINA

7.6.1 Análisis PCA

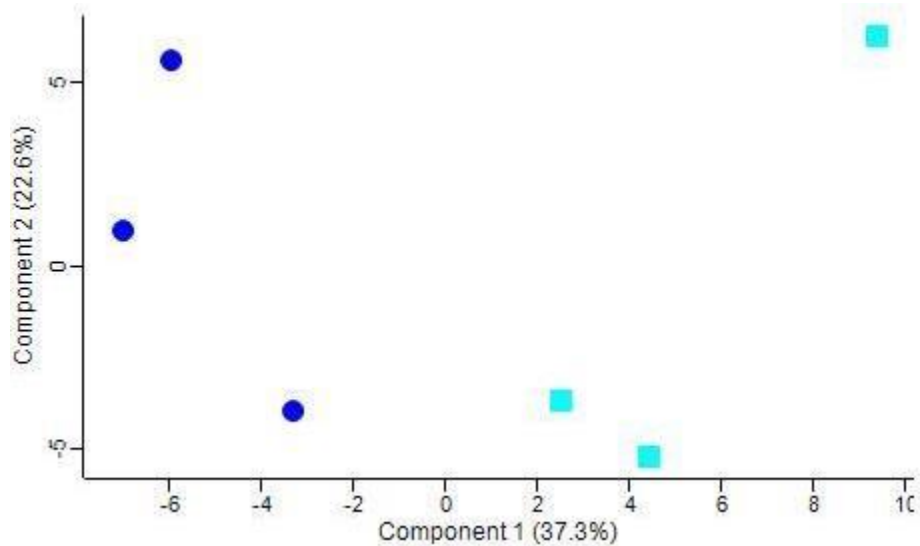


Figura 32. Diferenciación de grupos por agrupamiento de análisis de componentes principales (PCA). Círculos azul marino, triplicado de analítico de células CCRFSB de cocultivo en ausencia de vincristina. Cuadros cian, triplicado de analítico de células de CCRFSB de cocultivo a exposición de vincristina en concentración [40nM]. Las muestras más similares se agrupan entre ellas. En este análisis se consideran todas las proteínas identificadas y sus valores de LFQI.

7.6.2 Diagrama volcano

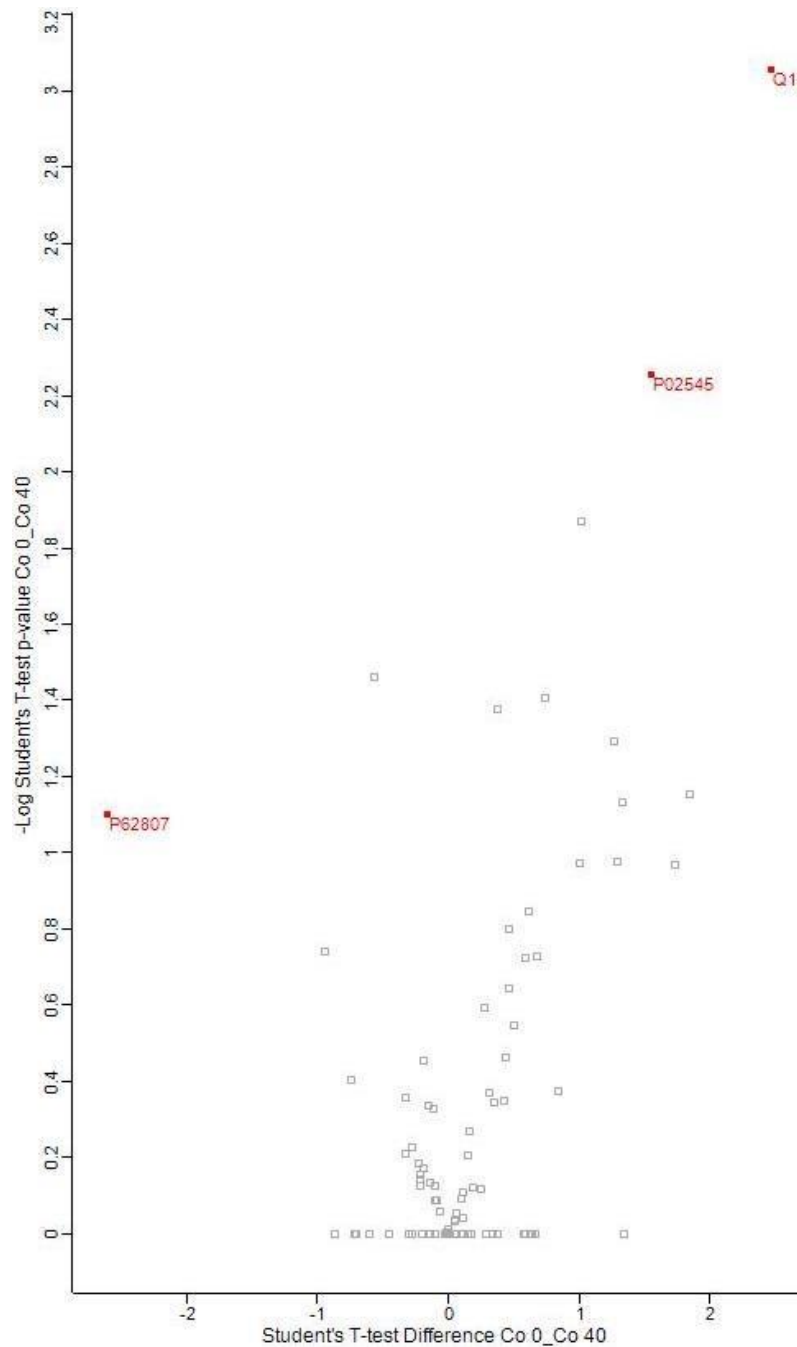


Figura 33. Proteínas con diferencias significativas en su abundancia por diagrama volcano en células CCRF-SB del cocultivo en ausencia de vincristina y cocultivo a exposición de vincristina en concentración [40nM]. Las proteínas con diferencias significativas se indican en rojo. Las proteínas rojas del lado derecho fueron más abundantes sin vincristina que con vincristina. Las proteínas del lado izquierdo mostraron el patrón inverso de regulación, los nombres de las proteínas señaladas se indican en el Anexo 9.

7.5.4 Diferenciación por agrupamiento jerárquico no supervisado

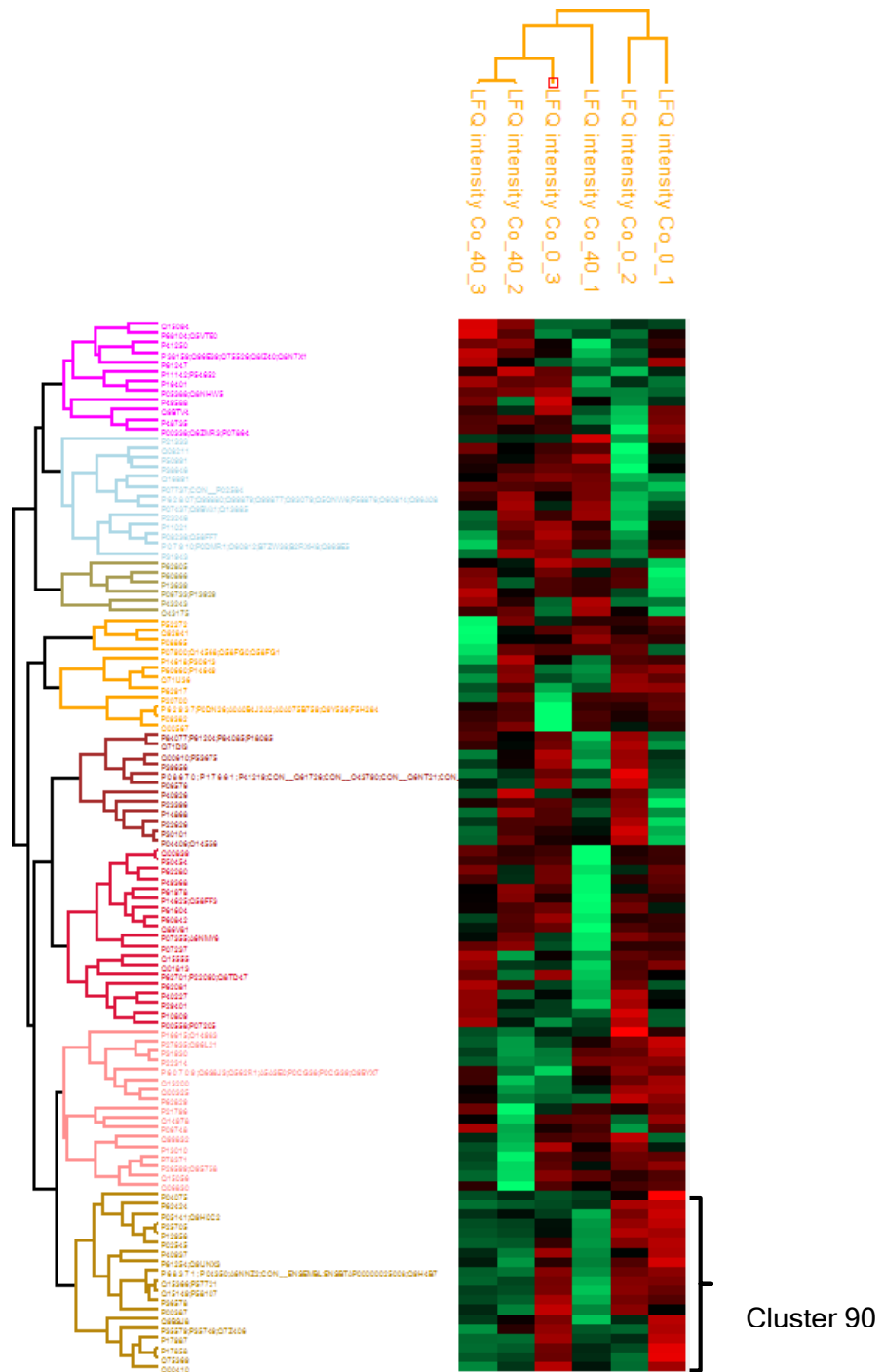


Figura 34. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clusters por la herramienta de agrupamiento jerárquico no supervisado (heat map) en células CCRF-SB del cocultivo en ausencia de vincristina y cocultivo a exposición de vincristina a concentración [40nM] , los nombres de las proteínas en los clusters se indican en el Anexo 9.

7.7 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO COMPARANDO EL PROTEOMA DE CELULAS CCRF-SB EN MONOCULTIVO Y COCULTIVO EN AUSENCIA DE VINCRISTINA

7.7.1 Análisis PCA

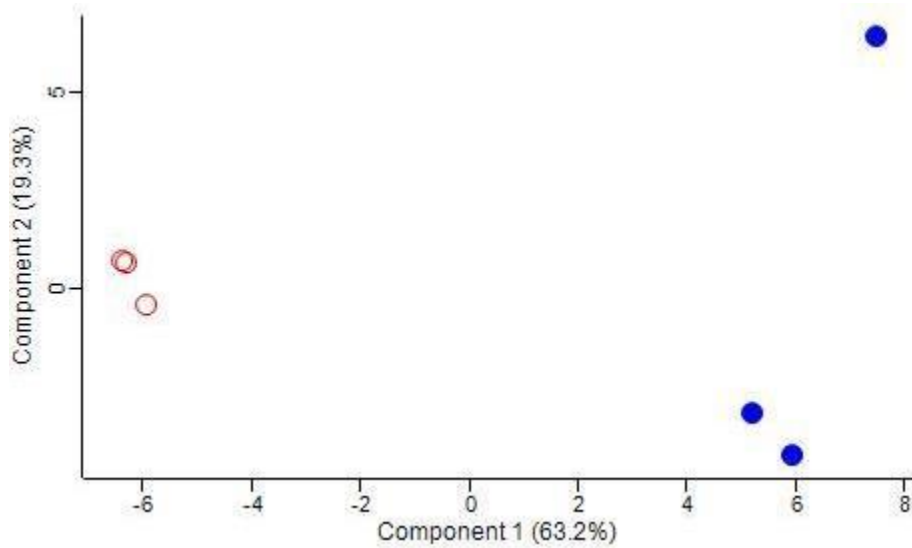


Figura 35. Diferenciación de grupos por agrupamiento de análisis de componentes principales (PCA). Círculos de contorno rojo, triplicado de analítico de células CCRF-SB de monocultivo en ausencia de vincristina. Círculos azul marino, triplicado de analítico de células de CCRFSB de cocultivo en ausencia de vincristina. Las muestras más similares se agrupan entre ellas. En este análisis se consideran todas las proteínas identificadas y sus valores de LFQI.

7.7.2 Diagrama volcano

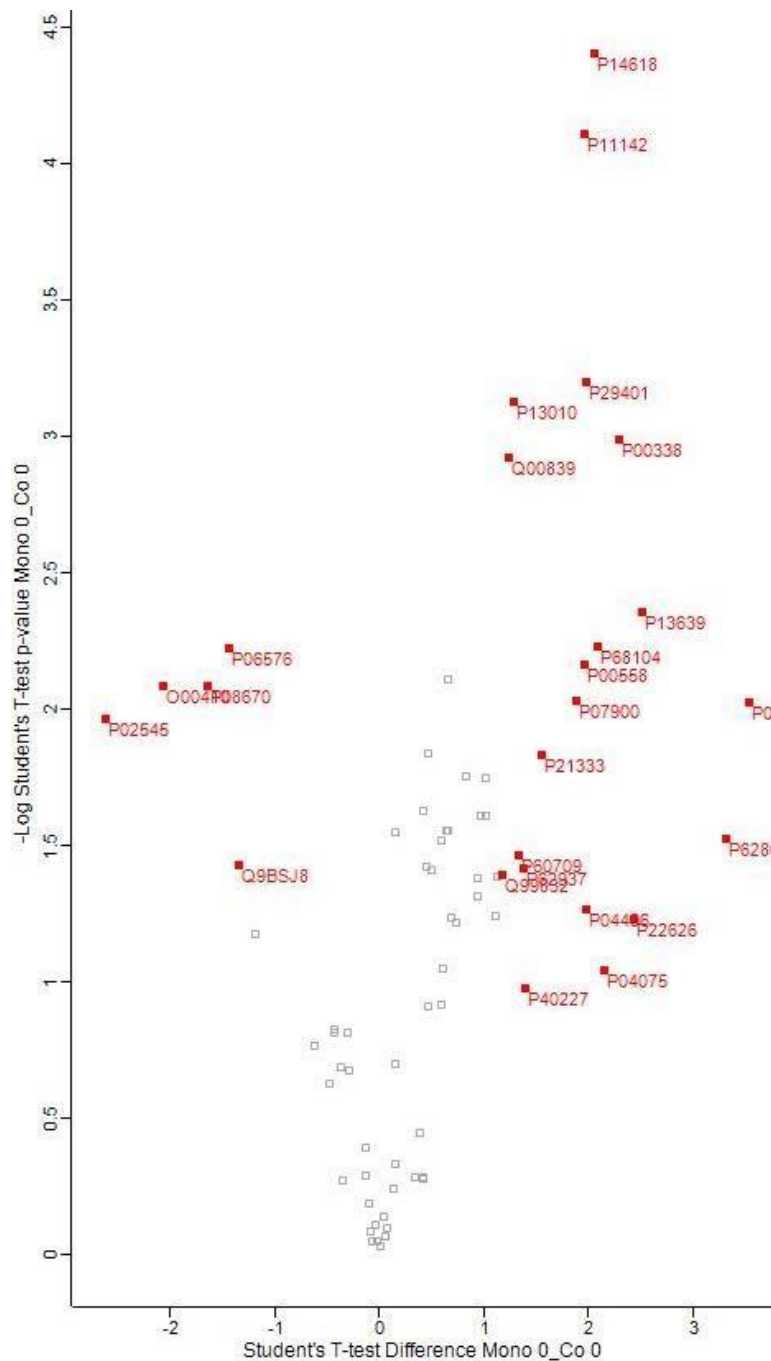


Figura 36. Proteínas con diferencias significativas en su abundancia por diagrama volcano en células CCRF-SB de monocultivo y cocultivo en ausencia de vincristina. Las proteínas con diferencias significativas se indican en rojo. Las proteínas rojas del lado derecho fueron más abundantes en monocultivo que en cocultivo. Las proteínas del lado izquierdo mostraron el patrón inverso de regulación, los nombres de las proteínas señaladas se indican en el Anexo 9.

7.7.3 Diferenciación por agrupamiento jerárquico no supervisado

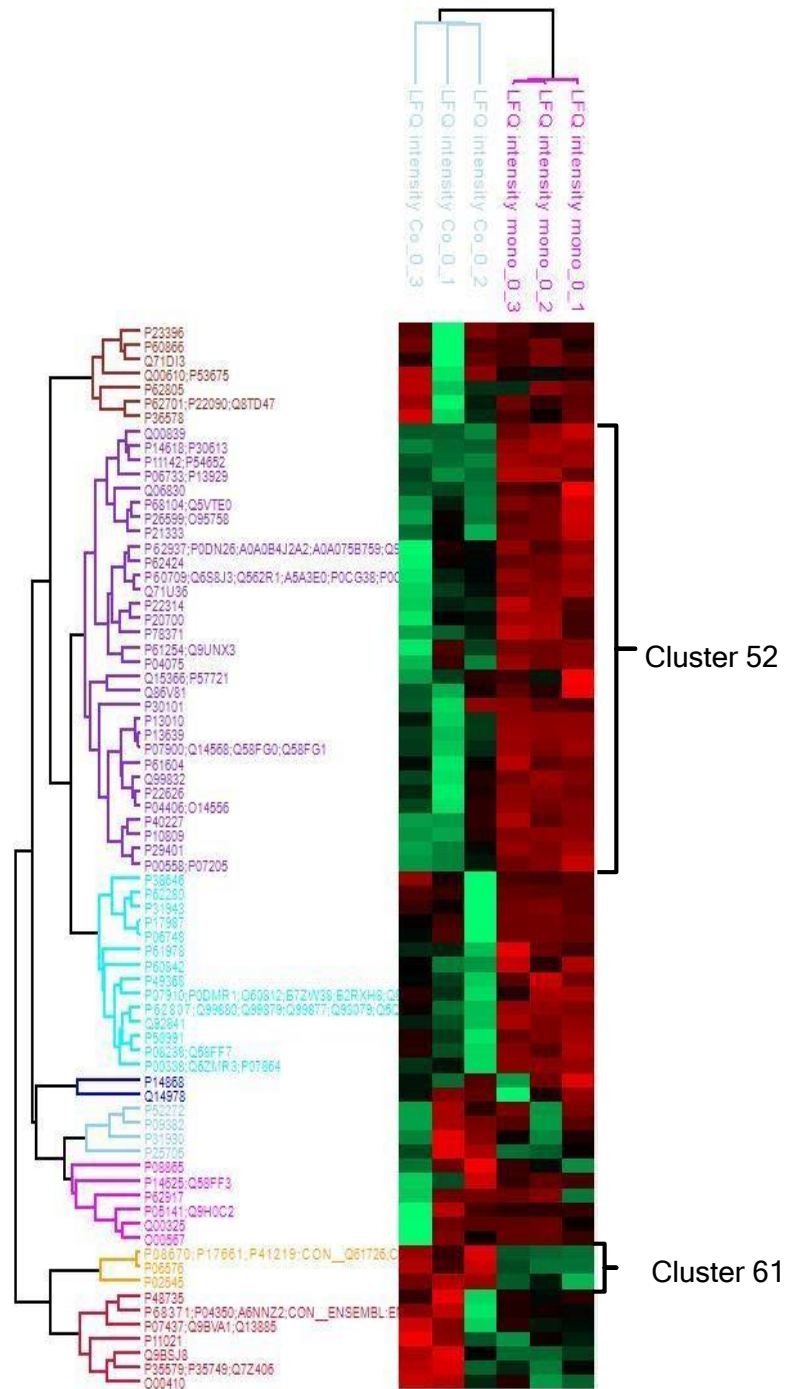


Figura 37. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por la herramienta de agrupamiento jerárquico no supervisado (heat map) en células CCRF-SB del monocultivo y cocultivo en ausencia de vincristina, los nombres de las proteínas en los clústers se indican en el Anexo 9.

7.8 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO COMPARANDO EL PROTEOMA DE CELULAS CCRF-SB EN MONOCULTIVO Y COCULTIVO EN PRESENCIA DE VINCRISTINA

7.8.1 Análisis PCA

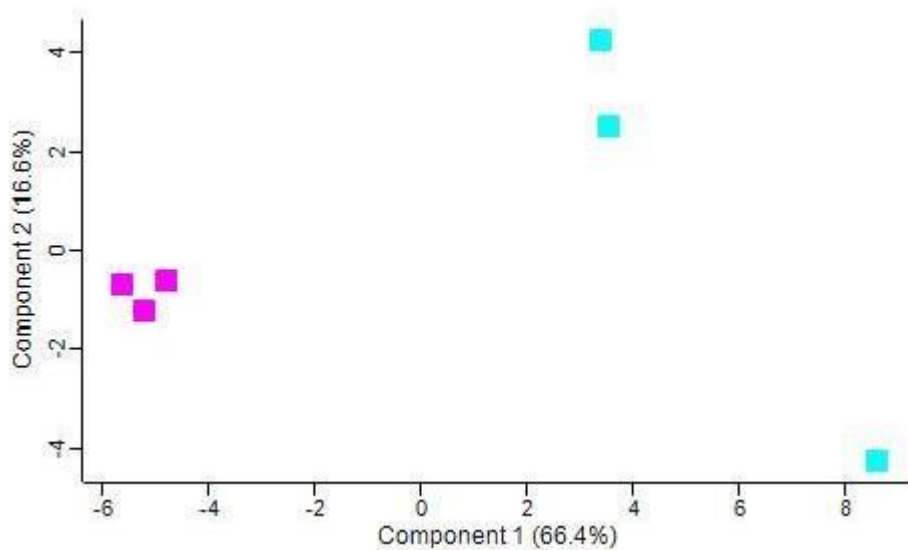


Figura 38. Diferenciación de grupos por agrupamiento de análisis de componentes principales (PCA). Cuadrados purpura, triplicado de analítico de células CCRF-SB de monocultivo en presencia de vincristina a concentración [3nM]. Cuadrados cian, triplicado de analítico de células de CCRF-SB de cocultivo en presencia de vincristina a concentración [40nM]. Las muestras más similares se agrupan entre ellas. En este análisis se consideran todas las proteínas identificadas y sus valores de LFQI.

7.8.2 Diagrama volcano

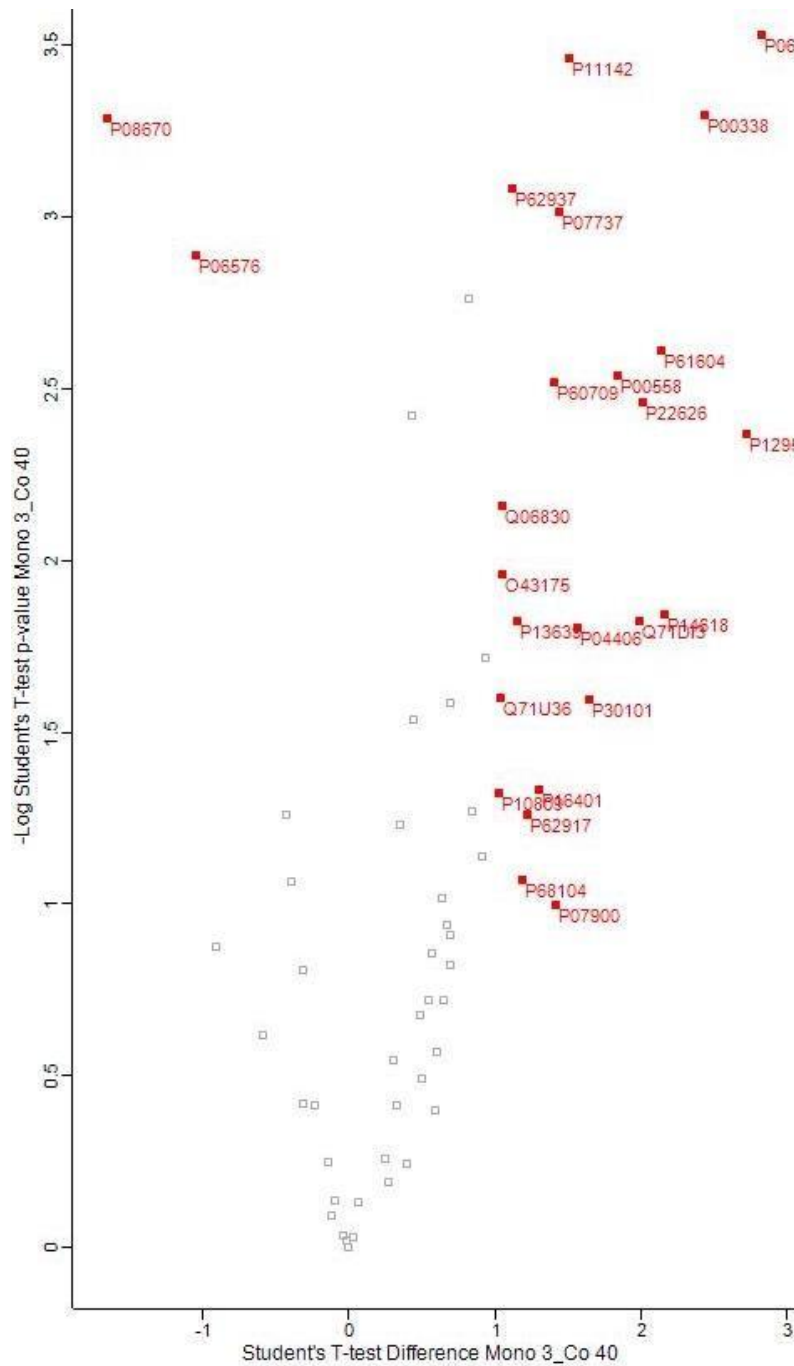


Figura 39. Proteínas con diferencias significativas en su abundancia por diagrama volcano en células CCRF-SB de monocultivo en presencia de vincristina a concentración [3nM] y cocultivo en presencia a vincristina a concentración [40nM]. Las proteínas con diferencias significativas se indican en rojo. Las proteínas rojas del lado derecho fueron más abundantes en monocultivo con 3 nM que en cocultivo con 40 nM . Las proteínas del lado izquierdo mostraron el patrón inverso de regulación, los nombres de las proteínas señaladas se indican en el Anexo 9.

7.8.3 Diferenciación por agrupamiento jerárquico no supervisado

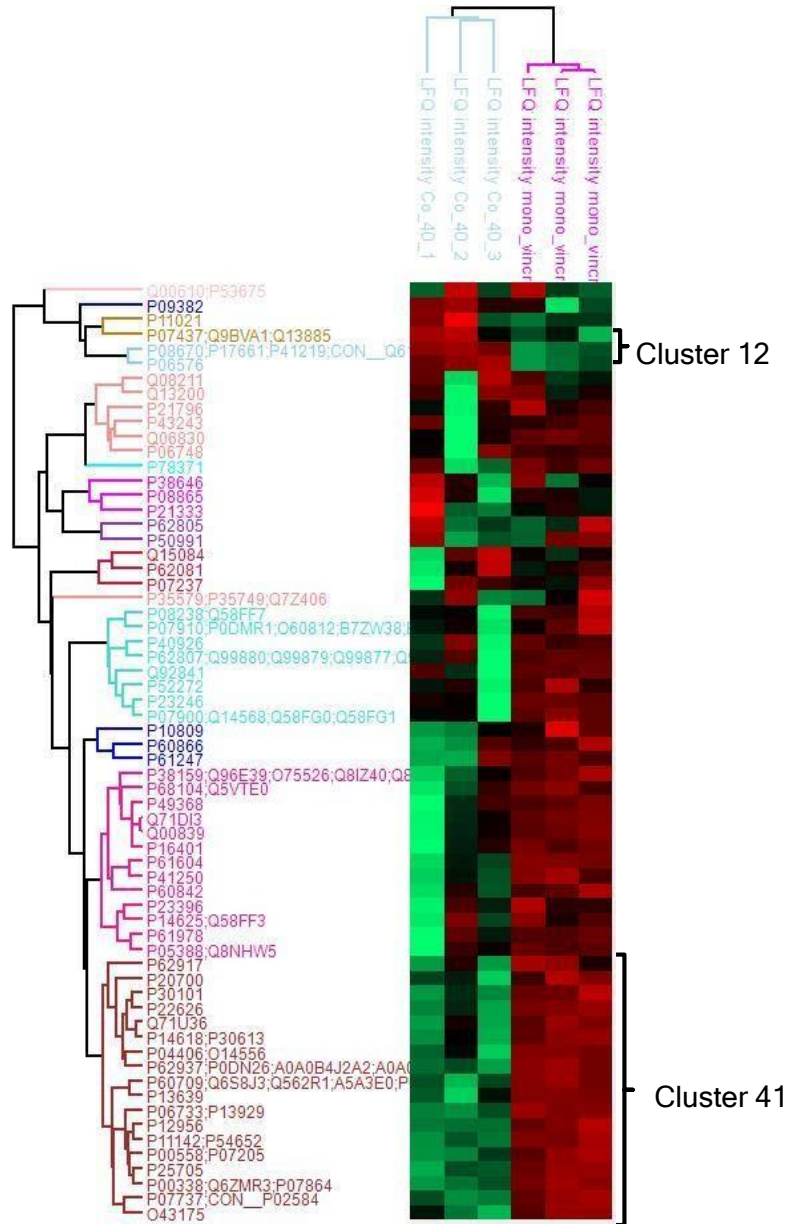


Figura 40. Diferenciación de proteínas significativas agrupadas en clústers por la herramienta de agrupamiento jerárquico no supervisado (heat map) en células CCRF-SB del monocultivo en presencia de vincristina a concentración [3nM] y cocultivo en presencia a vincristina a concentración [40nM] , los nombres de las proteínas en los clústers se indican en el Anexo 9.

8.DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El modelo de esferoide celular 3D fue utilizado para evaluar la sensibilidad de las células leucémicas en exposición a vincristina e identificar el efecto protector que ejercen las células estromales sobre las células leucémicas. De esta forma se obtuvo la curva dosis-respuesta para conocer la concentración a la cual se inhibe la viabilidad de la población celular en un 50 % (IC50). En la Figura 21 se observa que la IC50 para el monocultivo de células leucémicas corresponde a una concentración del fármaco de 5.21nM y que para el cocultivo la concentración se eleva a 113.88 nM (Figura 22).

Al realizar la comparación de IC50 en cocultivo / IC50 en monocultivo se observa que la dosis de fármaco necesaria para disminuir la viabilidad celular en el cocultivo es 21.85 veces mayor a la requerida en el monocultivo (Tabla 7), lo cual puede explicarse debido a que las células leucémicas, al estar en contacto con las células estromales de médula ósea, no funcionan de manera independiente, sino que se crea un nicho de protección contra el fármaco debido a una comunicación íntima entre ambas células mediada por citosinas, quimiocinas y contacto célula-célula.

En Las figuras 23 y 24 podemos observar que la cantidad de proteínas compartidas en ambos grupos es mayor que las proteínas exclusivas (612 en monocultivo y 140 en cocultivo), esto nos indica que dichas proteínas compartidas forman parte de los mecanismos intrínsecos de las células ya que se encontraron tanto en ausencia como en presencia de vincristina.

Cabe mencionar que el número de proteínas encontradas en las células CCRF-SB del cocultivo es menor que el número de proteínas encontradas en las células del monocultivo ya que la biomasa utilizada de células de cocultivo fue menor (500, 000) a comparación de las utilizadas en monocultivo (1 millón). Esto se hizo debido a la complejidad que tiene el proceso de generar un cocultivo esferoidal 3D, además que durante este proyecto se estandarizó el proceso de cocultivo, aún queda

estandarizar el análisis del proteoma de células provenientes de cocultivo. La proyección para futuro sería analizar el proteoma de células leucémicas provenientes de un cocultivo con células de médula ósea humana para así tener un panorama más amplio en cuanto a las interacciones en el microambiente tumoral. La complejidad de la generación de cocultivos 3D en esferoides estromales también parece haber contribuido a la alta variabilidad en los proteomas de células CCRF-SB en cocultivo, lo que se observa en la separación de los puntos de cocultivo en los gráficos de Análisis de Componentes Principales y en algunas ramificaciones de los mapas de calor.

Debido a que el enfoque de este estudio está basado en la hipótesis de que las proteínas expresadas y ausentes en condiciones de exposición al fármaco se relacionan con los mecanismos que ayudan a la quimio resistencia, el análisis bioestadístico se enfatizó en aquellas proteínas presentes en los grupos exclusivos de cada comparación

Al analizar las proteínas encontradas exclusivamente en las células CCRF-SB sin exposición a vincristina (Figuras 25 y 27) se logró observar que gran parte de ellas están involucradas en el proceso co-transcripcional de corte y empalme, también llamado splicing, estudios realizados en este tema han relacionado la presencia de mutaciones genéticas que afectan el correcto proceso de splicing en mRNA con células cancerígenas. Dichas mutaciones están presentes principalmente en oncogenes y genes supresores de tumor. Aunque el cáncer se origina a partir de alteraciones en el ADN, éstas tienen un impacto en el transcriptoma, el cual puede inducir y mantener diferentes mecanismos vinculados al desarrollo del cáncer, ya que al ser el transcriptoma aquel que define la capacidad funcional de una célula, se puede considerar que es el transcriptoma el que de una forma u otra da lugar al estado tumoral. ⁴⁹

Otras de las funciones de las proteínas identificadas en este análisis son aquellas relacionadas con los receptores NOTCH, estos receptores pertenecen a una vía de señalización altamente conservada que se basa en el contacto célula-célula para inducir una respuesta a señales ambientales en animales multicelulares. Se han reportado mutaciones de empalme en receptores NOTCH PEST presentes en células B tumorales así como en casos de leucemia linfocítica crónica.^{50,51}

La principal ruta afectada en las células de monocultivo que han sido expuestas a vincristina (Figura 26) es el metabolismo de aminoácidos y sus derivados. Para apoyar la acumulación sostenida de biomasa, las células tumorales se someten a una reprogramación metabólica en la cual los transportadores de nutrientes y las enzimas están regulados por las mismas señales oncogénicas que impulsan la progresión del ciclo celular. Muchos cánceres exhiben una mayor demanda de aminoácidos específicos y se convierten en dependientes de un suministro exógeno o una síntesis de novo.

Estudios en el metabolismo celular de células cancerígenas han revelado una serie de características comunes: (I) aumento en la demanda de nitrógeno para suministrar reacciones biosintéticas; (II) consumo elevado de aminoácidos y desregulación de los transportadores correspondientes; (III) demanda de aminoácidos no esenciales que exceden el suministro intracelular, lo que lleva a la dependencia de fuentes exógenas; y (IV) niveles alterados de enzimas que catalizan la síntesis de aminoácidos y / o catabolismo.⁵²

Otra ruta de suma importancia que se ha visto alterada en este grupo de células es la traducción de proteínas, el inicio de la traducción es un proceso biológico multifacético altamente regulado, que requiere al menos nueve factores de inicio eucariotas, la evidencia que respalda el factor eIF4F como oncogén ahora es bastante convincente y se ha demostrado en múltiples entornos que la sobreexpresión de este factor acelera el inicio de la formación de tumores y agrava su respuesta al fármaco.⁵³

De la misma forma se encontró una sobreexpresión de proteínas relacionadas con hipoxia y la señalización mediada por el activador transcripcional HIF, las cuales juegan un papel crucial en la leucemia y los procesos leucemogénicos. Se ha comprobado la eficacia de terapias que tienen como diana las rutas de hipoxia y HIFs en el tratamiento de modelos murinos, por lo que se presume que podrían beneficiar de igual manera a los pacientes leucémicos.⁵⁴

Las funciones de las proteínas identificadas exclusivamente en el cocultivo sin vincristina (Figura 27) están relacionadas con el citoesqueleto de tubulina y con la generación de energía por beta oxidación. Esto puede indicar la mayor producción de proteínas que modulan la síntesis de tubulina en cocultivo sin fármaco en comparación con células en presencia de vincristina. Además de que, sin el fármaco, la generación de ATP por degradación de lípidos puede ser mayor en comparación con células en cocultivo con vincristina.

Las funciones de las proteínas identificadas exclusivamente en el cocultivo con 40nM de vincristina (Figura 28) están relacionadas con la presentación de antígenos, regulación por el Factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) y la regulación del ciclo celular. Esto puede estar relacionado con la intensa inducción de la señalización intracelular que ocurre en presencia de vincristina, lo cual ya se ha encontrado en estudios previos del laboratorio.

Las funciones de las proteínas con regulación diferencial y que se identificaron en monocultivo, con y sin vincristina (Figuras 30 y 31), están relacionadas básicamente con la regulación del ciclo celular y la remodelación de la cromatina. Esto puede reflejar la reducción de la división celular en presencia del fármaco y la intensa regulación transcripcional necesaria para enfrentar el estrés por la desestabilización del citoesqueleto. No se identificaron categorías relacionadas con apoptosis como era de esperar, probablemente con mayor tiempo de exposición al fármaco se induzcan esas categorías.

Las funciones de las proteínas con regulación diferencial y que se identificaron en cocultivo con y sin vincristina (Figuras 33 y 34), están relacionadas con inflamación, transporte a través de la membrana plasmática y transporte de vesículas intracelulares. Esto puede indicar que la respuesta combinada al otro tipo celular y al fármaco induce el intercambio de señales intercelulares inflamatorias mediante endocitosis y exocitosis. Debemos reconocer que la alta variabilidad en los proteomas de cocultivo hacen que estas interpretaciones deban tomarse con cautela. Es necesario hacer más réplicas experimentales para obtener mejores conclusiones.

Las funciones de las proteínas con regulación diferencial y que se identificaron en monocultivo y cocultivo sin vincristina (Figuras 36 y 37), están relacionadas con metabolismo celular, traducción, dinámica de la membrana nuclear y la cromatina, splicing y respuesta a estrés. Dado que las células de las que se obtuvieron estos proteomas no estaban en presencia de vincristina, estas categorías funcionales pueden reflejar el metabolismo normal de la línea celular leucémica de linaje B.

Finalmente, las funciones de las proteínas con regulación diferencial y que se identificaron en presencia de vincristina tanto en monocultivo y en cocultivo (Figuras 39 y 40), están relacionadas con glicólisis, splicing, muerte celular y daño a la membrana nuclear. Estas categorías pueden reflejar condiciones de estrés causadas por el fármaco, mayor demanda de energía por glicólisis para enfrentar el estrés, y los efectos de la desestabilización del citoesqueleto.

9. CONCLUSIONES

Es posible simular la protección contra la vincristina debida al microambiente tumoral con un cocultivo esferoideal 3D de células leucémicas y células de médula ósea.

El cocultivo 3D provoca un factor de protección de 21 veces en las células CCRF-SB expuestas a vincristina.

No es posible analizar con certeza el proteoma de 500,000 células CCRF-SB provenientes de cocultivo con la metodología utilizada, sin embargo, si es posible analizar el proteoma de 1 millón de células con este procedimiento.

Las afectaciones más significativas encontradas en este estudio son aquellas relacionadas con el proceso co-transcripcional de splicing y transcriptoma tumoral; síntesis de aminoácidos; receptores NOTCH y proteínas relacionadas con hipoxia y la señalización mediada por HIF. Todas estas señalizaciones participan conjuntamente en las células CCRF-SB para asegurar la supervivencia al ser afectadas por la acción de vincristina, esto nos proporciona información para el desarrollo de posibles terapias oncológicas de tipo personalizadas.

10.Referencias

1. Davis A, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: An overview for Primary Care. Am Fam Physician. 2014; 89 (9):731-738.
2. Jaime JC, Gómez D. Hematología. La sangre y sus enfermedades. 4ª ed. McGraw-Hill Interamericana; 2015
3. Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, et al. Williams Hematology 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p:1141-1161
4. Ortega M, Osnaya M, Rosas J. Leucemia linfoblástica aguda. Med Int Mex. 2007;23:26-33.
5. National Cancer Institute [Internet]. EE.UU.: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.; Julio 2014 [consulta abril 2018]. Tipos de leucemia; p.3-6. Disponible en: www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/necesita-saber-leucemia-PDF
6. American Cancer Society [Internet]. USA: ACS; Mayo 2015 [Febrero 2016; consulta abril 2018]. Detección temprana, diagnóstico y tipos [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: www.cancer.org/es/cancer/leucemia-en-ninos/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/como-se-clasifica.html
7. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis.2014;6: Open Journal System
8. Childhood Cancer Statistics [Internet]. U.S.A. American Childhood Cancer Organization;2013. [consulta 6 de abril 2013]. Disponible en: <http://www.acco.org/information/aboutchildhoodcancer/childhoodcancerstatistics.aspx>
9. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [Internet]. México: INEGI; 2020 [consulta septiembre 2022]. Mortalidad General en Población Infantil [aprox. 2 pantallas]. Disponible en:https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANCER22.pdf
10. D.R. Secretaría de Salud. Programa de Acción específico Cáncer en la Infancia y la Adolescencia. 1ª ed. México: Programa Sectorial de Salud 2013-2018; 2014: 13-36
11. Rivera-Luna R. Cárdenas-Cardos R. Olaya-Vargas A. et. al. El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas. An Med Mex 2015; 60 (2): 91-97
12. Pérez-Saldivar M.R.,Fajardo-Gutierrez A., Bernáldez-Rios R. et. al. Childhood akute leukemias are frequent in México City: Descriptive epidemiology. BMC Cancer.2011; 11:355

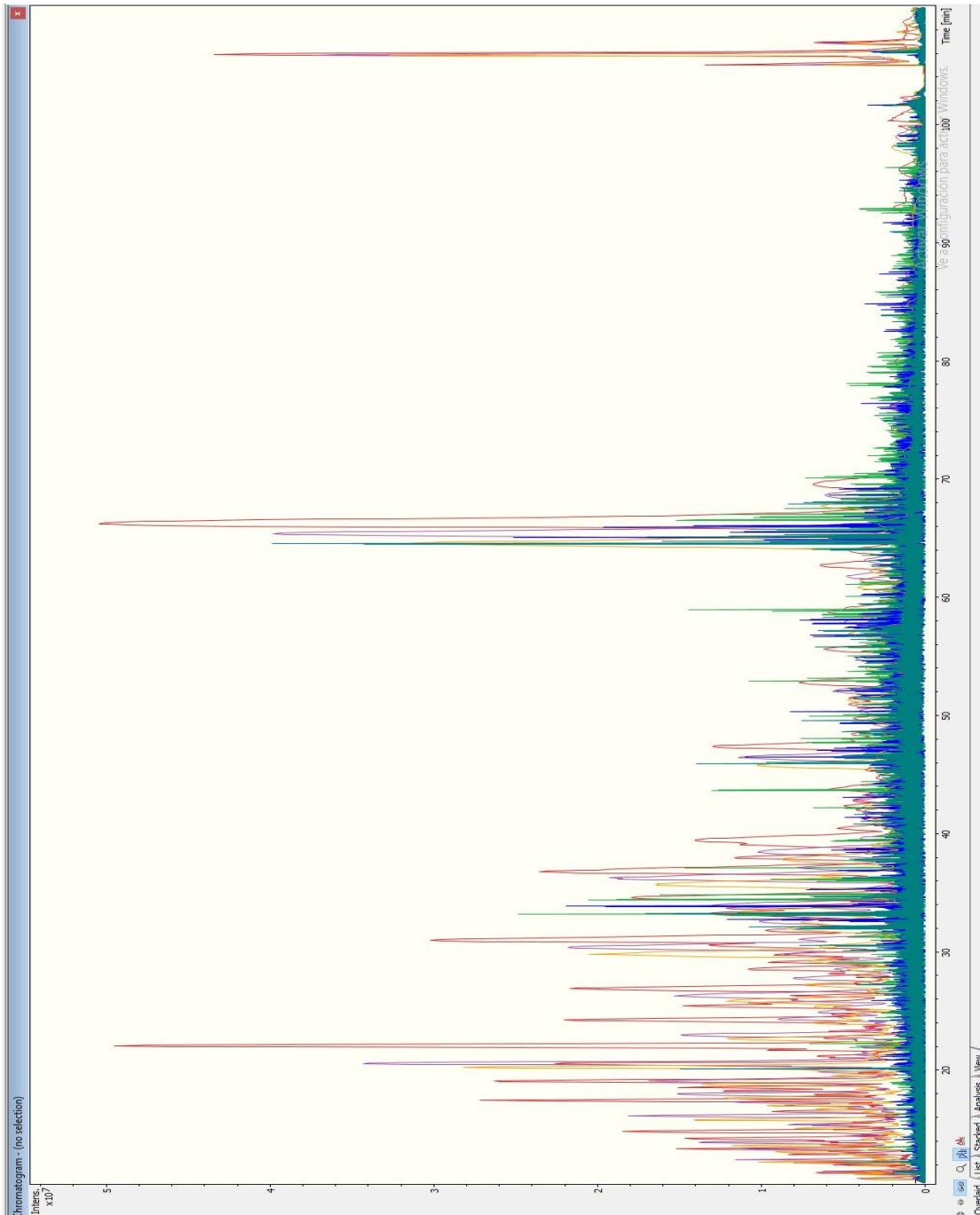
13. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*. 2017; 7 (e577)
14. Dreamstime [Internet].
15. Inaba H, Greaves M, Mullighan C. Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881)
16. Cooper S, Brown P. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):61-73
17. Watt J, Breyer-Brandwijk M. Apocynaceae. In: Livingstone E, Livingstone S, editors. *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa 2*. Edinburgh: Livingstone E and S, 1962:85–86.
18. Karon MR. Leurocristine sulfate in the treatment of acute leukemia, *Proc Am Assoc Cancer Res* 1962;3(abstr):333.
19. Armstrong JG, Dyke RW, Fouts PJ. Initial clinical experience with leurocristine, a new alkaloid from *Vinca rosea* Linn. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1962;3(abstr):301.
20. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, et al. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 1963;23:1390–427.
21. Gidding C, Kellie S, Kamps A, Graaf S. Vincristine revisited. *Onc Hem* 1999; 29:267–287
22. Ong V, Liem N, Schmid M. et al. A Role for Altered Microtubule Polymer Levels in Vincristine Resistance of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Xenografts. *JPET* 2008;324:434–442.
23. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10: 194–204
24. Ying Z, Shao-Hui Y, Xiu-Li G. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 96: 659-666.
25. Vidal Vademecum [Internet]. Spain: Vademecum Group [Abril 2016; consulta julio 2018]. Monografías, principio activo Vincristina [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-vincristina-L01CA02>
26. American Society of Health System Pharmacists [Internet]. Bethesda, Maryland: AHFS [2008; consulta agosto 2018]. Drug Information vincristine. [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3199>

27. Krause D.S. Scadden D.T. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Leaders in Hematology*. 2015; 100(11) : 1376-1387
28. Duan CW, Shi J, Chen J, et al. Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(6):778-793
29. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999; 93: 1658–1667.
30. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev* 2009; 9: 665–674
31. KH Shain et al The tumor microenvironment and B-cell malignancies *Oncogene*. 2015: 1 –10
32. American Type Culture Collector . [Internet]. Product Sheet. CRF•SB [CCRF SB] (ATCC® CCL•120TM) [Agosto 2018; consulta enero 2020]. Disponible en: <https://www.atcc.org/>
33. American Type Culture Collector . [Internet]. Product Sheet. OP9 (ATCC® CRL•2749TM) [Agosto 2018; consulta enero 2020]. Disponible en: <https://www.atcc.org/>
34. Rees-Unwin K.S., Morgan G.J., Davies F.E. Proteomics and the Haematologist *Clin. Lab. Haem.* 2004; 26: 77–86
35. Cutillas P.R. Timms J.F. LC-MS/MS in Proteomics *Methods and Applications*. London UK: Humana Press; 2010
36. Aebersold R. Mann M. Mass Spectrometry based Proteomics. *Nature*. 2003; 422:198-207
37. Leszczynski D. Radiation Proteomics The effects of ionizing and non ionizing radiation on cells and tissues. London UK: Springer; 2013
38. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1986; 246(4926):64–71
39. Thermo Fisher
40. Cristea IM. Gaskell SJ. Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood*. 2004; 103(10):3624-3634
41. Lange, V., Picotti, P., Domon, B., and Aebersold, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 2008; 4: 222.
42. Chernushevich I.V., Loboda A.V., Thomson B.A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2001; 36: 849–865.

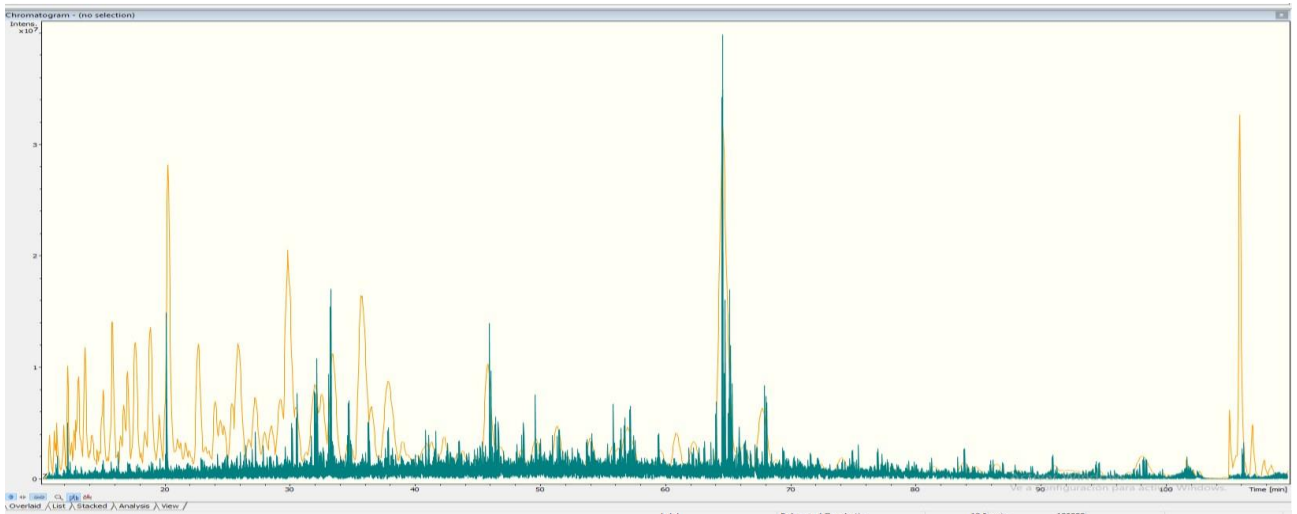
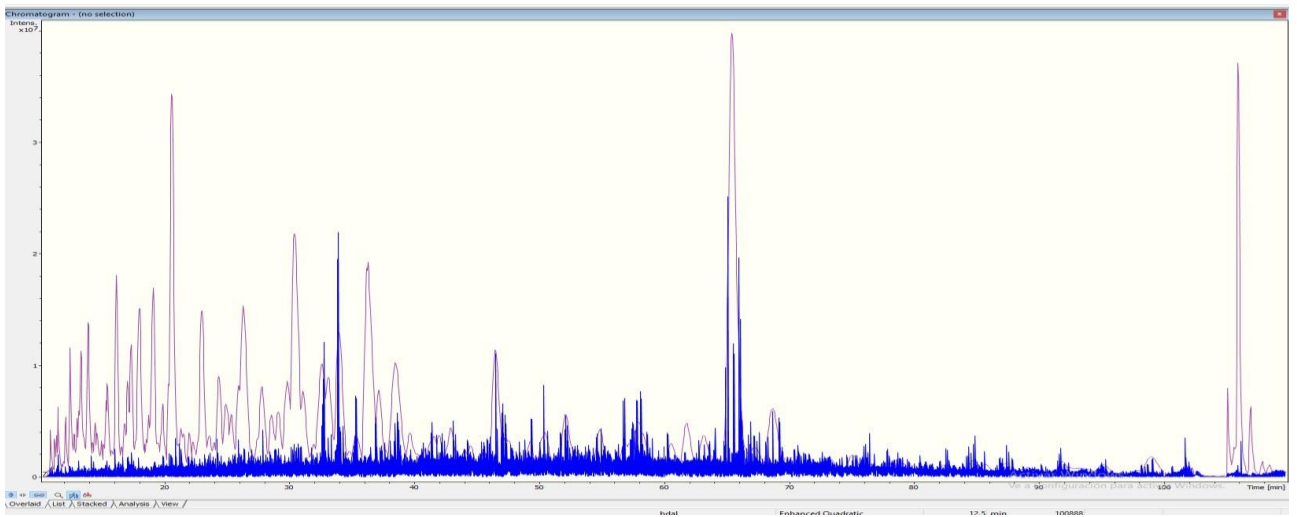
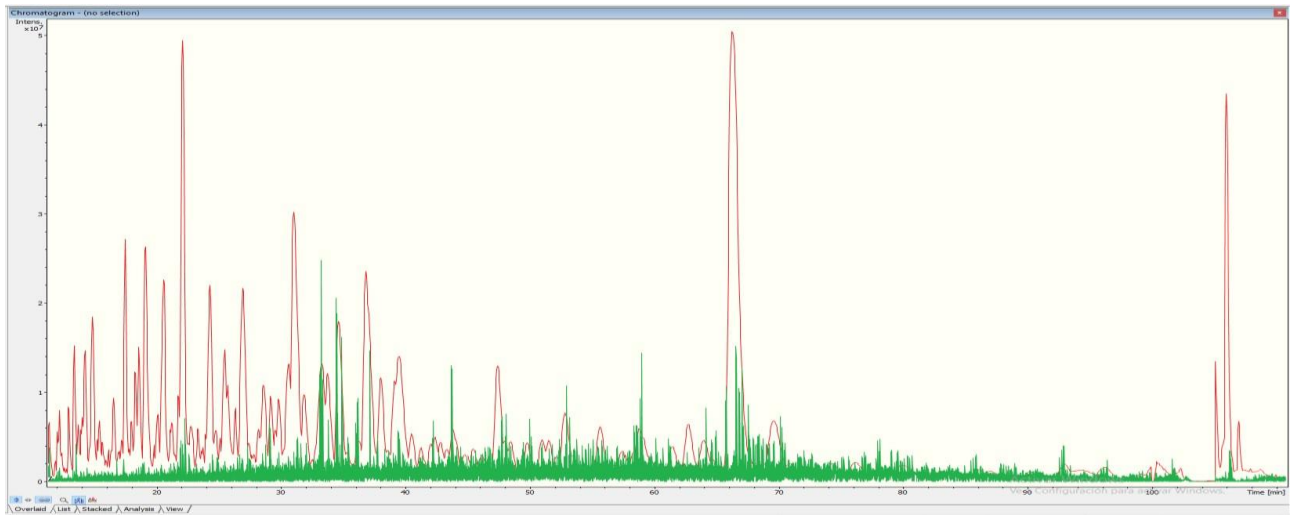
43. S. Beck, A. Michalski, O. Raether, et. Al. The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics .Molecular & Cellular Proteomics. 2015; 14(7): 2014-2029
44. Demartini R. A Short Overview of the Components in Mass Spectrometry Instrumentation for Proteomics Analyses. In: Tandem Mass Spectrometry-Molecular Characterization. InTech. 2001; 1: 39-57
45. Matthiesen R. Mass spectrometry data analysis in proteomics. USA: Humana Press; 2007
46. Eng J.K., McCormack A.L. and Yate J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994; 5: 976–989.
47. Perkins D.N. Pappin D.J. Creasy D.M. and Cottrell J.S. Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 1999: 20; 3551–3567.
48. Bader, G. D., Donaldson, I., Wolting, C., Ouellette, B. F., Pawson, T., and Hogue, C.W. BIND The Biomolecular Interaction Network Database. Nucleic Acids Res. 2001; 29: 242–245.
49. Black KL, Naqvi AS, Asnani M, et al. Aberrant splicing in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Nucleic Acids Res. 2018;46(21):11357–11369.
50. Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, Cavalli L, et al. A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation. Br J Haematol. 2009; 146:689–91.
51. Aster JC, Pear WS, and Blacklow SC The Varied Roles of Notch in Cancer Annu Rev Pathol. 2017 January 24; 12: 245–275.
52. Lukey MJ. Katt WP, and Cerione RA. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy Drug Discov Today. 2017 May ; 22(5): 796–804
53. Malina A. Cencic R., and Pelletier J. Targeting Translation Dependence in Cancer. Oncotarget. 2011 Feb ; 2 : 76-78
54. Deynoux M. Sunter N. Hérault O. and Mazurier F. Hypoxia and Hypoxia-inducible Factors in Leukemias. Frontiers in Oncology. 2016 Feb; 10 (41) : 1-9

11.ANEXOS

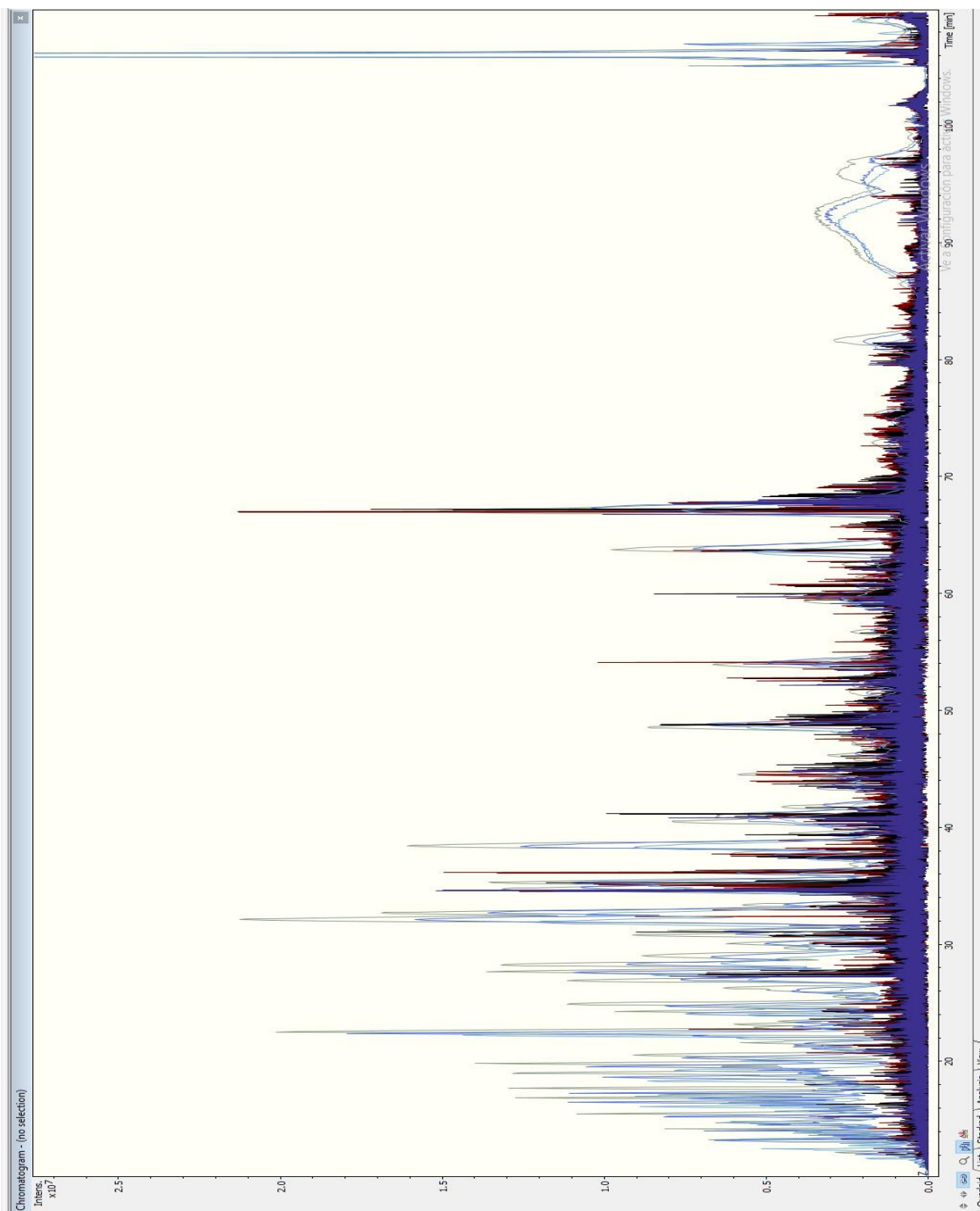
ANEXO 1 Cromatograma de monocultivo sin exposición a vincristina [0 nM] traslape del triplicado



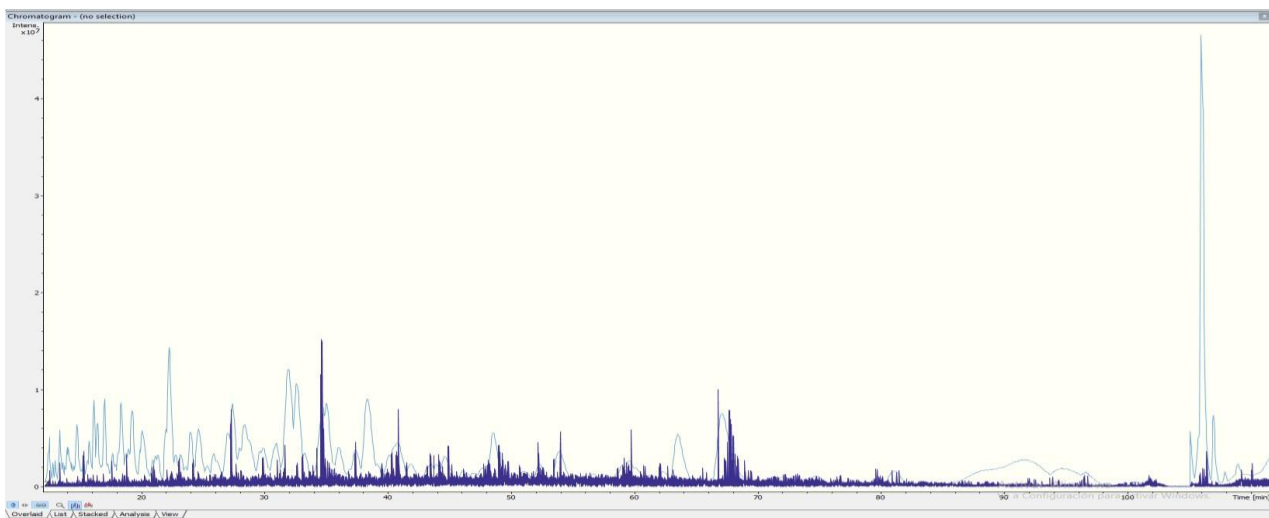
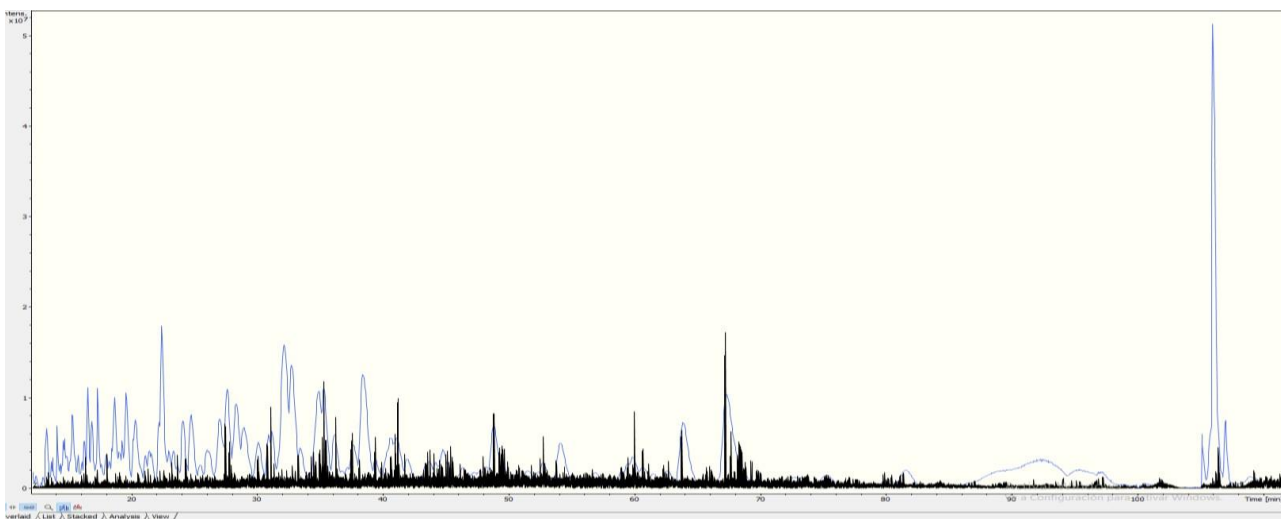
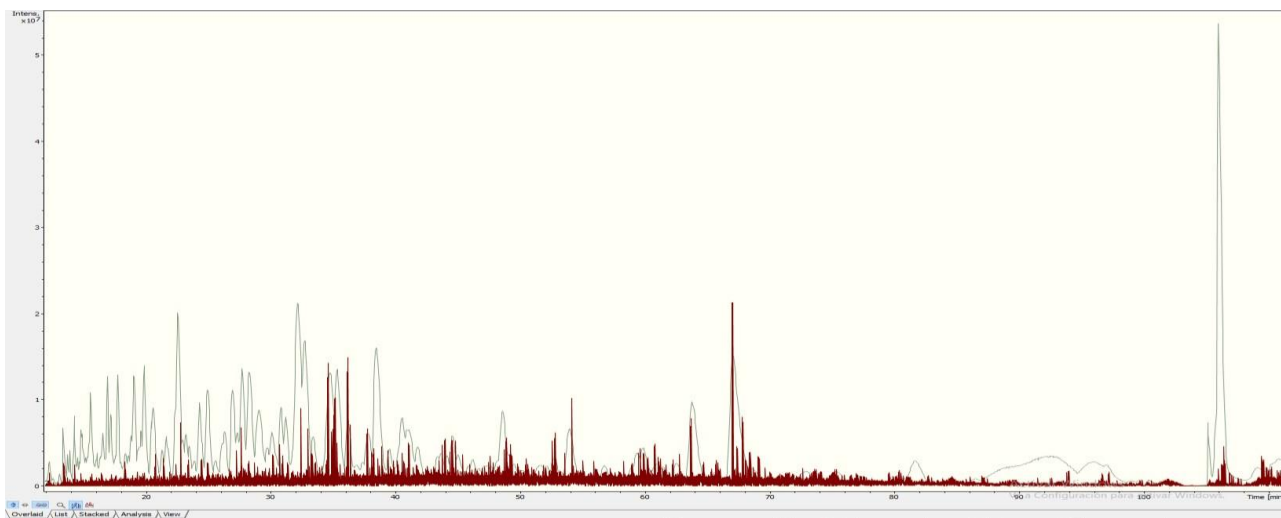
ANEXO 2 Cromatograma de monocultivo sin exposición a vincristina [0 nM] por triplicado



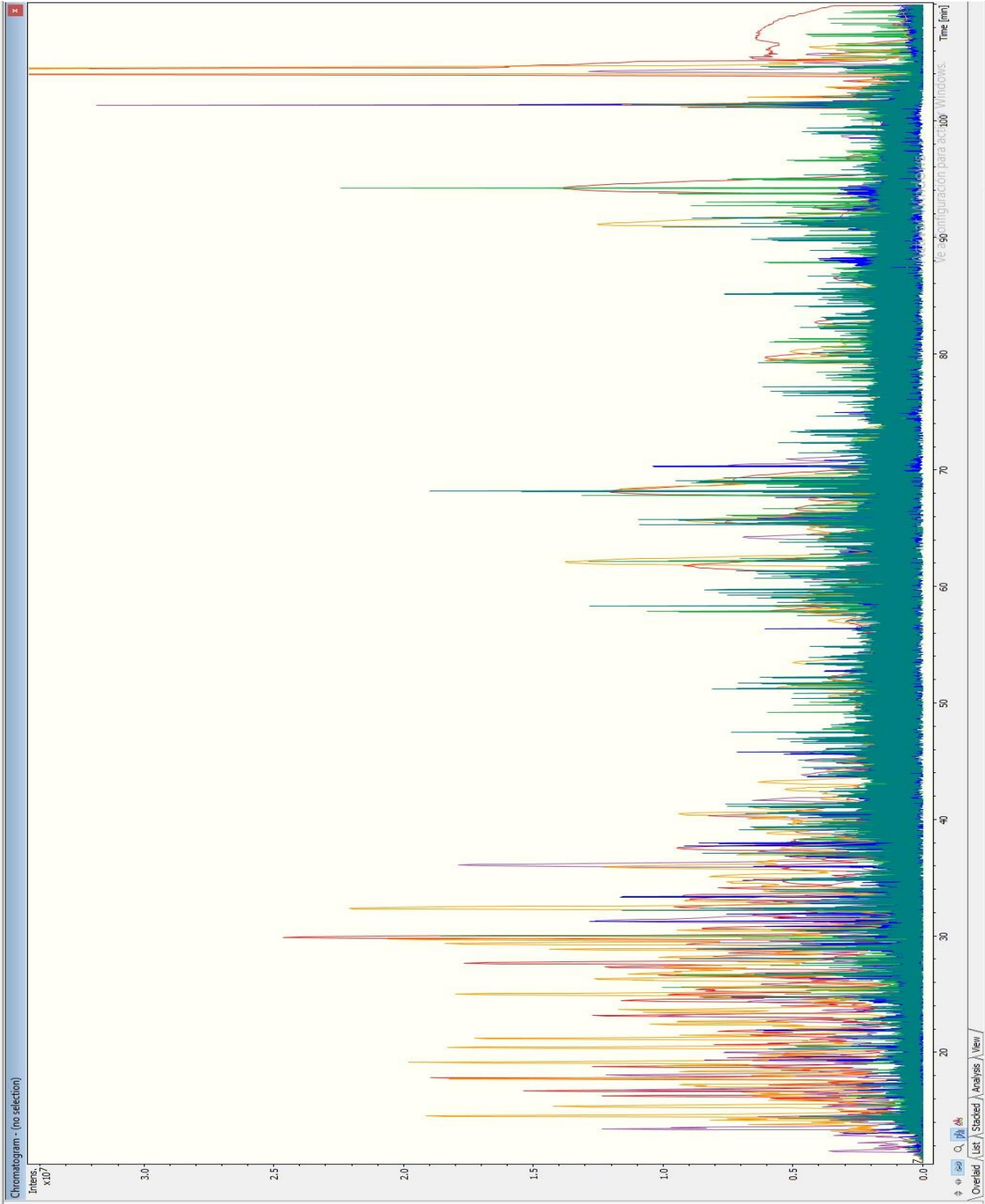
ANEXO 3 Cromatograma de monocultivo con exposición a vincristina [3 nM] traslape del triplicado



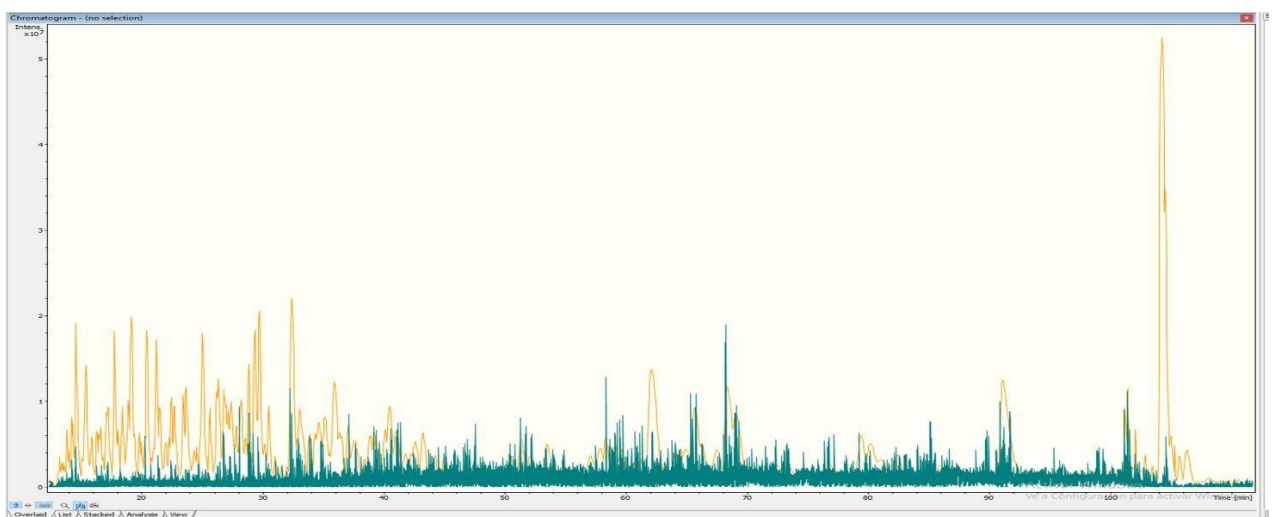
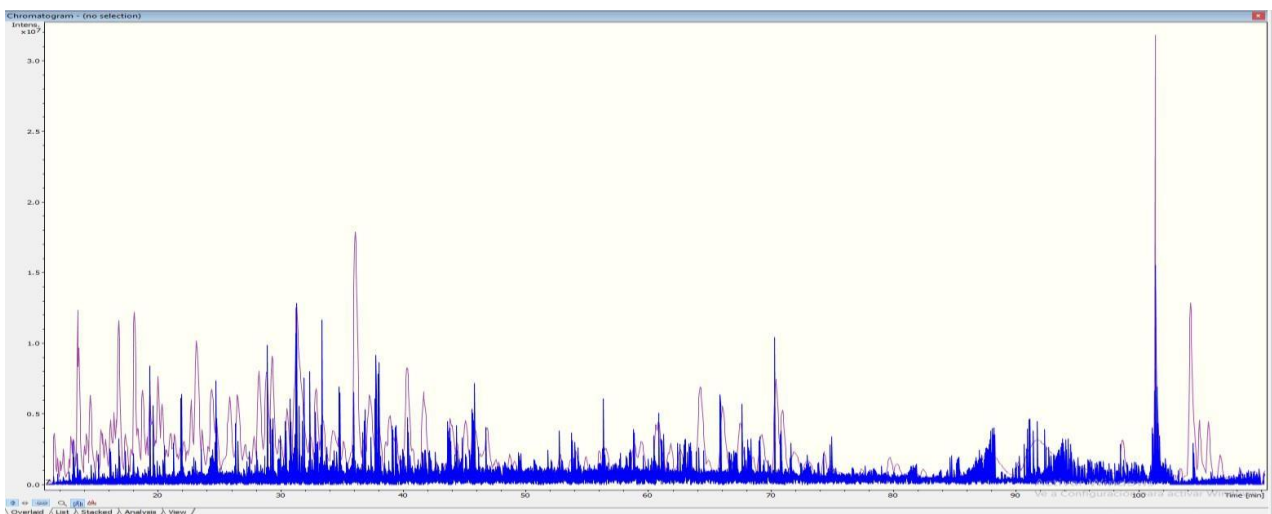
ANEXO 4 Cromatograma de monocultivo con exposición a vincristina [3 nM] por triplicado



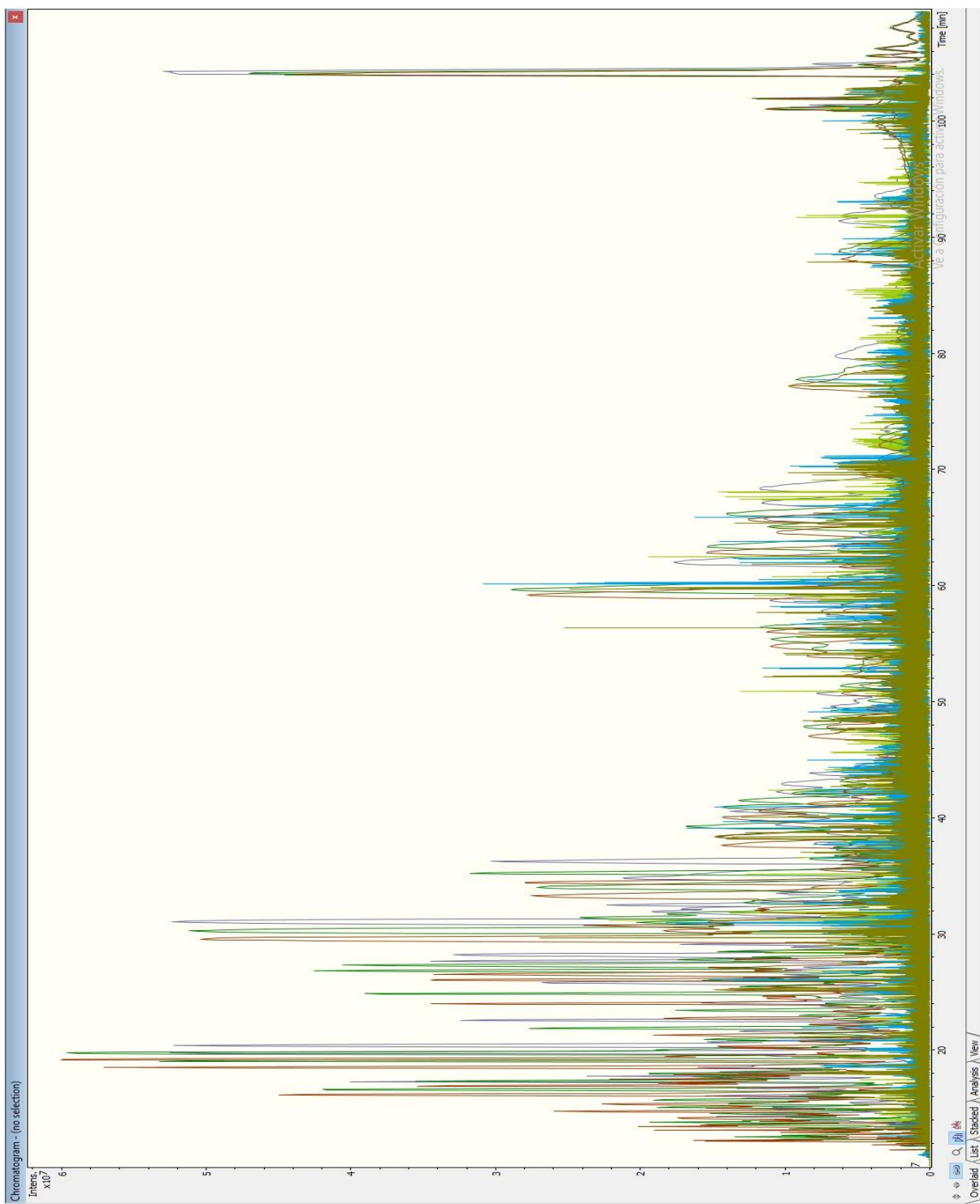
ANEXO 5 Cromatograma de cocultivo sin exposición a vincristina [0 nM] traslape del triplicado



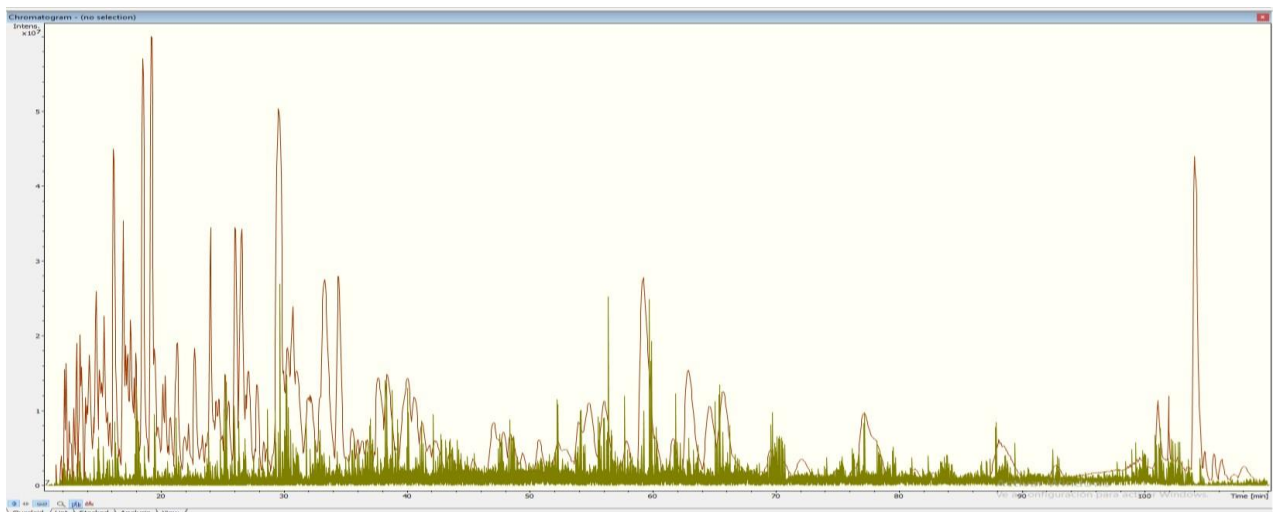
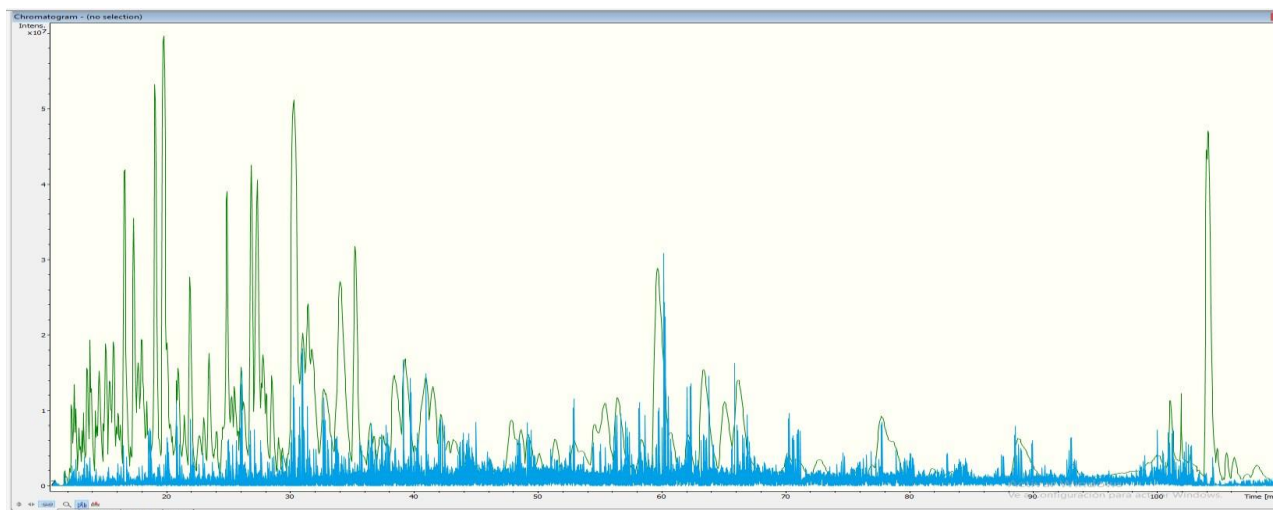
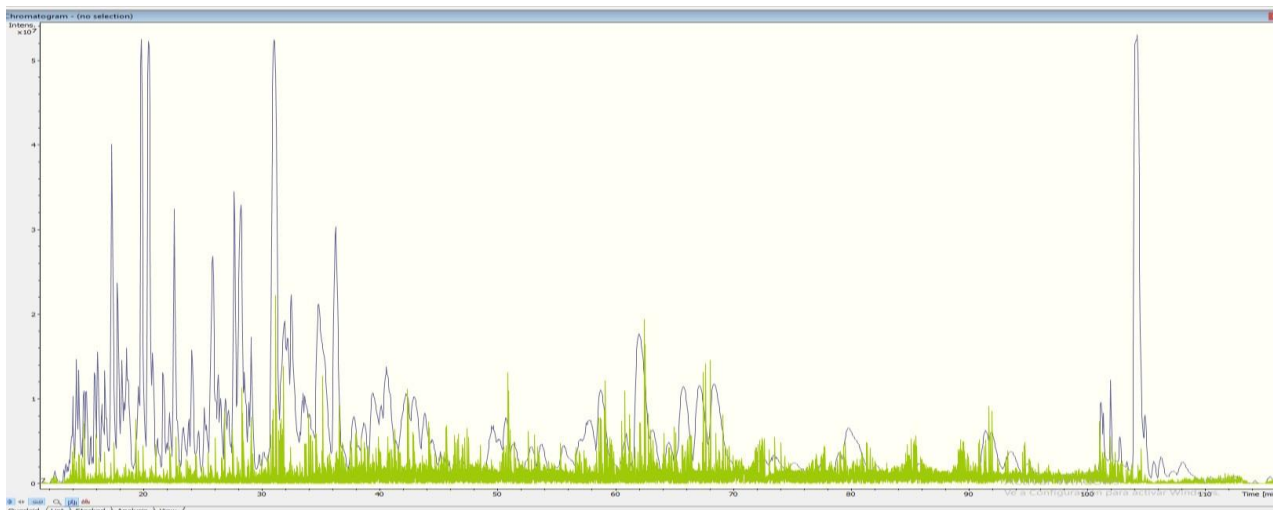
ANEXO 6 Cromatograma de cocultivo sin exposición a vincristina [0 nM] por triplicado



ANEXO 7 Cromatograma de cocultivo con exposición a vincristina [40 nM] traslope del triplicado



ANEXO 8 Cromatograma de cocultivo con exposición a vincristina [40 nM] por triplicado



ANEXO 9 Listas de proteínas identificadas como exclusivas o con regulación diferencial

Proteínas identificadas exclusivamente en Monocultivo 0 nM Vincristina (Figura 23)

Protein IDs	Protein names	Gene names
P62308	Small nuclear ribonucleoprotein G;Putative small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15	SNRPG
Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha;Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	NACA
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	PSMD11
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	PSMD12
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3
O00479	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 4	HMGN4
O14744	Protein arginine N-methyltransferase 5;Protein arginine N-methyltransferase 5, N-terminally processed	PRMT5
O14818	Proteasome subunit alpha type-7;Proteasome subunit alpha type-7-like	PSMA7
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3	SCAMP3
P19105	Myosin regulatory light chain 12A;Myosin regulatory light chain 12B	MYL12A
O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	PPP1R12A
O14976	Cyclin-G-associated kinase	GAK
O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3
O15212	Prefoldin subunit 6	PFDN6
O15260	Surfeit locus protein 4	SURF4
O15355	Protein phosphatase 1G	PPM1G
O15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	EIF3H
O15397	Importin-8	IPO8
O43169	Cytochrome b5 type B	CYB5B
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3
O43264	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	ZW10
O43310	CBP80/20-dependent translation initiation factor	CTIF
O43598	2-deoxynucleoside 5-phosphate N-hydrolase 1	DNPH1
O43615	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	TIMM44
O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3

O43765	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	SGTA
O43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21
O43818	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	RRP9
O43823	A-kinase anchor protein 8	AKAP8
O60232	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1	SSSCA1
O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	SMARCA5
O60610	Protein diaphanous homolog 1	DIAPH1
Q13492	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein;Clathrin coat assembly protein AP180	PICALM
O75352	Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein	MPDU1
O75369	Filamin-B	FLNB
O75607	Nucleoplasmin-3	NPM3
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155	NUP155
O75821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	EIF3G
O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	EIF3J
O95299	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	NDUFA10
O95372	Acyl-protein thioesterase 2	LYPLA2
O95747	Serine/threonine-protein kinase OSR1	OXS1
O95777	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8	LSM8
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1;AP-2 complex subunit alpha-2	AP2A1
O95926	Pre-mRNA-splicing factor SYF2	SYF2
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	PNP
P00966	Argininosuccinate synthase	ASS1
Q93077	Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-B/E	HIST1H2AC
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1
P05114	Non-histone chromosomal protein HMG-14	HMG1
P06730	Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E
P06737	Glycogen phosphorylase, liver form	PYGL
P07602	Prosaposin;Saposin-A;Saposin-B-Val;Saposin-B;Saposin-C;Saposin-D	PSAP
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	FH
P08574	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	CYC1
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	SNRNP70
P09104	Gamma-enolase	ENO2
P0C5J1	Putative protein N-methyltransferase FAM86B2	FAM86B2

P10412	Histone H1.4;Histone H1.3	HIST1H1E
P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	DLAT
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD
P11908	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	PRPS2
P13995	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial;NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase;Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2
P14209	CD99 antigen	CD99
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1
P14635	G2/mitotic-specific cyclin-B1	CCNB1
P15311	Ezrin	EZR
P15927	Replication protein A 32 kDa subunit	RPA2
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	HSPA6
P18077	60S ribosomal protein L35a	RPL35A
P18858	DNA ligase 1	LIG1
P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	ATP5J
P20618	Proteasome subunit beta type-1	PSMB1
P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1
P22059	Oxysterol-binding protein 1	OSBP
P22061	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	PCMT1
P22087	rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	FBL
P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACP1
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1
P25786	Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1
P25787	Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2
P25788	Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	U2AF2
P26640	Valine--tRNA ligase	VAR5
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase;DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, mitochondrial	APEX1
P28074	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5
P28838	Cytosol aminopeptidase	LAP3
P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	ATP5D
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1;Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	PEBP1

P30154	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	PPP2R1B
P30566	Adenylosuccinate lyase	ADSL
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1
P33176	Kinesin-1 heavy chain	KIF5B
P33240	Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2
P33991	DNA replication licensing factor MCM4	MCM4
P34913	Bifunctional epoxide hydrolase 2;Cytosolic epoxide hydrolase 2;Lipid-phosphate phosphatase	EPHX2
P35249	Replication factor C subunit 4	RFC4
P35250	Replication factor C subunit 2	RFC2
P35606	Coatomer subunit beta	COPB2
P35610	Sterol O-acyltransferase 1	SOAT1
P35637	RNA-binding protein FUS	FUS
P35998	26S protease regulatory subunit 7	PSMC2
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14
P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III;Eukaryotic initiation factor 4A-III, N-terminally processed	EIF4A3
P41252	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma;Thymopoietin;Thymopentin	TMPO
P42285	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	SKIV2L2
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LRPPRC
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT
P46063	ATP-dependent DNA helicase Q1	RECQL
P46778	60S ribosomal protein L21	RPL21
P46779	60S ribosomal protein L28	RPL28
P47897	Glutamine--tRNA ligase	QARS
P48507	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	GCLM
P48729	Casein kinase I isoform alpha	CSNK1A1
P49207	60S ribosomal protein L34	RPL34
P49327	Fatty acid synthase;[Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase	FASN
P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	SRP9
P49590	Probable histidine--tRNA ligase, mitochondrial	HARS2
P49720	Proteasome subunit beta type-3	PSMB3
P49750	YLP motif-containing protein 1	YLPM1
P50402	Emerin	EMD
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	CPT1A
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1

P51571	Translocon-associated protein subunit delta	SSR4
P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2;(3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase;Enoyl-CoA hydratase 2	HSD17B4
P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	NDUFA8
P53634	Dipeptidyl peptidase 1;Dipeptidyl peptidase 1 exclusion domain chain;Dipeptidyl peptidase 1 heavy chain;Dipeptidyl peptidase 1 light chain	CTSC
P53985	Monocarboxylate transporter 1	SLC16A1
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	SUB1
P54136	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	RARS
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic;Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic, N-terminally processed	YARS
P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	ATP1B3
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase;Glutamate 5-kinase;Gamma-glutamyl phosphate reductase	ALDH18A1
P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B
P56134	ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5J2
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6
P60953	Cell division control protein 42 homolog	CDC42
P61006	Ras-related protein Rab-8A	RAB8A
P61158	Actin-related protein 3	ACTR3
P61160	Actin-related protein 2	ACTR2
P84077	ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3;ADP-ribosylation factor 5;ADP-ribosylation factor 4	ARF1
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	ABCE1
P61923	Coatomer subunit zeta-1	COPZ1
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA
P62750	60S ribosomal protein L23a	RPL23A
P62879	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	GNB2
P62995	Transformer-2 protein homolog beta	TRA2B
P63173	60S ribosomal protein L38	RPL38
P67870	Casein kinase II subunit beta	CSNK2B
P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3
P68366	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A
P68431	Histone H3.1;Histone H3.1t;Histone H3.3C	HIST1H3A
P78347	General transcription factor II-I	GTF2I
P84095	Rho-related GTP-binding protein RhoG	RHOG

P84098	60S ribosomal protein L19	RPL19
Q00341	Vigilin	HDLBP
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6	CDK6
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	SORD
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP
Q01826	DNA-binding protein SATB1	SATB1
Q01844	RNA-binding protein EWS	EWSR1
Q03252	Lamin-B2	LMNB2
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1
Q04917	14-3-3 protein eta	YWHAH
Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1
Q08257	Quinone oxidoreductase	CRYZ
Q08945	FACT complex subunit SSRP1	SSRP1
Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	NSUN2
Q12788	Transducin beta-like protein 3	TBL3
Q12849	G-rich sequence factor 1	GRSF1
Q12874	Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3
Q12904	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1;Endothelial monocyte-activating polypeptide 2	AIMP1
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1
Q12962	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	TAF10
Q13057	Bifunctional coenzyme A synthase;Phosphopantetheine adenylyltransferase;Dephospho-CoA kinase	COASY
Q13177	Serine/threonine-protein kinase PAK 2;PAK-2p27;PAK-2p34	PAK2
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	PABPC4
Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DYNC1I2
Q13422	DNA-binding protein Ikaros	IKZF1
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2
Q13573	SNW domain-containing protein 1	SNW1
Q13724	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	MOGS
Q13740	CD166 antigen	ALCAM
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B
Q14008	Cytoskeleton-associated protein 5	CKAP5
Q14157	Ubiquitin-associated protein 2-like	UBAP2L
Q14166	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	TTL12
Q14444	Caprin-1	CAPRIN1
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	MDC1
Q14847	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1
Q14978	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1

Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H
Q15149	Plectin	PLEC
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	PPA1
Q15370	Transcription elongation factor B polypeptide 2	TCEB2
Q15459	Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1
Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	MAPRE2
Q15631	Translin	TSN
Q15637	Splicing factor 1	SF1
Q15645	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13
Q16531	DNA damage-binding protein 1	DDB1
Q16576	Histone-binding protein RBBP7	RBBP7
Q16630	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6
Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16	IFI16
Q16740	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	CLPP
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain	TUBB8
Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIMM50
Q53GS9	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39
Q53H12	Acylglycerol kinase, mitochondrial	AGK
Q56VL3	OCIA domain-containing protein 2	OCIAD2
Q58FF6	Putative heat shock protein HSP 90-beta 4	HSP90AB4P
Q58FF8	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	HSP90AB2P
Q6IBS0	Twinfilin-2	TWF2
Q6P2E9	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	EDC4
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8
Q6PIU2	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	NCEH1
Q6UX04	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CWC27 homolog	CWC27
Q7Z5L9	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	IRF2BP2
Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1
Q86UP2	Kinectin	KTN1
Q86XP3	ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42
Q8IVT2	Mitotic interactor and substrate of PLK1	MISP
Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93	NUP93
Q8N1G4	Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRC47
Q8N1K5	Protein THEMIS	THEMIS
Q8NBX0	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	SCCPDH
Q8NI27	THO complex subunit 2	THOC2
Q8WWM7	Ataxin-2-like protein	ATXN2L
Q8WXF1	Paraspeckle component 1	PSPC1
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1

Q92556	Engulfment and cell motility protein 1	ELMO1
Q92598	Heat shock protein 105 kDa	HSPH1
Q92619	Minor histocompatibility protein HA-1;Minor histocompatibility antigen HA-1	HMHA1
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1	UPF1
Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	SMARCC1
Q969G3	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1	SMARCE1
Q96A26	Protein FAM162A	FAM162A
Q96CT7	Coiled-coil domain-containing protein 124	CCDC124
Q96CW5	Gamma-tubulin complex component 3	TUBGCP3
Q96EP5	DAZ-associated protein 1	DAZAP1
Q96EU6	Ribosomal RNA processing protein 36 homolog	RRP36
Q96EY1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	DNAJA3
Q96F07	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2;Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFIP2;CYFIP1
Q96HE7	ERO1-like protein alpha	ERO1L
Q96N23	Cilia- and flagella-associated protein 54	CFAP54
Q96P70	Importin-9	IPO9
Q96PZ0	Pseudouridylylase synthase 7 homolog	PUS7
Q99426	Tubulin-folding cofactor B	TBCB
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	CDC5L
Q99598	Translin-associated protein X	TSNAX
Q99627	COP9 signalosome complex subunit 8	COPS8
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB
Q9BQ52	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	ELAC2
Q9BQ69	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1	MACROD1
Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	MYBBP1A
Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	ERP44
Q9BT67	NEDD4 family-interacting protein 1	NDFIP1
Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	HNRNPUL1
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3
Q9BWF3	RNA-binding protein 4	RBM4
Q9BXP5	Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT
Q9BZE4	Nucleolar GTP-binding protein 1	GTPBP4
Q9BZF1	Oxysterol-binding protein-related protein 8	OSBPL8
Q9BZZ5	Apoptosis inhibitor 5	API5
Q9GZL7	Ribosome biogenesis protein WDR12	WDR12
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B
Q9H307	Pinin	PNN

Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1;HEAT repeat-containing protein 1, N-terminally processed	HEATR1
Q9H910	Hematological and neurological expressed 1-like protein	HN1L
Q9H9J2	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	MRPL44
Q9NQC3	Reticulon-4	RTN4
Q9NR46	Endophilin-B2	SH3GLB2
Q9NRN7	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	AASDHPPT
Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	FARSB
Q9NUQ9	Protein FAM49B	FAM49B
Q9NUU7	ATP-dependent RNA helicase DDX19A;ATP-dependent RNA helicase DDX19B	DDX19A
Q9NVS9	Pyridoxine-5-phosphate oxidase	PNPO
Q9NWR8	Calcium uniporter regulatory subunit MCUb, mitochondrial	CCDC109B
Q9NWW4	UPF0587 protein C1orf123	C1orf123
Q9NXG2	THUMP domain-containing protein 1	THUMPD1
Q9NY12	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	GAR1
Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3	DPP3
Q9NYL9	Tropomodulin-3	TMOD3
Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	CISD1
Q9NZZ3	Charged multivesicular body protein 5	CHMP5
Q9P000	COMM domain-containing protein 9	COMMD9
Q9UBX3	Mitochondrial dicarboxylate carrier	SLC25A10
Q9UEW8	STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase	STK39
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	SEC63
Q9UHD8	Septin-9	
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	PFDN2
Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	STOML2
Q9UK76	Hematological and neurological expressed 1 protein;Hematological and neurological expressed 1 protein, N-terminally processed	HN1
Q9UKY7	Protein CDV3 homolog	CDV3
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2
Q9UNZ2	NSFL1 cofactor p47	NSFL1C
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	C14orf166
Q9Y262	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	EIF3L
Q9Y265	RuvB-like 1	RUVBL1
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	DRG1

Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1
Q9Y2S7	Polymerase delta-interacting protein 2	POLDIP2
Q9Y333	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	LSM2
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP
Q9Y3P8	Signaling threshold-regulating transmembrane adapter 1	SIT1
Q9Y5A9	YTH domain-containing family protein 2	YTHDF2
Q9Y6C9	Mitochondrial carrier homolog 2	MTCH2

Proteínas identificadas exclusivamente en Monocultivo 3 nM Vincristina (**Figura 23**)

Protein IDs	Protein names	Gene names
O00233	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	PSMD9
O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHERF1	SLC9A3R1
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2
O43324	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	EEF1E1
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2
O43504	Ragulator complex protein LAMTOR5	LAMTOR5
O43670	BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207	ZNF207
O43681	ATPase ASNA1	ASNA1
O60711	Leupaxin	LPXN
O60831	PRA1 family protein 2	PRAF2
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1
O60880	SH2 domain-containing protein 1A	SH2D1A
O75425	Motile sperm domain-containing protein 3	MOSPD3
O75489	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H
O94776	Metastasis-associated protein MTA2	MTA2
O95319	CUGBP Elav-like family member 2	CELF2
O95379	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8	TNFAIP8
O95433	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1
O95684	FGFR1 oncogene partner	FGFR1OP
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2
P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1
P02794	Ferritin heavy chain;Ferritin heavy chain, N-terminally processed	FTH1
P04083	Annexin A1	ANXA1

P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B
P04818	Thymidylate synthase	TYMS
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15
P06239	Tyrosine-protein kinase Lck	LCK
P06493	Cyclin-dependent kinase 1	CDK1
P07108	Acyl-CoA-binding protein	DBI
P07766	T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain	CD3E
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B
P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM
P11498	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	PC
P12236	ADP/ATP translocase 3;ADP/ATP translocase 3, N-terminally processed;ADP/ATP translocase 1	SLC25A6
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	LAMP2
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	MIF
P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	HCLS1
P63162	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N;Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B	SNRPN
P15153	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	NME1
P15924	Desmoplakin	DSP
P18065	Insulin-like growth factor-binding protein 2	IGFBP2
P18621	60S ribosomal protein L17	RPL17
P19623	Spermidine synthase	SRM
Q9NRH3	Tubulin gamma-2 chain;Tubulin gamma-1 chain	TUBG2
P24534	Elongation factor 1-beta	EEF1B2
P24941	Cyclin-dependent kinase 2;Cyclin-dependent kinase 3	CDK2
P26639	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TARS
P27816	Microtubule-associated protein 4	MAP4
P27824	Calnexin	CANX
P28072	Proteasome subunit beta type-6	PSMB6
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	ADSS
P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	CPS1
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit	RPA3
P35613	Basigin	BSG
P35754	Glutaredoxin-1	GLRX
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT

P41567	Eukaryotic translation initiation factor 1;Eukaryotic translation initiation factor 1b	EIF1
P46087	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2
P46100	Transcriptional regulator ATRX	ATRX
P46776	60S ribosomal protein L27a	RPL27A
P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	STT3A
P49589	Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	CARS
P49591	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	SARS
P49756	RNA-binding protein 25	RBM25
P50502	Hsc70-interacting protein;Putative protein FAM10A4;Putative protein FAM10A5	ST13
P51610	Host cell factor 1;HCF N-terminal chain 1;HCF N-terminal chain 2;HCF N-terminal chain 3;HCF N-terminal chain 4;HCF N-terminal chain 5;HCF N-terminal chain 6;HCF C-terminal chain 1;HCF C-terminal chain 2;HCF C-terminal chain 3;HCF C-terminal chain 4;HCF C-terminal chain 5;HCF C-terminal chain 6	HCFC1
P52434	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	POLR2H
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed	HNRNPF
P53597	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	SUCLG1
P53618	Coatomer subunit beta	COPB1
P54725	UV excision repair protein RAD23 homolog A	RAD23A
P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	PSMD4
P55327	Tumor protein D52	TPD52
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	NPEPPS
P56192	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	MARS
P58546	Myotrophin	MTPN
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4
P62837	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2;Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	UBE2D2
P61956	Small ubiquitin-related modifier 2;Small ubiquitin-related modifier 4;Small ubiquitin-related modifier 3	SUMO2
P61960	Ubiquitin-fold modifier 1	UFM1
P62191	26S protease regulatory subunit 4	PSMC1
P62495	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	ETF1
P62854	40S ribosomal protein S26;Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	RPS26
P62861	40S ribosomal protein S30	FAU
P62910	60S ribosomal protein L32	RPL32

P63151	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform;Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform;Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform	PPP2R2A
P63167	Dynein light chain 1, cytoplasmic;Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYNLL1
P63261	Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed	ACTG1
P63313	Thymosin beta-10	TMSB10
P82909	28S ribosomal protein S36, mitochondrial	MRPS36
P84243	Histone H3.3	H3F3A
Q01196	Runt-related transcription factor 1	RUNX1
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11
Q10713	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	PMPCA
Q12873	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3;Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4;Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	CHD3
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1
Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2	LCP2
Q13148	TAR DNA-binding protein 43	TARDBP
Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	PIN1
Q13561	Dynactin subunit 2	DCTN2
Q13867	Bleomycin hydrolase	BLMH
Q14145	Kelch-like ECH-associated protein 1	KEAP1
Q14257	Reticulocalbin-2	RCN2
Q14651	Plastin-1	PLS1
Q15369	Transcription elongation factor B polypeptide 1	TCEB1
Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	TOMM34
Q16186	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	ADRM1
Q16795	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	NDUFA9
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HADH
Q16891	MICOS complex subunit MIC60	IMMT
Q3MIT2	Putative tRNA pseudouridine synthase Pus10	PUS10
Q9Y6H1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2;Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial	CHCHD2
Q6DD88	Atlastin-3	ATL3
Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	MTHFD1L

Q6ZMV7	Leucine-, glutamate- and lysine-rich protein 1	LEKR1
Q7L1Q6	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1
Q9BYJ9	YTH domain-containing family protein 1;YTH domain-containing family protein 3	YTHDF1
Q86Y13	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	DZIP3
Q8IU6	Histone H2A type 2-B	HIST2H2AB
Q8IYD1	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	GSPT2
Q8IYT4	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	KATNAL2
Q9NP97	Dynein light chain roadblock-type 1;Dynein light chain roadblock-type 2	DYNLRB1
Q8WXC6	Myeloma-overexpressed gene 2 protein	MYEOV2
Q8WXE9	Stonin-2	STON2
Q8WYJ6	Septin-1	sep-01
Q92522	Histone H1x	H1FX
Q92526	T-complex protein 1 subunit zeta-2	CCT6B
Q92530	Proteasome inhibitor PI31 subunit	PSMF1
Q92797	Symplekin	SYMPK
Q93045	Stathmin-2	STMN2
Q93084	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	ATP2A3
Q96C36	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	PYCR2
Q96DA6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	DNAJC19
Q96DN2	von Willebrand factor C and EGF domain-containing protein	VWCE
Q96G23	Ceramide synthase 2	CERS2
Q96HQ2	CDKN2AIP N-terminal-like protein	CDKN2AIPNL
Q96HR8	H/ACA ribonucleoprotein complex non-core subunit NAF1	NAF1
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2
Q96P48	Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	ARAP1
Q96S97	Myeloid-associated differentiation marker	MYADM
Q9BSD7	Cancer-related nucleoside-triphosphatase	NTPCR
Q9BVC6	Transmembrane protein 109	TMEM109
Q9BY43	Charged multivesicular body protein 4a	CHMP4A
Q9GZP9	Derlin-2	DERL2
Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3BGRL3
Q9H3K6	BolA-like protein 2	BOLA2
Q9HC38	Glyoxalase domain-containing protein 4	GLOD4
Q9NP79	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	VTA1
Q9NQT5	Exosome complex component RRP40	EXOSC3
Q9NRP0	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	OSTC

Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	TOMM22
Q9NTJ3	Structural maintenance of chromosomes protein 4	SMC4
Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	TRMT1
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR
Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5	CALML5
Q9UBQ0	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	VPS29
Q9UHI6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	DDX20
Q9UI30	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	TRMT112
Q9UJU6	Drebrin-like protein	DBNL
Q9UKK9	ADP-sugar pyrophosphatase	NUDT5
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	PSME2
Q9Y285	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	FARSA
Q9Y2V2	Calcium-regulated heat stable protein 1	CARHSP1
Q9Y2W2	WW domain-binding protein 11	WBP11
Q9Y3D6	Mitochondrial fission 1 protein	FIS1
Q9Y4Y9	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM5	LSM5
Q9Y512	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	SAMM50
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	SRPRB

Proteínas identificadas exclusivamente en Cocultivo 0 nM Vincristina (**Figura 24**)

Protein IDs	Protein names	Gene names
O00567	Nucleolar protein 56	NOP56
O14744	Protein arginine N-methyltransferase 5;Protein arginine N-methyltransferase 5, N-terminally processed	PRMT5
O75340	Programmed cell death protein 6	PDCD6
O75369	Filamin-B	FLNB
O75390	Citrate synthase, mitochondrial	CS
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B
O75431	Metaxin-2	MTX2
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	SLC25A12
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1
O95342	Bile salt export pump	ABCB11
O95373	Importin-7	IPO7

O96008	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	TOMM40
P02751	Fibronectin;Anastellin;Ugl-Y1;Ugl-Y2;Ugl-Y3	FN1
P04083	Annexin A1	ANXA1
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1
P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2
P06454	Prothymosin alpha;Prothymosin alpha, N-terminally processed;Thymosin alpha-1	PTMA
P08133	Annexin A6	ANXA6
P08174	Complement decay-accelerating factor	CD55
P08473	Neprilysin	MME
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	PDHA1
P09525	Annexin A4	ANXA4
P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLD
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	SNRPA1
P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	LTA4H
P0DN76	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit;Splicing factor U2AF 26 kDa subunit	U2AF1;U2AF1L4
P10412	Histone H1.4;Histone H1.3	HIST1H1E;HIST1H1D
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB
P11940	Polyadenylate-binding protein 1;Polyadenylate-binding protein 3	PABPC1;PABPC3
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5
P13807	Glycogen [starch] synthase, muscle	GYS1
P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	DARS
P15121	Aldose reductase	AKR1B1
P17931	Galectin-3	LGALS3
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1
P18669	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1
P19367	Hexokinase-1	HK1
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	COX5A
P23528	Cofilin-1	CFL1
P26373	60S ribosomal protein L13	RPL13
P26447	Protein S100-A4	S100A4
P26583	High mobility group protein B2	HMGB2
P26641	Elongation factor 1-gamma	EEF1G
P27635	60S ribosomal protein L10	RPL10
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase;DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, mitochondrial	APEX1
P29972	Aquaporin-1	AQP1

P31946	14-3-3 protein beta/alpha;14-3-3 protein beta/alpha, N-terminally processed	YWHAB
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1
P31949	Protein S100-A11;Protein S100-A11, N-terminally processed	S100A11
P32969	60S ribosomal protein L9	RPL9
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATP5C1
P36915	Guanine nucleotide-binding protein-like 1	GNL1
P37837	Transaldolase	TALDO1
P39019	40S ribosomal protein S19	RPS19
P39023	60S ribosomal protein L3	RPL3
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	DDOST
P39687	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	ANP32A
P39748	Flap endonuclease 1	FEN1
P40429	60S ribosomal protein L13a;Putative 60S ribosomal protein L13a protein RPL13AP3	RPL13A;RPL13AP3
P40937	Replication factor C subunit 5	RFC5
Q9BY66	Lysine-specific demethylase 5D;Lysine-specific demethylase 5C	KDM5D;KDM5C
P42677	40S ribosomal protein S27	RPS27
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LRPPRC
P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	GPD2
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2
P46782	40S ribosomal protein S5;40S ribosomal protein S5, N-terminally processed	RPS5
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP
P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial;3-ketoacyl-CoA thiolase	HADHB
P61019	Ras-related protein Rab-2A;Ras-related protein Rab-2B	RAB2A;RAB2B
P62834	Ras-related protein Rap-1A;Ras-related protein Rap-1b;Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1A;RAP1B
P61254	60S ribosomal protein L26;60S ribosomal protein L26-like 1	RPL26;RPL26L1
P62195	26S protease regulatory subunit 8	PSMC5
P62241	40S ribosomal protein S8	RPS8
P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAE
P62263	40S ribosomal protein S14	RPS14
P62269	40S ribosomal protein S18	RPS18
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E	SNRPE

P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SNRPD2
P62328	Thymosin beta-4;Hematopoietic system regulatory peptide	TMSB4X
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform;40S ribosomal protein S4, Y isoform 1	RPS4X;RPS4Y1
P62829	60S ribosomal protein L23	RPL23
P62879	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	GNB2;GNB4
P68371	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	TUBB4B;TUBB4A
P80723	Brain acid soluble protein 1	BASP1
P84098	60S ribosomal protein L19	RPL19
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3
Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1
Q02878	60S ribosomal protein L6	RPL6
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4
Q12965	Unconventional myosin-Ie;Unconventional myosin-I f	MYO1E;MYO1F
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6;Serine/arginine-rich splicing factor 4	SRSF6;SRSF4
Q13509	Tubulin beta-3 chain	TUBB3
Q14141	Septin-6	sep-06
Q14315	Filamin-C	FLNC
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3
Q15436	Protein transport protein Sec23A	SEC23A
Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7	SRSF7
Q16719	Kynureninase	KYNU
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2
Q3LXA3	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing);ATP-dependent dihydroxyacetone kinase;FAD-AMP lyase (cyclizing)	DAK
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	PTRF
Q8NB78	Lysine-specific histone demethylase 1B	KDM1B
Q92504	Zinc transporter SLC39A7	SLC39A7
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	KHSRP
Q96DN6	Methyl-CpG-binding domain protein 6	MBD6
Q96PK6	RNA-binding protein 14	RBM14
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	ESYT1
Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E

Q9P0L0	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2	MRC2
Q9UNS2	COP9 signalosome complex subunit 3	COPS3
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	NUDC
Q9Y2Z0	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	SUGT1
Q9Y3E0	Vesicle transport protein GOT1B	GOLT1B
Q9Y678	Coatomer subunit gamma-1	COPG1

Proteínas identificadas exclusivamente en Cocultivo 40 nM Vincristina (Figura 24)

Protein IDs	Protein names	Gene names
A8MPP1	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX11-like protein 8;Putative ATP-dependent RNA helicase DDX12;Probable ATP-dependent RNA helicase DDX11	DDX11L8
O15042	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	U2SURP
O43865	Putative adenosylhomocysteinase 2;Putative adenosylhomocysteinase 3	AHCYL1
O95197	Reticulon-3	RTN3
O95819	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	MAP4K4
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2
P05386	60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1
P06703	Protein S100-A6	S100A6
P06865	Beta-hexosaminidase subunit alpha	HEXA
P07737	Profilin-1	PFN1
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1
Q71UI9	Histone H2A.V;Histone H2A.Z	H2AFV
P12268	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2
P12429	Annexin A3	ANXA3
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX4I1
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4
P13693	Translationally-controlled tumor protein	TPT1
P13797	Plastin-3	PLS3
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	MIF
P14314	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1
P16949	Stathmin	STMN1
P17812	CTP synthase 1	CTPS1
P18124	60S ribosomal protein L7	RPL7

P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform;V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform	ATP6V1B2;ATP6V1B1
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3;Phosphoribosylamine--glycine ligase;Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase;Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B;Putative nucleoside diphosphate kinase	NME2
P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	ATP5F1
P26038	Moesin	MSN
P27797	Calreticulin	CALR
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUFS1
P30041	Peroxiredoxin-6	PRDX6
P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12
P31146	Coronin-1 ^a	CORO1A
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRNPH3
P33992	DNA replication licensing factor MCM5	MCM5
P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHMT2
P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	LONP1
P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome;RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed;RNA binding motif protein, X-linked-like-1	RBMX
P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1
P43243	Matrin-3	MATR3
P43686	26S protease regulatory subunit 6B	PSMC4
P46783	40S ribosomal protein S10;Putative 40S ribosomal protein S10-like	RPS10
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMED10
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4
P51570	Galactokinase	GALK1
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDI2

P61026	Ras-related protein Rab-10	RAB10
P62249	40S ribosomal protein S16	RPS16
P62491	Ras-related protein Rab-11A;Ras-related protein Rab-11B	RAB11A;RAB11B
P62753	40S ribosomal protein S6	RPS6
P63010	AP-2 complex subunit beta	AP2B1
P63220	40S ribosomal protein S21	RPS21
P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, N-terminally processed	GNB2L1
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1
Q08945	FACT complex subunit SSRP1	SSRP1
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	ILF2
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B
Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB
Q15008	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	PSMD6
Q15046	Lysine--tRNA ligase	KARS
Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	MAPRE2
Q5M9N0	Coiled-coil domain-containing protein 158	CCDC158
Q6PKG0	La-related protein 1	LARP1
Q7Z7K6	Centromere protein V	CENPV
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1
Q8NEZ4	Histone-lysine N-methyltransferase 2C	KMT2C
Q8WVB6	Chromosome transmission fidelity protein 18 homolog	CHTF18
Q92896	Golgi apparatus protein 1	GLG1
Q96FQ6	Protein S100-A16	S100A16
Q9H8Q6	Putative uncharacterized protein encoded by HEXA-AS1	HEXA-AS1
Q9UII2	ATPase inhibitor, mitochondrial	ATPIF1
Q9UMX0	Ubiquilin-1;Ubiquilin-2	UBQLN1
Q9Y547	Intraflagellar transport protein 25 homolog	HSPB11

Proteínas compartidas entre los monocultivos con 0 nM y 3 nM de vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 30**). Mas abundantes en 3nM vincristina que en 0 nM

Protein IDs	Protein names	Gene names
-------------	---------------	------------

P06454	Prothymosin alpha;Prothymosin alpha, N-terminally processed;Thymosin alpha-1	PTMA
P0DP25	Calmodulin-3	CALM3
P14314	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1
P62328	Thymosin beta-4;Hematopoietic system regulatory peptide	TMSB4X
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4
Q99623	Prohibitin-2	PHB2

Proteínas compartidas entre los monocultivos con 0 nM y 3 nM de vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 30**). Mas abundantes sin vincristina que en 3 nM

P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1
P11940	Polyadenylate-binding protein 1;Polyadenylate-binding protein 3	PABPC1
P13639	Elongation factor 2	EEF2
P16403	Histone H1.2	HIST1H1C
P21333	Filamin-A	FLNA
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5
P61586	Transforming protein RhoA	RHOA
P62081	40S ribosomal protein S7	RPS7
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3
P78371	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2
Q00610	Clathrin heavy chain 1	CLTC
Q14974	Importin subunit beta-1	KPNB1
Q16777	Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 2-A	HIST2H2AC
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7

Proteínas compartidas entre los monocultivos con 0 nM y 3 nM de vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 31**). Cluster 409 más abundantes sin vincristina que en 3 nM.

Protein IDs	Protein names	Gene names
O75367	Core histone macro-H2A.1	H2AFY
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12
P15880	40S ribosomal protein S2	RPS2
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28
P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1
P62424	60S ribosomal protein L7a	RPL7A
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP

Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1
P43243	Matrin-3	MATR3
P55769	NHP2-like protein 1;NHP2-like protein 1, N-terminally processed	NHP2L1
P61586	Transforming protein RhoA	RHOA
P78417	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1
Q9Y310	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB
P09429	High mobility group protein B1;Putative high mobility group protein B1-like 1	HMGB1
P12814	Alpha-actinin-1	ACTN1
Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4, N-terminally processed	FKBP4
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4
P55060	Exportin-2	CSE1L
P21333	Filamin-A	FLNA
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, N-terminally processed;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	HNRNPA1
P26583	High mobility group protein B2	HMGB2
Q15185	Prostaglandin E synthase 3	PTGES3
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain	TUBB8
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5
P47914	60S ribosomal protein L29	RPL29
Q9UKY7	Protein CDV3 homolog	CDV3
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14
P13639	Elongation factor 2	EEF2
Q9BWF3	RNA-binding protein 4	RBM4
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7
P16403	Histone H1.2	HIST1H1C
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1;Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	PEBP1
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5
Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7	SRSF7
P26640	Valine--tRNA ligase	VARS
Q9UNZ2	NSFL1 cofactor p47	NSFL1C
P15311	Ezrin	EZR
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1

O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15
P78371	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3
O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F
Q15046	Lysine--tRNA ligase	KARS
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A
Q16777	Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 2-A	HIST2H2AC
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB
Q969Q0	60S ribosomal protein L36a-like;60S ribosomal protein L36a	RPL36AL
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	NUDC
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2	DDX21
P46783	40S ribosomal protein S10;Putative 40S ribosomal protein S10-like	RPS10
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2
P62820	Ras-related protein Rab-1A	RAB1A
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	PFDN2
P36578	60S ribosomal protein L4	RPL4
P22234	Multifunctional protein ADE2;Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase;Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	PAICS
P61158	Actin-related protein 3	ACTR3
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1BP3
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	AARS
P63173	60S ribosomal protein L38	RPL38
Q00610	Clathrin heavy chain 1	CLTC
O00422	Histone deacetylase complex subunit SAP18	SAP18
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	CAND1
P62081	40S ribosomal protein S7	RPS7
P62249	40S ribosomal protein S16	RPS16
P49736	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2
Q14974	Importin subunit beta-1	KPNB1
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA
Q8N1G4	Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRC47
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	ABCE1
Q9P2J5	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	LARS

P08670	Vimentin	VIM
P11940	Polyadenylate-binding protein 1;Polyadenylate-binding protein 3	PABPC1
P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	PPA1
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	RPN2
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5
P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1;Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	EIF5A
O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1

Proteínas compartidas entre los monocultivos con 0 nM y 3 nM de vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 31**). Cluster 424 más abundantes con 3 nM de vincristina que sin vincristina.

Protein IDs	Protein names	Gene names
P07437	Tubulin beta chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin beta-2A chain	TUBB
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a;Ubiquitin;40S ribosomal protein S27a;Polyubiquitin-B;Ubiquitin;Polyubiquitin-C;Ubiquitin	RPS27A
Q01130	Serine/arginine-rich splicing factor 2	SRSF2
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM
P61247	40S ribosomal protein S3a	RPS3A
P22087	rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar	FBL
P55327	Tumor protein D52	TPD52
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed	HNRNPF
P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM
P15153	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6;Serine/arginine-rich splicing factor 4	SRSF6
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2	ESYT2
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1

Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E
P24534	Elongation factor 1-beta	EEF1B2
P61956	Small ubiquitin-related modifier 2;Small ubiquitin-related modifier 4;Small ubiquitin-related modifier 3	SUMO2
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4
P14314	Glucosidase 2 subunit beta	PRKCSH
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2
P06454	Prothymosin alpha;Prothymosin alpha, N-terminally processed;Thymosin alpha-1	PTMA
Q16543	Hsp90 co-chaperone Cdc37;Hsp90 co-chaperone Cdc37, N-terminally processed	CDC37
P62328	Thymosin beta-4;Hematopoietic system regulatory peptide	TMSB4X
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1
Q02543	60S ribosomal protein L18a	RPL18A
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2
P14625	Endoplasmin	HSP90B1
P51149	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A

Proteínas compartidas entre los cocultivos con 0 nM y 40 nM de vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 33**). Mas abundantes sin vincristina que en 40 nM

Protein IDs	Protein names	Gene names
P02545	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA
Q15149	Plectin	PLEC

Proteínas compartidas entre los cocultivos con 0 nM y 40 nM de vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 33**). Mas abundantes con 40 nM que sin vincristina

Protein IDs	Protein names	Gene names
P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	HIST1H2BC

Proteínas compartidas entre los cocultivos con 0 nM y 40 nM de vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 34**). Cluster 90 más abundantes sin vincristina que en 40 nM.

Protein IDs	Protein names	Gene names
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA

P62424	60S ribosomal protein L7a	RPL7A
P05141	ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed	SLC25A5
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6
P02545	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA
P40937	Replication factor C subunit 5	RFC5
P61254;Q9UNX3	60S ribosomal protein L26;60S ribosomal protein L26-like 1	RPL26
P68371;P04350	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	TUBB4B
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2
Q15149	Plectin	PLEC
P36578	60S ribosomal protein L4	RPL4
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3;NADH-cytochrome b5 reductase 3 membrane-bound form;NADH-cytochrome b5 reductase 3 soluble form	CYB5R3
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	ESYT1
P35579	Myosin-9	MYH9
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1
P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	PFKL
O75369	Filamin-B	FLNB
O00410	Importin-5	IPO5

Proteínas compartidas entre el monocultivo y el cocultivo sin vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 36**). Mas abundantes en cocultivo que en monocultivo

Protein IDs	Protein names	Gene names
O00410	Importin-5	IPO5
P02545	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B
P08670	Vimentin	VIM
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	ESYT1

Proteínas compartidas entre el monocultivo y el cocultivo sin vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 36**). Mas abundantes en monocultivo que en cocultivo

Protein IDs	Protein names	Gene names
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA

P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
P06733	Alpha-enolase	ENO1
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5
P13639	Elongation factor 2	EEF2
P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM
P21333	Filamin-A	FLNA
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1
P29401	Transketolase	TKT
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A
P60709	Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	ACTB
P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	HIST1H2BC
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed	PPIA
P68104	Elongation factor 1-alpha 1;Putative elongation factor 1-alpha-like 3	EEF1A1
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7

Proteínas compartidas entre el monocultivo y cocultivo sin vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 37**). Cluster 61 más abundantes en cocultivo que en monocultivo.

Protein IDs	Protein names	Gene names
P08670	Vimentin	VIM
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B
P02545	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2

Proteínas compartidas entre el monocultivo y cocultivo sin vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 37**). Cluster 52 más abundantes en monocultivo que en cocultivo.

Protein IDs	Protein names	Gene names
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU
P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
P06733	Alpha-enolase	ENO1
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1
P68104;Q5VTE0	Elongation factor 1-alpha 1;Putative elongation factor 1-alpha-like 3	EEF1A1

P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1
P21333	Filamin-A	FLNA
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed	PPIA
P62424	60S ribosomal protein L7a	RPL7A
P60709	Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	ACTB
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1
P20700	Lamin-B1	LMNB1
P78371	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2
P61254;Q9UNX3	60S ribosomal protein L26;60S ribosomal protein L26-like 1	RPL26
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2
Q86V81	THO complex subunit 4	ALYREF
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5
P13639	Elongation factor 2	EEF2
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1
P29401	Transketolase	TKT
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1

Proteínas compartidas entre el monocultivo con 3 nM y el cocultivo con 40 nM de vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 39**). Mas abundantes en cocultivo con 40 nM

Protein IDs	Protein names	Gene names
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B
P08670	Vimentin	VIM

Proteínas compartidas entre el monocultivo con 3 nM y el cocultivo con 40 nM de vincristina y que mostraron diferencias significativas en abundancia (**Figura 39**). Mas abundantes en monocultivo con 3 nM

Protein IDs	Protein names	Gene names
-------------	---------------	------------

O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
P06733	Alpha-enolase	ENO1
P07737	Profilin-1	PFN1
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6
P13639	Elongation factor 2	EEF2
P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM
P16401	Histone H1.5	HIST1H1B
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3
P60709	Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	ACTB
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1
P62917	60S ribosomal protein L8	RPL8
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed	PPIA
P68104	Elongation factor 1-alpha 1;Putative elongation factor 1-alpha-like 3	EEF1A1
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1
Q71DI3	Histone H3.2	HIST2H3A
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A

Proteínas compartidas entre el monocultivo con 3 nM y el cocultivo con 40 nM de vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 40**). Cluster 12 más abundantes en cocultivo 40 nM

Protein IDs	Protein names	Gene names
P08670	Vimentin	VIM
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B

Proteínas compartidas entre el monocultivo con 3 nM y el cocultivo con 40 nM de vincristina que se agruparon en clusters de regulación diferencial en el mapa de calor (**Figura 40**). Cluster 41 más abundantes en monocultivo 3 nM

Protein IDs	Protein names	Gene names
P62917	60S ribosomal protein L8	RPL8
P20700	Lamin-B1	LMNB1

P30101	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A
P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed	PPIA
P60709	Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	ACTB
P13639	Elongation factor 2	EEF2
P06733	Alpha-enolase	ENO1
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA
P07737	Profilin-1	PFN1
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH