

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y**  
**BIOTECNOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE DILAURIL FOSFATIDILCOLINA  
Y UN ANTAGONISTA LRH-1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y  
EXPRESIÓN DE LRH-1, CICLINA D1, BCL-2 Y BAX EN CÉLULAS  
CANCERÍGENAS HEPG-2 Y CACO-2**

Tesis presentada por los Bachilleres:

**KATHERINE NANCY CHIPANA PEÑALOZA**  
**HELAR ALDAIR GÓMEZ CHALCO**

Para obtener el Título Profesional de:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Asesor:

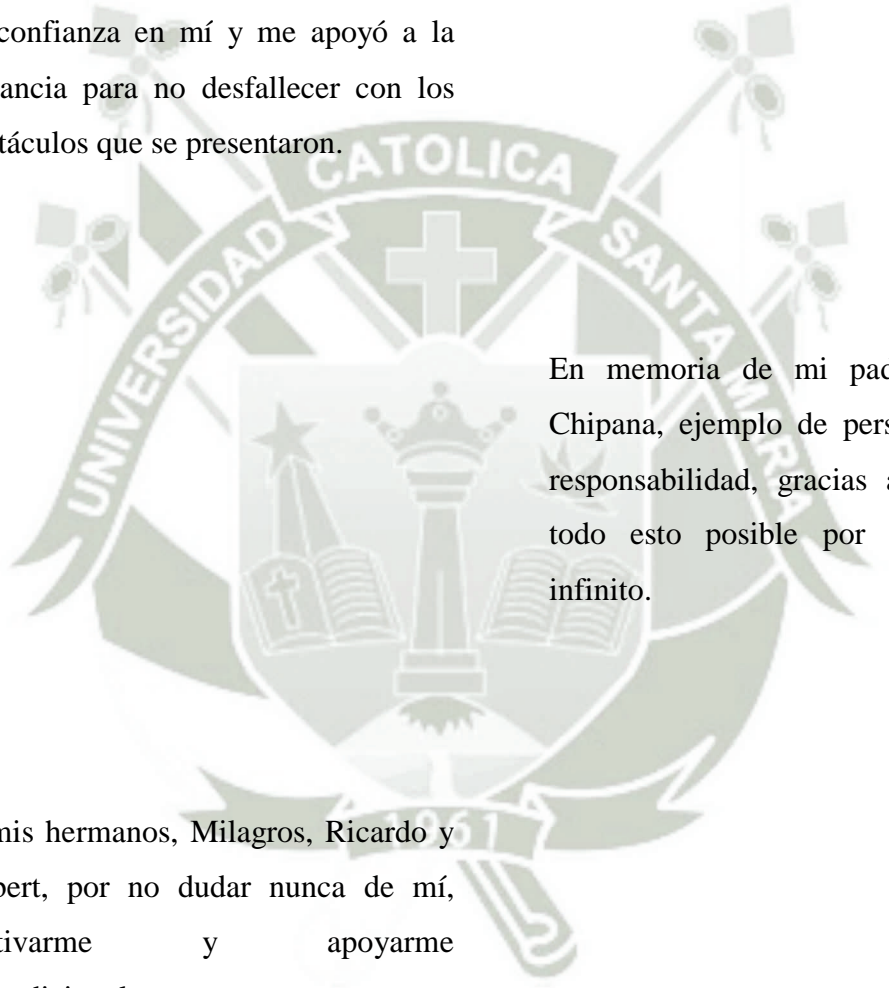
**Dr. JOSÉ ANTONIO VILLANUEVA SALAS**

**Arequipa – Perú**

**2017**

## DEDICATORIA

A la persona más importante de mi vida, mi madre, Nancy Peñaloza, quien es el motivo de todos mis logros, supo guiarme siempre por un camino lleno de valores y principios, depositó toda su confianza en mí y me apoyó a la distancia para no desfallecer con los obstáculos que se presentaron.



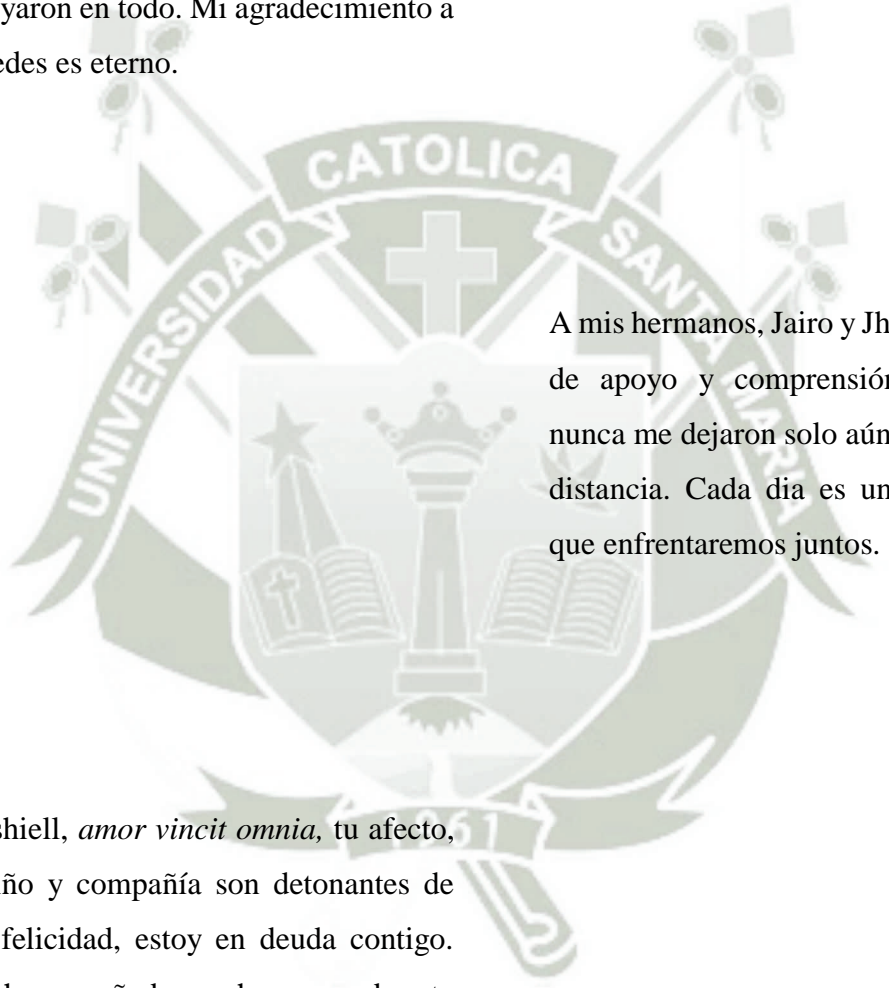
En memoria de mi padre Hipólito Chipana, ejemplo de perseverancia y responsabilidad, gracias a quién fue todo esto posible por su esfuerzo infinito.

A mis hermanos, Milagros, Ricardo y Robert, por no dudar nunca de mí, motivarme y apoyarme incondicionalmente.

*Katherine.*

## DEDICATORIA

A mis padres, Daniel y Victoria, quienes supieron guiar y forjar en mí la persona que soy, con reglas y ciertas libertades, siempre me motivaron y apoyaron en todo. Mi agradecimiento a ustedes es eterno.



A mis hermanos, Jairo y Jholeyt, fuente de apoyo y comprensión constante, nunca me dejaron solo aún estando a la distancia. Cada día es un reto nuevo que enfrentaremos juntos.

Mishiell, *amor vincit omnia*, tu afecto, cariño y compañía son detonantes de mi felicidad, estoy en deuda contigo. Me has enseñado muchas cosas de esta vida, espero contar contigo muchos años más.

*Helar.*

## AGRADECIMIENTO

De manera especial a nuestro asesor el Dr. José Villanueva Salas, por el apoyo y tiempo brindado durante la redacción de este trabajo de investigación. Gracias por ser parte de nuestra formación profesional y la confianza brindada a lo largo de todo este tiempo.

A la Universidad de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences*, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa, por el apoyo, tiempo, conocimientos y confianza brindada en la ejecución de esta investigación.

De igual manera a nuestro querido amigo MSc. Alejandro Rondón Ortiz, por su paciencia, tiempo, orientación y sus ideas aportadas.

A la Universidad Católica de Santa María y a nuestra Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por los conocimientos brindados desde nuestro ingreso a esta casa superior de estudios.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	III
INTRODUCCIÓN .....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS .....	4
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	
1. CÁNCER.....	7
1.1. CÁNCER COLORRECTAL.....	7
1.2. CÁNCER HEPATOCELULAR.....	12
2. RECEPTOR LRH-1 .....	19
2.1. ACTIVIDAD DE LRH-1.....	20
2.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LRH-1 .....	25
3. DILAURIL FOSFATIDILCOLINA.....	25
4. ANTAGONISTA LRH-1.....	26
5. CULTIVO CELULAR.....	27
5.1. CACO-2 (CÉLULAS ADENOCARCINOMAS COLORRECTALES). 29	
5.2. HEPG-2 (CÉLULAS CARCINOMAS HEPÁTICAS) .....	31
5.3. MEDIOS DE CULTIVO .....	33
6. CICLO CELULAR .....	34
6.1. INTERFASE.....	35
6.2. MITOSIS .....	36
6.3. DURACIÓN DEL CICLO CELULAR .....	38
6.4. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR .....	38
7. PROTEÍNA CICLINA D1 .....	39
8. PROTEÍNA BCL-2.....	39
9. PROTEÍNA BAX.....	41
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MATERIALES .....	45
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	45

1.2.	EQUIPOS UTILIZADOS.....	45
1.3.	REACTIVOS .....	46
1.4.	LUGAR DE INVESTIGACIÓN .....	47
2.	METODOLOGÍA .....	48
2.1.	CULTIVO CELULAR .....	48
2.2.	CONTEO CELULAR.....	49
2.3.	VIABILIDAD CELULAR .....	50
2.4.	PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.....	52
2.5.	APLICACIÓN DE TRATAMIENTO .....	52
2.6.	ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO.....	53
2.7.	LISIS CELULAR .....	53
2.8.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	54
2.9.	WESTERN BLOT .....	56
2.10.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	61
CAPÍTULO III		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
1.	CONTEO CELULAR .....	65
1.1.	CÉLULAS CACO-2 .....	65
1.2.	CÉLULAS HEPG-2.....	65
2.	VIABILIDAD CELULAR (ELECCIÓN DE CÉLULAS) .....	66
2.1.	CÉLULAS CACO-2 .....	66
2.2.	CÉLULAS HEPG-2.....	67
3.	VIABILIDAD CELULAR (TRATAMIENTO) .....	69
3.1.	CÉLULAS CACO-2.....	69
3.2.	CÉLULAS HEPG-2.....	72
4.	CONTEO DE PROTEÍNAS (BCA) .....	74
4.1.	CÉLULAS CACO-2.....	74
4.2.	CÉLULAS HEPG-2.....	76
5.	WESTERN-BLOT .....	77
5.1.	LRH-1 .....	78
5.2.	CICLINA D1 .....	82
5.3.	BCL-2 .....	85
5.4.	BAX.....	88
CONCLUSIONES .....		92

SUGERENCIAS .....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	94
ANEXOS.....	105



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Casos de Cáncer de Colon en Perú (2000-2014). Ambos sexos. INEN. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Casos de Cáncer de Colon en Perú (2000-2014). Hombres. INEN .....	9
<b>Tabla 3.</b> Casos de Cáncer de Colon en Perú (2000-2014). Mujeres. INEN.....	10
<b>Tabla 4.</b> Estadios de Cáncer Colorrectal. ....	12
<b>Tabla 5.</b> Casos de Cáncer Hepático en Perú (2000-2014). Ambos sexos. INEN.....	14
<b>Tabla 6.</b> Casos de Cáncer Hepático en Perú (2000-2014). Hombres. INEN .....	14
<b>Tabla 7.</b> Casos de Cáncer Hepático en Perú (2000-2014). Mujeres. INEN .....	14
<b>Tabla 8.</b> Estadios de Cáncer Hepatocelular.....	18
<b>Tabla 9.</b> Duración del ciclo celular .....	38
<b>Tabla 10.</b> Diluciones de las células para elección de células (a partir de $1 \times 10^6$ células/mL).....	51
<b>Tabla 11.</b> Número de células Caco-2 contadas en el Cell Counter (Cellometer Auto T4 <sup>®</sup> ).....	65
<b>Tabla 12.</b> Número de células HepG-2 contadas en el Cell Counter (Cellometer Auto T4 <sup>®</sup> ).....	65
<b>Tabla 13.</b> Absorbancias de células Caco-2 a diferentes concentraciones. ....	66
<b>Tabla 14.</b> Absorbancias de células HepG-2 a diferentes concentraciones.....	67
<b>Tabla 15.</b> Viabilidad de células Caco-2 a diferentes concentraciones de DLPC. ....	69
<b>Tabla 16.</b> Viabilidad de células Caco-2 a diferentes concentraciones de Antagonista LRH-1. ....	70
<b>Tabla 17.</b> Viabilidad de células HepG-2 a diferentes concentraciones de DLPC.....	72
<b>Tabla 18.</b> Viabilidad de células HepG-2 a diferentes concentraciones de Antagonista LRH-1. ....	73
<b>Tabla 19.</b> Absorbancias de Albúmina a diferentes concentraciones.....	74
<b>Tabla 20.</b> Cantidad de proteínas en células Caco-2 post-tratamiento ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	75
<b>Tabla 21.</b> Absorbancias de Albúmina a diferentes concentraciones.....	76
<b>Tabla 22.</b> Cantidad de proteínas en células HepG-2 post-tratamiento ( $\mu\text{g/mL}$ ). ....	76
<b>Tabla 23.</b> Nivel de LRH-1 expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	78
<b>Tabla 24.</b> Nivel de LRH-1 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	80
<b>Tabla 25.</b> Nivel de Ciclina D1 expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	82

<b>Tabla 26.</b> Nivel de Ciclina D1 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	84
<b>Tabla 27.</b> Nivel de Bcl-2 expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	85
<b>Tabla 28.</b> Nivel de Bcl-2 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	87
<b>Tabla 29.</b> Nivel de BAX expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	89
<b>Tabla 30.</b> Nivel de BAX expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	90



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferencia entre el colon normal y cáncer de colon. <i>Fuente: Revista Canna habla</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Diferencia del tejido hepático en hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. <i>Fuente: Cultura Mix</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Nuevos casos y muertes a nivel mundial en el 2008. <i>Fuente: GLOBOCAN</i> .....	16
<b>Figura 4.</b> Nuevos casos y muertes en países desarrollados económicas en el 2008. <i>Fuente: GLOBOCAN</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Nuevos casos y muertes en países en desarrollo económico en el 2008. <i>Fuente: GLOBOCAN</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> Estructura común de Receptores Nucleares. <i>Fuente: Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares. Rev. Colombiana de Cardiología</i> .....	20
<b>Figura 7.</b> Acciones fisiológicas del LRH-1. <i>Fuente: Therapeutic potential of Liver Receptor Homolog-1 modulators. ELSEVIER</i> .....	20
<b>Figura 8.</b> Vías metabólicas controladas por LRH-1. Líneas rojas, vías implicadas en transporte reverso de colesterol; líneas azules, síntesis de ácido biliar y líneas verdes, circulación enterohepática. A-1, apolipoproteína A-1; ABCA1, transportador de cassette-unión-ATP; BSEP, bomba de exportación de sales biliares; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad; VLDL, poliproteína de muy baja densidad. <i>Fuente: LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. ELSEVIER</i> ....	22
<b>Figura 9.</b> 1,2-Didodecanoyl-glycero-3-phosphocholine (DLPC).....	26
<b>Figura 10.</b> Antagonista LRH-1 (1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil) etil)-1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil) etanona).....	27
<b>Figura 11.</b> Fases de crecimiento celular.....	28
<b>Figura 12.</b> Fase de crecimiento exponencial en células.....	29
<b>Figura 13.</b> Células Caco-2, baja densidad.....	29
<b>Figura 14.</b> Células Caco-2, alta densidad.....	30
<b>Figura 15.</b> Células HepG-2, baja densidad.....	31
<b>Figura 16.</b> Células HepG-2, alta densidad.....	32
<b>Figura 17.</b> Las fases del ciclo celular.....	34
<b>Figura 18.</b> Fases de la mitosis. A. Profase; B. Metafase (vista polar); C. Metafase (vista ecuatorial); D. Anafase; E. Telofase.....	37
<b>Figura 19.</b> Regulación del ciclo celular.....	39

<b>Figura 20.</b> Translocación 14:18 (según lo propuesto por Tsujimoto y colaboradores, 1987) .....	40
<b>Figura 21.</b> Cámaras de flujo laminar Clase II Tipo A2.....	46
<b>Figura 22.</b> Laboratorio Post-Grado MCPHS .....	48
<b>Figura 23.</b> Estructura de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) .....	50
<b>Figura 24.</b> Reducción del MTS en un producto formazano.....	51
<b>Figura 25.</b> Ácido bicinconínico.....	54
<b>Figura 26.</b> Curva de Calibración de BSA (Albúmina de suero bovino) .....	55
<b>Figura 27.</b> Pocillos con concentraciones de albúmina de 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000µg/mL por triplicado para la curva de calibración. <i>Fuente: Elaboración propia.</i> .....	56
<b>Figura 28.</b> Electroforesis vertical.....	57
<b>Figura 29.</b> Electroforesis de Proteínas .....	58
<b>Figura 30.</b> Cámara de electroforesis vertical .....	58
<b>Figura 31.</b> Montaje del sándwich para transferencia de gel a membrana .....	59
<b>Figura 32.</b> Curva de calibración de células Caco-2 para determinar la concentración de células.....	67
<b>Figura 33.</b> Curva de calibración de células HepG-2 para determinar la concentración de células.....	68
<b>Figura 34.</b> Significancia del efecto de DLPC a diferentes concentraciones en células Caco-2. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett). .....	69
<b>Figura 35.</b> Significancia del efecto del Antagonista LRH-1 a diferentes concentraciones en células Caco-2. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett). .....	70
<b>Figura 36.</b> Significancia del efecto de DLPC a diferentes concentraciones en células HepG-2. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett). .....	72
<b>Figura 37.</b> Significancia del efecto del Antagonista LRH-1 a diferentes concentraciones en células HepG-2. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett). .....	73
<b>Figura 38.</b> Curva de calibración de albúmina. $R=0.9926$ , $Y = 0.0008794 * X + 0.1263$ .....	75
<b>Figura 39.</b> Curva de calibración de albúmina. $R=0.9931$ , $Y = 0.0008575 * X + 0.1108$ .....	76
<b>Figura 40.</b> Bandas de LRH-1 en células Caco-2, Western-Blot. ....	78

<b>Figura 41.</b> Nivel de LRH-1 en células Caco-2, Western-Blot. (n=6; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	78
<b>Figura 42.</b> Bandas de LRH-1 en células HepG-2, Western-Blot.....	79
<b>Tabla 24.</b> Nivel de LRH-1 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1 .....	80
<b>Figura 43.</b> Nivel de LRH-1 en células HepG-2, Western-Blot. (n=6; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	80
<b>Figura 44.</b> Bandas de Ciclina D1 en células Caco-2, Western-Blot. ....	82
<b>Figura 45.</b> Nivel de Ciclina D1 en células Caco-2, Western-Blot. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	82
<b>Figura 46.</b> Bandas de Ciclina D1 en células HepG-2, Western-Blot.....	83
<b>Figura 47.</b> Nivel de Ciclina D1 en células HepG-2, Western-Blot. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	84
<b>Figura 48.</b> Bandas de Bcl-2 en células Caco-2, Western-Blot.....	85
<b>Figura 49.</b> Nivel de Bcl-2 en células Caco-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	86
<b>Figura 50.</b> Bandas de Bcl-2 en células HepG-2, Western-Blot. ....	87
<b>Figura 51.</b> Nivel de Bcl-2 en células HepG-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	87
<b>Figura 52.</b> Bandas de BAX en células Caco-2, Western-Blot. ....	88
<b>Figura 53.</b> Nivel de BAX en células Caco-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	89
<b>Figura 54.</b> Bandas de BAX en células HepG-2, Western-Blot.....	90
<b>Figura 55.</b> Nivel de BAX en células HepG-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y <i>post-hoc</i> Dunnett).....	90

## ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador cassette-uni3n ATP.
ADN	3cido desoxirribonucleico.
AJCC	Comit3 conjunto estadounidense del c3ncer.
APOAI	Apolipoprote3na AI.
APOM	Apolipoprote3na M.
ASBT	Transportador ileal apical sodio-dependiente de 3cido biliar.
ASPC-1	C3lulas de Ascitis de adenocarcinoma Pancre3tico Humano.
ATP	Adenosin Trifosfato.
BAD	Prote3na de muerte asociada a Bcl.
BAK	Prote3na Bcl-2 hom3logo antagonista asesino.
BAX	Bcl-2 asociado a la prote3na X.
BCA	3cido Bicincon3nico.
BCL-2	Oncogen asociado a Linfoma de C3lulas B 2.
BID	Prote3na BH3 agonista mortal del Dominio Interactivo.
BME	Medio Basal de Eagle.
BSA	Alb3mina de Suero Bovino.
BSEP	Bomba de exportaci3n de sales biliares.
CACO-2	Adenocarcinoma de Colon 2.
CCR	C3ncer colorrectal.
CEL	Carboxil ester lipasa.
CETP	Prote3na de transferencia de 3steres de colesterol.
CHC	C3ncer Hepatocelular.
CYP7A1	Citocromo P7A1 o 7alfa-hidroxilasa.
CYP8B1	Citocromo P8B1 o 12alfa- hidroxilasa.
DAX-1	Receptor reverso sensible a dosis, regi3n suprarrenal en cromosoma X.
DBD	Dominio de uni3n al ADN.
DLPC	Dilauril fosfatidilcolina.

DMEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil Sulfóxido.
DUPC	Diundecanoil fosfatidilcolina.
EDTA	Etilendiaminotetraacético.
EMEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle.
FBS	Suero Fetal Bovino.
FC	Nivel de cambio.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad.
HEK	Células Embrionarias de Riñón Humano.
HEPG-2	Hepatoblastoma G2.
HRK	Grupo de proteínas inhibidoras de apoptosis.
IC50	Concentración Inhibitoria media.
INEN	Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.
LBD	Dominio de unión a ligando.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad.
LRH-1	Receptor Homólogo de Hígado 1.
M-PER	Reactivo de extracción proteica en mamífero.
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero.
MNC	Membrana de Nitrocelulosa.
MRP3	Proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos.
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
NR	Receptor Nuclear.
NR5A1	Receptor Nuclear de la Subfamilia 5 Grupo A Miembro 1.
NR5A2	Receptor Nuclear de la Subfamilia 5 Grupo A Miembro 2.
PEPT1	Transportador péptido 1.
PGP	Glicoproteína de permeabilidad.
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno.

SDS-BS	SDS buffer de muestra.
SDS	Sodio Dodecil Sulfato.
SF-1	Factor de Esteroidogénesis 1.
SHP	Receptor asociado a heterodímero pequeño.
SR-BI	Receptor de tipo scavenger BI.
SREPB-1	Proteína Reguladora del Elemento regulador del Sterol 1.
T47D	Células de Tumor epitelial de mama Ductal humano.
TBS-T	Solución Trisbuffer Salino Tween 20.
TNM	Tumor, Ganglios, Metástasis.
USP	Farmacopea de Estados Unidos.
VHB	Virus de Hepatitis B.
VHC	Virus de Hepatitis C.
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad.
WB	Western-Blot.



## RESUMEN

El LRH-1 es un receptor nuclear huérfano que se encuentra presente en varios órganos del cuerpo en diferentes cantidades y cumpliendo a la vez diferentes funciones en cada uno de ellos, entre ellas está su intervención en el metabolismo del colesterol y ácidos biliares (hígado), circulación enterohepática (intestino), proceso de esteroidogénesis (ovario, mama) y procesos enzimáticos (páncreas). Según los últimos estudios realizados, éste receptor se encuentra involucrado en diferentes tipos de cáncer actuando de diferente manera en cada uno, ya sea incrementando o disminuyendo la proliferación de células cancerígenas. Para este proyecto se tomaron en cuenta dos tipos de cáncer, colorrectal y hepático, en los que el receptor LRH-1 se encuentra involucrado, pero aún no se conoce exactamente de qué manera por ser un receptor huérfano. Se prepararon cultivos en monocapa de dos líneas celulares, siendo una de ellas Caco-2, derivado del adenocarcinoma colorrectal, y HepG-2, derivado del hepatocarcinoma celular, a condiciones requeridas. Fueron tratadas con una droga agonista del receptor LRH-1, Dilauril fosfatidilcolina, y un antagonista LRH-1, 1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil) etil)-1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil) etanona, a seis diferentes concentraciones, se determinó la proliferación celular en ambas células con el ensayo

colorimétrico MTS. Como segundo estudio se cuantificó proteínas con el ensayo de BCA para el posterior ensayo de Western-Blot. Se cuantificaron las proteínas LRH-1, Ciclina D1, Bcl-2 y BAX. Los datos estadísticos obtenidos fueron analizados por el software GraphPad Prism 6<sup>®</sup>. En células Caco-2 se obtuvo incremento de proliferación con DLPC y disminución con Antagonista LRH-1, mientras que en células HepG-2 se observó una disminución con DLPC y un incremento con Antagonista LRH-1. En cuanto a la expresión de proteínas, la Ciclina D1 se observó con expresión disminuida usando el Antagonista LRH-1 en células Caco-2, mientras que en células HepG-2 no se produjo ninguna variación usando las mismas drogas; la expresión de Bcl-2 no se observó afectada por ninguna de las dos drogas en células Caco-2, mientras que en células HepG-2 se produjo una expresión disminuida con DLPC; la expresión de BAX se observó disminuida aplicando cada droga en células Caco-2, pero en este caso no existe una relación con Bcl-2 expresado, mientras que en células HepG-2 se obtuvo sobreexpresión con DLPC. La sobreexpresión del receptor LRH-1 incrementa la proliferación en células Caco-2 y disminuye en células HepG-2. Por medio de la expresión de Ciclina D1, se concluye que el mecanismo por el cual LRH-1 influye en la proliferación de células Caco-2 es por regulación del ciclo celular. De acuerdo a Bcl-2/ BAX expresados, se concluye que el mecanismo por el cual LRH-1 influye en la proliferación de células HepG-2 es por apoptosis.

**PALABRAS CLAVES:** LRH-1, Caco-2, HepG-2, DLPC, Antagonista LRH-1, Ciclina D1, Bcl-2, BAX.



## ABSTRACT

LRH-1 is an orphan nuclear receptor that is present in several organs of the body in different amounts and fulfilling different functions in each of them, among them is its intervention in the metabolism of cholesterol and bile acids (liver), Enterohepatic circulation (intestine), process of steroidogenesis (ovary, breast) and enzymatic processes (pancreas). According to the latest studies, this receptor is involved in different types of cancer acting differently each, either increasing or decreasing the proliferation of cancer cells. This project took into account the types of cancer, colorectal and hepatic, in which the LRH-1 receptor is involved, but it is not exactly known in what way because it is an orphan receptor. Monolayer cultures of two cell lines were prepared, one of them Caco-2, derived from colorectal adenocarcinoma, and the other is HepG-2, derived from cellular hepatocarcinoma, under the required conditions. They were treated with an LRH-1 agonist, Dilauryl phosphatidylcholine, and an antagonist LRH-1, 1-(3'-(1-(2-(4-Morpholinyl)Ethyl)-1-H-pyrazol-3-yl)-3-Biphenyl) ethanone, at six different concentrations, cell proliferation was determined in both cells with the MTS colorimetric assay. As a second study we quantified the proteins with the BCA assay for the subsequent Western Blot test. LRH-1, Cyclin D1,

Bcl-2 and BAX proteins were quantified. The statistical data obtained were analyzed by GraphPad Prism 6® software. In the cells a decrease was observed with DLPC and an increase with LRH-1 Antagonist, whereas in HepG-2 cells a decrease was observed with DLPC and an increase with LRH-1 Antagonist. As for protein expression, Cyclin D1 was observed with decreased expression using the LRH-1 Antagonist in Caco-2 cells, whereas in HepG-2 cells no variation was produced using the same drugs; Expression of Bcl-2 was not affected by any of the two drugs, whereas in the HepG-2 cells a decreased expression was produced with DLPC; The expression of Bax was observed to be decreased by applying each drug to Caco-2 cells, but in this case there was no relationship with expressed BCL-2, whereas in HepG-2 cells overexpression was obtained with DLPC. Overexpression of the LRH-1 receptor increased proliferation in Caco-2 cells and decreased in HepG-2 cells. By means of the expression of Cyclin D1, we conclude that the mechanism by which LRH-1 influences the proliferation of Caco-2 cells is by the regulation of the cell cycle. According to Bcl-2 / BAX expressed, we conclude that the mechanism by which LRH-1 influences the proliferation of HepG-2 cells is by apoptosis.

**KEYWORDS:** LRH-1, Caco-2, HepG-2, DLPC, LRH-1 Antagonist, Cyclin D1, Bcl-2, BAX.

## INTRODUCCIÓN

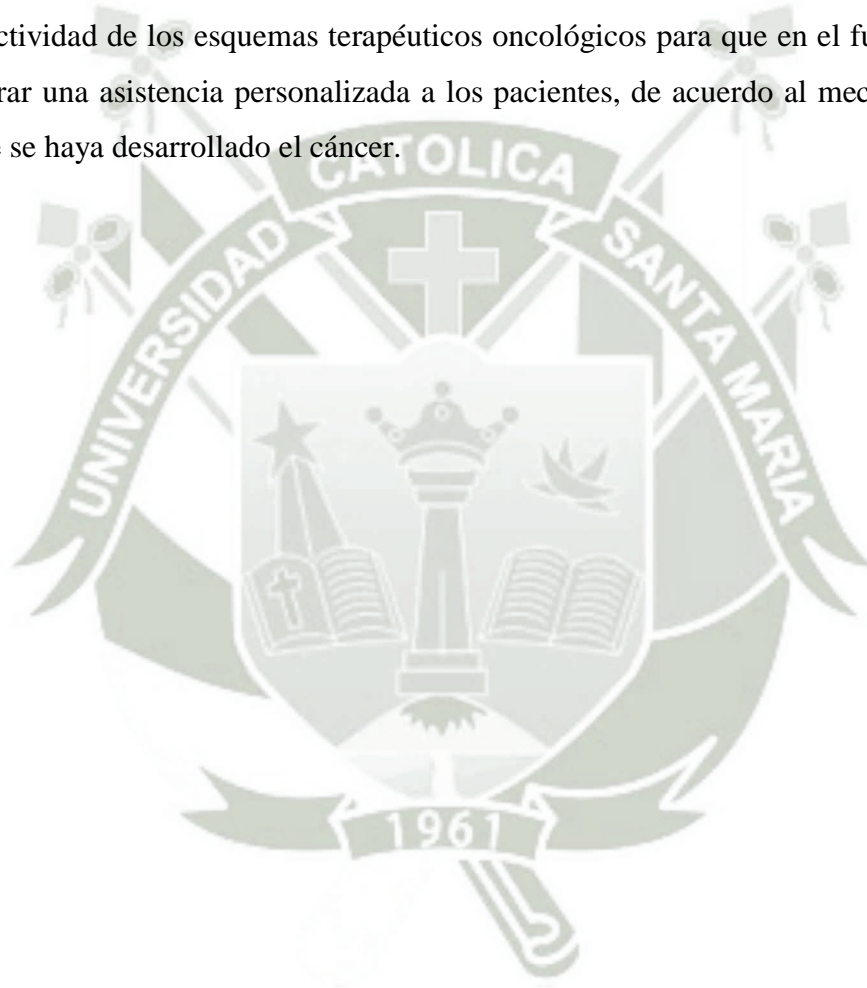
En los últimos años, se ha observado un incremento en la incidencia de casos relacionados a diferentes tipos de cáncer, siendo el cáncer colorrectal el tercero más frecuente en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial, presentando una mortalidad en los casos de ambos sexos de 49.34%. Por otro lado, el cáncer hepático, es el quinto más frecuente en hombres y el séptimo en mujeres a nivel mundial, presentando una mortalidad en los casos de ambos sexos de 93.00%.<sup>1, 2</sup>

Existe una variedad de factores y mecanismos que influyen en la producción de estos tipos de cánceres, entre los cuales tienen un factor en común, la presencia del receptor nuclear huérfano LRH-1<sup>3, 4</sup>, el cual puede actuar por diferentes vías en un mismo órgano y en órganos diferentes donde se encuentre presente.<sup>3, 4, 5, 6</sup>

Para el estudio se tomarán dos líneas celulares, Caco-2, involucradas en el adenocarcinoma colorrectal<sup>7</sup>, y HepG-2, involucradas en el hepatocarcinoma celular<sup>8</sup>, y de esta manera podremos determinar la relación entre ambos tipos de cánceres con el receptor nuclear LRH-1. Así se podrá identificar la posible vía o mecanismo por el que LRH-1 interviene en el desarrollo del cáncer, tomando en cuenta la cantidad expresada de las proteínas LRH-1, Ciclina D1 (ciclo celular), Bcl-2 y BAX

(apoptosis).<sup>9</sup> Para inducir y/o suprimir el receptor, será necesario el uso de una droga agonista y una droga antagonista, las cuales serán Dilauril fosfatidilcolina y antagonista LRH-1 respectivamente.<sup>10, 11</sup>

De acuerdo a la problemática actual, diversos estudios han demostrado que el cáncer hacia un órgano puede producirse por varios mecanismos y además que la respuesta al tratamiento no es el mismo en todos los organismos. El motivo de este proyecto es caracterizar el efecto que se produce en el receptor LRH-1 en dos líneas celulares cancerígenas pertenecientes a diferentes órganos y de esta manera mejorar la efectividad de los esquemas terapéuticos oncológicos para que en el futuro se pueda lograr una asistencia personalizada a los pacientes, de acuerdo al mecanismo por el que se haya desarrollado el cáncer.





## HIPÓTESIS

Dado que LRH-1 es un receptor nuclear huérfano, es probable que al encontrarse sobreexpresado aumente la proliferación de células Caco-2 en cáncer colorrectal y al inhibirse cause el efecto contrario, mientras que en células HepG-2 del cáncer hepático es probable que la sobreexpresión de LRH-1 produzca un efecto totalmente inverso, pudiendo así a crear en el futuro tratamientos específicos para cada paciente.



## OBJETIVOS

1. Evaluar la proliferación de las células Caco-2 y HepG-2 frente a diferentes concentraciones tanto del agonista DLPC como del Antagonista LRH-1.
2. Determinar la expresión de LRH-1 y su influencia en el desarrollo del cáncer en células Caco-2 y HepG-2, expuestas a DLPC y Antagonista LRH-1.
3. Evaluar las expresiones de Ciclina D1, Bcl-2 y BAX, expuestas a DLPC y Antagonista LRH-1, en células Caco-2 y HepG-2.
4. Caracterizar el efecto de LRH-1 en células Caco-2 y HepG-2.



## MARCO TEÓRICO

### 1. CÁNCER

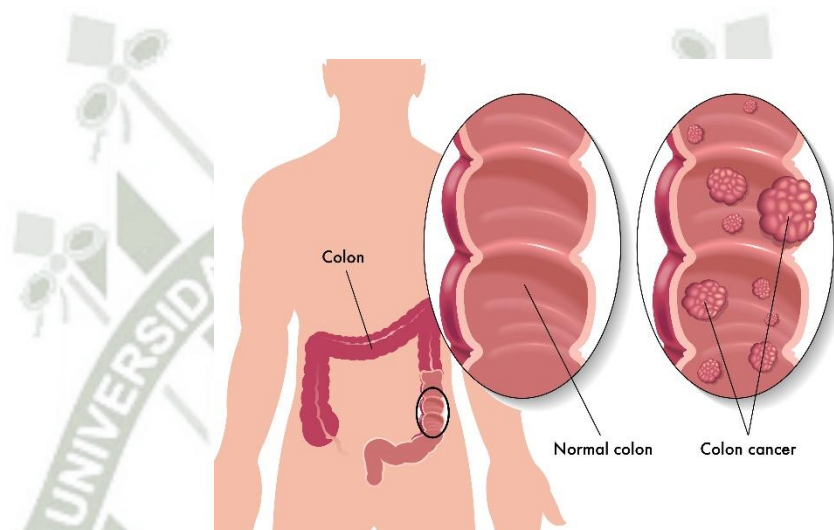
El cáncer o también conocido como neoplasia, se caracteriza por ser una masa anormal de tejido, el cual presenta crecimiento excesivo y descoordinado con los demás tejidos normales del organismo, y que continúa de la misma manera excesiva una vez cesado el estímulo que lo ha originado. La diferencia entre neoplasias benignas y malignas o cánceres está basado en criterios histológicos y biológicos. Estas diferencias sin embargo no son absolutas ya que lo que mejor las diferencian es la capacidad de invasión de los tejidos circundantes al tumor y la posibilidad de producción de metástasis.<sup>12</sup>

#### 1.1. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es un término que se emplea para el cáncer que se origina en el colon o el recto. Tanto el cáncer de colon como el cáncer de recto comparten muchas características en común. La mayoría de los cánceres colorrectales comienza como un pólipo, crecimiento que comienza en el revestimiento interno del colon o del recto y crece hacia el centro. La mayoría de los pólipos no son cancerosos. Solo ciertos tipos de pólipos (llamados adenomas) pueden convertirse en cáncer. El extirpar tempranamente un pólipo, cuando es pequeño, podría evitar que se convierta en cáncer. Más del 95% de los tumores cancerosos del colon y del recto son adenocarcinomas. Éstos son cánceres que se originan en las células glandulares, como las células que cubren el interior del colon y del recto. Existen algunos otros tipos de tumores de colon y de recto que ocurren con menos frecuencia. Este tumor aparece con mayor frecuencia entre la quinta y la séptima décadas de la vida. En un pequeño porcentaje de casos, el diagnóstico se efectúa en edades inferiores a los 40 años, habitualmente en el contexto de formas hereditarias.<sup>13</sup> Dentro de los principales factores de riesgo estudiados los últimos años, además de la edad, entre otros importantes se encuentra el consumo de carnes rojas y procesadas, además de las grasas que está muy asociado al consumo de carne; mientras que la carne de pescado produce un efecto protector y la carne de pollo no guarda relación con este cáncer. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que la fibra también presenta efecto protector. El

consumo de alcohol excesivo a 30g por día, específicamente cerveza y vino, incrementa el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer.<sup>14</sup>

Mucho se sabe acerca de mantenimiento, pero se sabe poco acerca de las moléculas de iniciación de conducción o metástasis de CCR. Los recientes descubrimientos en animales y modelos celulares de CCR sugieren un papel para el receptor nuclear homólogo de hígado 1 (LRH-1, también conocida como NR5A2).<sup>15</sup>



**Figura 1.** Diferencia entre el colon normal y cáncer de colon. *Fuente: Revista Canna habla.*

#### 1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA EN PERÚ

De acuerdo a los datos estadísticos proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), indican que el cáncer colorrectal ocupa el décimo primero puesto en frecuencia y la cantidad de casos desde el año 2000 al 2014 son de 3351 personas, siendo el más bajo en el año 2001 con 128 personas (Tabla 1), de los cuales 59 casos fueron en hombres (Tabla 2) y 69 casos en mujeres (Tabla 3), y el más alto en el año 2013 con 304 personas (Tabla 1), de los cuales 140 casos fueron en hombres (Tabla 2) y 164 casos en mujeres (Tabla 3).

**Tabla 1.** Casos de Cáncer de Colon en Perú (2000-2014). Ambos sexos.

AÑO	CASOS DE CÁNCER DE COLON
2000	144
2001	128
2002	168
2003	177
2004	170
2005	192
2006	226
2007	221
2008	226
2009	256
2010	301
2011	272
2012	285
2013	304
2014	281

*Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).*

**Tabla 2.** Casos de Cáncer de Colon en Perú (2000-2014). Hombres.

AÑO	CASOS DE CÁNCER DE COLON
2000	144
2001	128
2002	168
2003	177
2004	170
2005	192
2006	226
2007	221
2008	226
2009	256
2010	301
2011	272
2012	285
2013	304
2014	281

*Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).*

Del total de casos, 1576 casos fueron presentados en hombres, siendo el más bajo en el año 2001 con 59 casos (Tabla 2) y el más alto en el

año 2010 con 149 casos (Tabla 2). Por otro lado, los casos presentados en mujeres son 1775, siendo el más bajo en el año 2004 con 67 casos (Tabla 3) y el más alto en el año 2013 con 164 casos (Tabla 3). Según los datos reportados en el periodo 2000-2014 hay mayor incidencia de cáncer colorrectal en mujeres.<sup>16</sup>

**Tabla 3.** Casos de Cáncer de Colon en Perú (2000-2014). Mujeres.

AÑO	CASOS DE CÁNCER DE COLON
2000	81
2001	69
2002	83
2003	93
2004	67
2005	112
2006	119
2007	119
2008	138
2009	136
2010	152
2011	154
2012	151
2013	164
2014	137

*Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).*

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA INTERNACIONAL

Se presentaron 1,2 millones de nuevos casos y 608 700 muertes en el año 2008. En el hombre, el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en frecuencia con 663 600 casos, pero el cuarto lugar en mortalidad con 320 600 casos (Figura 1). Mientras que en mujeres es el segundo en frecuencia con 570 100 casos y la tercera causa de muerte con 288 100 (Figura 1). Sin embargo, en países desarrollados en hombres ocupa el tercer lugar en frecuencia con 389 700 casos y el segundo lugar en mortalidad con 166 200 casos; mientras que en mujeres ocupa el segundo lugar de frecuencia con 337 700 casos y el tercer lugar en

mortalidad con 153 900 casos (Figura 2). Por otro lado en los países en desarrollo en hombres ocupa el cuarto lugar en frecuencia con 274 000 casos y el quinto lugar en mortalidad con 154 400 casos; mientras que en mujeres ocupa el quinto lugar con 232 400 casos y sexto lugar en mortalidad con 134 100 casos (Figura 3). Las tasas de incidencia más alta están en Australia, Nueva Zelanda, Europa y Estados Unidos, mientras que las más bajas están en África y Asia central. Son sustancialmente mayores en hombres que mujeres. La mortalidad por cáncer colorrectal en Estados Unidos, Europa del Norte y Europa Occidental, han experimentado un descenso sostenido desde comienzos de la década de los 1990. Esta realidad contrasta con el aumento en las tasas de mortalidad en varios países de Europa del Este y en España.<sup>1</sup> Estados Unidos es el único país donde la tasa de incidencia ha disminuido significativamente tanto en hombres como mujeres, producto de la detección precoz y remoción de lesiones precursoras a través del screening. Los screening poblacionales para cáncer colorrectal sólo han podido implementarse en países desarrollados en donde la incidencia y mortalidad por cáncer colorrectal ha ido en descenso.<sup>17</sup> Datos más recientes del año 2013 en Estados Unidos reportaron 136 119 personas que recibieron un diagnóstico de cáncer colorrectal, de las cuales, 71 099 eran hombres y 65 020 mujeres.<sup>18</sup>

#### 1.1.3. TIPOS HISTOLÓGICOS

Para el estudio microscópico, el adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente (90-95%) en el cáncer colorrectal, seguido del adenocarcinoma coloide o mucinoso (10%).<sup>19</sup>

#### 1.1.4. ESTADÍOS

La clasificación de los estadios que más se emplea es la TNM, siendo “T” (Tumor), la “N” (ganglios, Nodes en inglés) y “M” (Metástasis). En función del T, N y M se definen los estadios (Tabla 4).<sup>19</sup>

**Tabla 4.** Estadios de Cáncer Colorrectal.

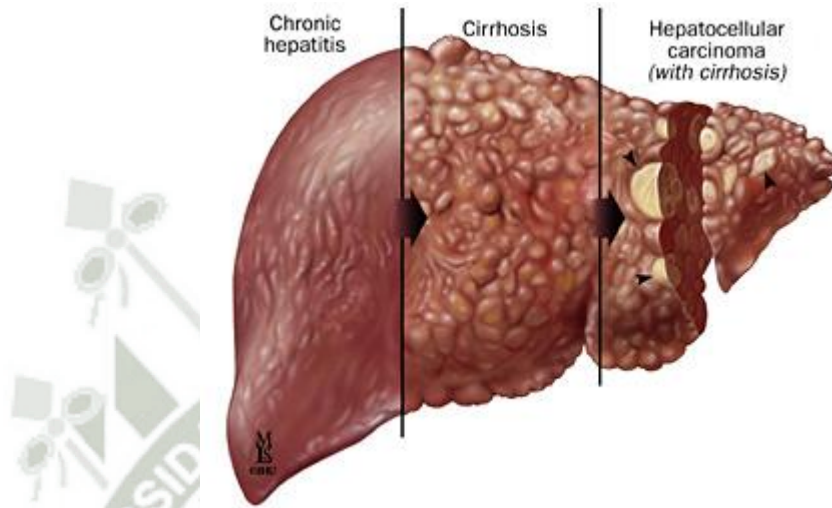
ESTADÍOS DE CÁNCER COLORRECTAL	CARACTERÍSTICAS
0 o Carcinoma in situ	Es la etapa más inicial del cáncer. Se localiza en la parte más superficial de la mucosa y no infiltra las otras capas del colon o recto, no invade los ganglios regionales ni produce metástasis a distancia.
I	Después del estadio 0, es el más favorable (mejor pronóstico).
II y III	Son etapas intermedias. En general, el estadio II tiene mejor pronóstico que el III, porque en el estadio II no existe afectación ganglionar y en el estadio III sí. Estos estadios a su vez se subclasifican en IIa y IIb, y en IIIa, IIIb y IIIc.
IV	Es la etapa más avanzada. Su pronóstico es el peor porque existen metástasis a distancia.

*Fuente: Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)*

## 1.2. CÁNCER HEPATOCELULAR

El hígado es uno de los órganos más importantes y de mayor tamaño del cuerpo. Interviene en muchos procesos vitales que mantienen el organismo limpio y saludable, actúa como una especie de batería del organismo que se encarga de descomponer los alimentos para producir energía, regular los productos químicos y las hormonas y luchar frente a las infecciones. El cáncer de hígado es una enfermedad en la que las células del hígado crecen fuera de control y forman un tumor canceroso. Este tipo de cáncer se llama cáncer primario de hígado, conocido también como hepatoma maligno o carcinoma hepatocelular. El CHC se desarrolla especialmente en el contexto de la enfermedad hepática crónica y cirrosis. Numerosos factores de riesgo han sido

identificados; sin embargo, son el VHB, el VHC y el alcohol los de mayor prevalencia en el mundo.<sup>20</sup> Más del 80% de los sujetos afectados de CHC presentan una cirrosis hepática subyacente y actualmente el hecho de que se desarrolle CHC supone la principal causa de muerte en sujetos con cirrosis.<sup>21</sup>



**Figura 2.** Diferencia del tejido hepático en hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. *Fuente: Cultura Mix.*

### 1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA EN PERÚ

De acuerdo a los datos estadísticos proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), indican que el cáncer hepatocelular ocupa el décimo noveno puesto y la cantidad de casos desde el año 2000 al 2014 son de 2542 personas, siendo el más bajo en el año 2001 con 123 personas (Tabla 5), de los cuales 72 casos fueron en hombres (Tabla 6) y 51 casos en mujeres (Tabla 7), y el más alto en el año 2014 con 213 personas (Tabla 5), de los cuales 125 casos fueron en hombres (Tabla 6) y 88 casos en mujeres (Tabla 7). Del total de casos, 1491 casos fueron presentados en hombres, siendo el más bajo en el año 2001 con 72 casos (Tabla 6) y el más alto en el año 2012 con 129 casos (Tabla 6). Por otro lado los casos presentados en mujeres son 1051, siendo el más bajo en el año 2001 con 51 casos (Tabla 7) y el más alto en el año 2010 con 89 casos (Tabla 6). Según los datos reportados

en el periodo 2000-2014 hay mayor incidencia de cáncer hepático en hombres.<sup>16</sup>

**Tabla 5.** Casos de Cáncer Hepático en Perú (2000-2014). Ambos sexos.

AÑO	CASOS DE CÁNCER HEPÁTICO
2000	144
2001	123
2002	152
2003	144
2004	146
2005	155
2006	158
2007	189
2008	185
2009	167
2010	187
2011	200
2012	195
2013	184
2014	213

*Fuente:* Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

**Tabla 6.** Casos de Cáncer Hepático en Perú (2000-2014). Hombres.

AÑO	CASOS DE CÁNCER HEPÁTICO
2000	83
2001	72
2002	91
2003	84
2004	89
2005	95
2006	88
2007	111
2008	119
2009	87
2010	98
2011	115
2012	129
2013	105
2014	125

*Fuente:* Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

**Tabla 7.** Casos de Cáncer Hepático en Perú (2000-2014). Mujeres.

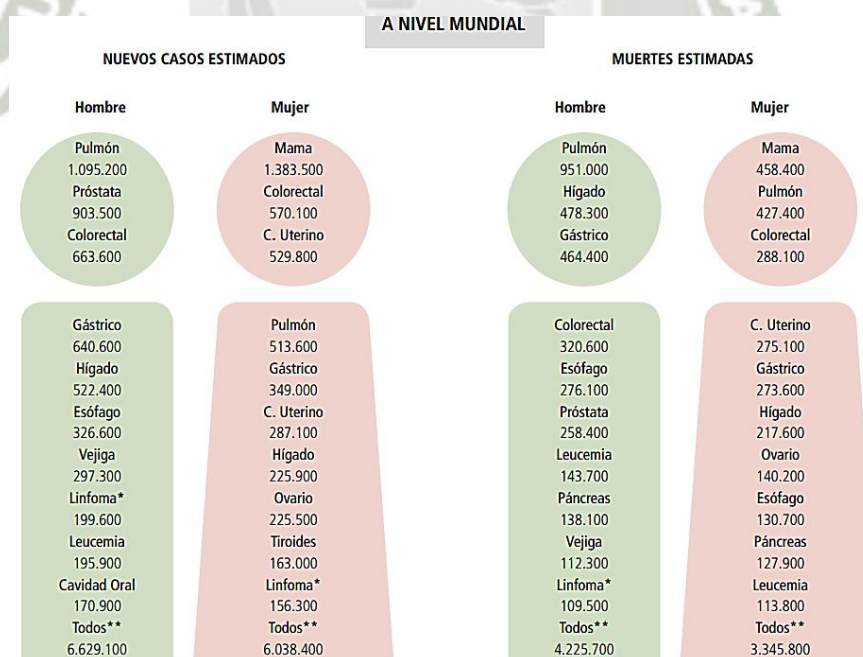
AÑO	CASOS DE CÁNCER HEPÁTICO
2000	61
2001	51
2002	61
2003	60
2004	57
2005	60
2006	70
2007	78
2008	66
2009	80
2010	89
2011	85
2012	66
2013	79
2014	88

**Fuente:** Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

### 1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA INTERNACIONAL

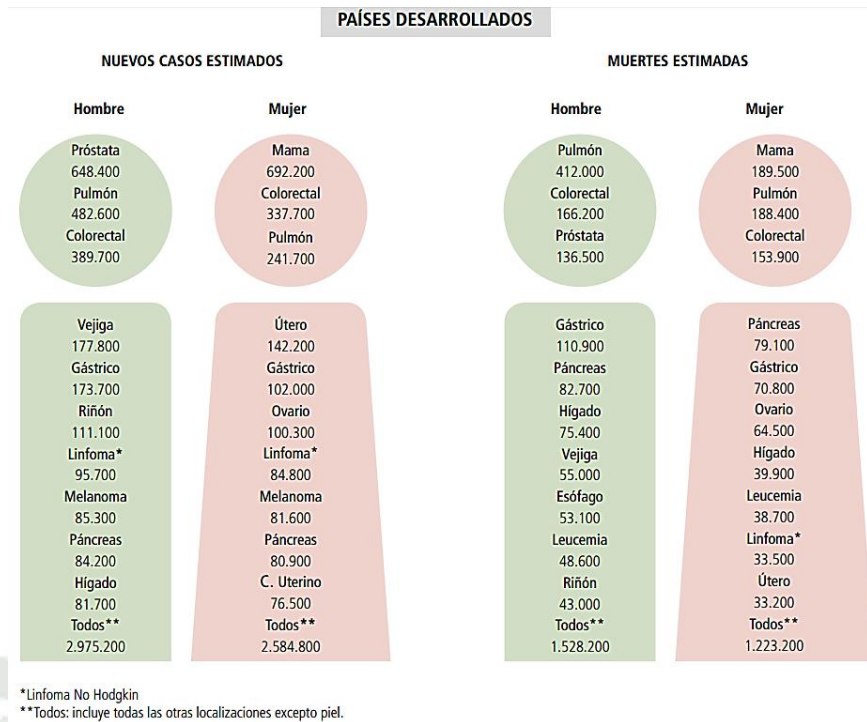
A nivel mundial, en el año 2008 hubo 748 300 nuevos casos y 695 000 muertes. La mitad de los nuevos casos y muertes ocurrió en China. Las tasas más altas de incidencia están en el Este y Sureste Asiático además de África Central y Occidental. En el hombre, el cáncer hepático ocupa el quinto lugar en frecuencia con 522 400 casos, pero el segundo lugar en mortalidad con 478 300 casos (Figura 3). Mientras que en mujeres es el séptimo en frecuencia con 225 900 casos y la sexta causa de muerte con 217 600 (Figura 3). Sin embargo, en países desarrollados en hombres ocupa el décimo lugar en frecuencia con 81 700 casos y el quinto lugar en mortalidad con 75 400 casos; mientras que en mujeres no ocupa un lugar importante entre los más frecuentes, pero ocupa el séptimo lugar en mortalidad con 39 900 casos (Figura 4). Por otro lado en los países en desarrollo en hombres ocupa el tercer lugar en frecuencia con 440 700 casos y el segundo lugar en mortalidad con 402 900 casos; mientras que en mujeres ocupa el sexto lugar con 186 000

casos y el quinto lugar en mortalidad con 177 700 casos (Figura 5).<sup>2</sup> El hepatocarcinoma es el tipo histológico más frecuente (70-85%), dato que está relacionado con la infección crónica por virus de hepatitis B (VHB).<sup>2, 22</sup> Para los países en vías de desarrollo, la infección por VHB es responsable del 60% de los casos de hepatocarcinoma mientras que en países desarrollados es de 23%. Para la infección por hepatitis C (VHC) estos porcentajes son de 33% para los países en vías de desarrollo y 20% para países desarrollados.<sup>23</sup> La incidencia de cáncer hepático está en aumento en varias partes del mundo, incluyendo Estados Unidos y Europa central; esto posiblemente se debe al incremento de la obesidad e infección por VHC en drogadictos.<sup>24</sup> La disminución en otras regiones se atribuye a la introducción de la vacuna para VHB en el esquema de vacunación, en el año 2008 un total de 177 países (91%) incluyó la vacuna en el calendario nacional de inmunizaciones.<sup>25, 26</sup>



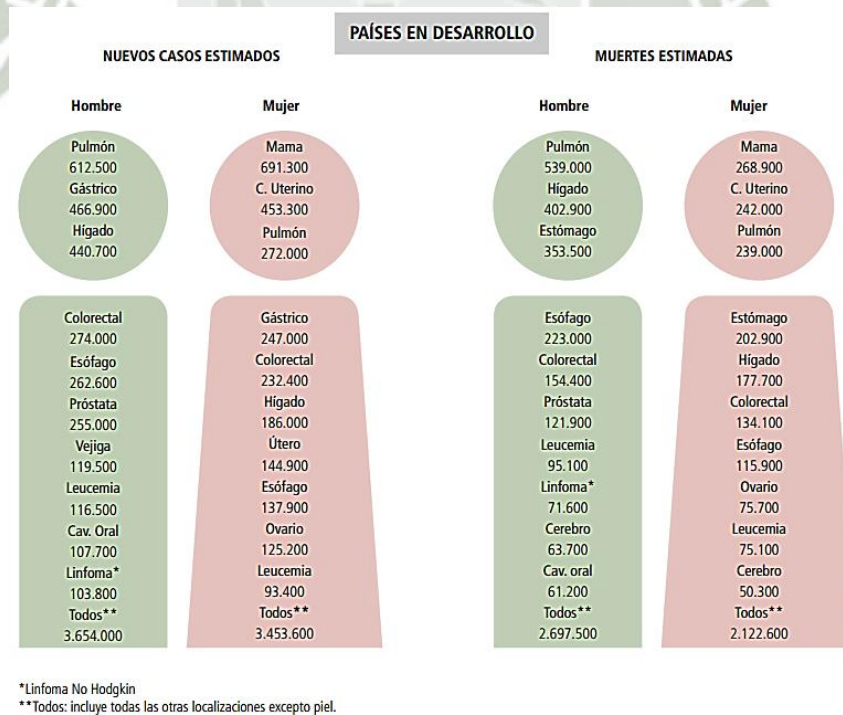
\*Linfoma No Hodgkin  
\*\*Todos: incluye todas las otras localizaciones excepto piel.

**Figura 3.** Nuevos casos y muertes a nivel mundial en el 2008. *Fuente: GLOBOCAN*



**Figura 4.** Nuevos casos y muertes en países desarrollados económicas en el 2008.

Fuente: GLOBOCAN



**Figura 5.** Nuevos casos y muertes en países en desarrollo económico en el 2008.

Fuente: GLOBOCAN

### 1.2.3. TIPOS HISTOLÓGICOS

Entre los tumores primarios malignos formados en el hígado se pueden distinguir el Carcinoma hepatocelular (hepatocarcinoma), el cual comprende del 80 al 90% de cáncer primario de hígado, en este grupo hay una variante denominada Fibrolamelar presentada habitualmente en mujeres jóvenes, se caracteriza por presentar mejor pronóstico que

**Tabla 8.** Estadios de Cáncer Hepatocelular.

ESTADÍOS DE HEPATOCARCINOMA		CARACTERÍSTICAS
I		Existencia de un sólo tumor, que no se ha extendido afectando a vasos sanguíneos.
II		Un sólo tumor que se ha extendido afectando a vasos, o más de un tumor, ninguno mayor de 5 cm.
III	IIIA	Más de un tumor mayor de 5 cm.
	IIIB	Existencia de uno o más tumores de cualquier tamaño que afectan a una rama principal de la vena porta o de la vena hepática
	IIIC	El tumor o tumores invaden directamente órganos vecinos distintos de la vesícula biliar, o perforan el peritoneo visceral.
IV	IVA	El tumor afecta a los ganglios linfáticos regionales.
	IVB	El tumor se ha extendido más allá del hígado, alcanzando otras partes del cuerpo, tales como los huesos o el pulmón.

**Fuente:** Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

el Hepatocarcinoma común; entre otros tumores malignos se conocen al Colangiocarcinoma, Cistoadenocarcinoma, Hepatoblastoma (poco frecuente en adultos), Sarcomas (angiosarcoma, leiomiocarcinoma) e Indiferenciado.

En infantes los tumores más comunes son los primarios, sobre todo el Hepatoblastoma; mientras en adultos la metástasis es más frecuente, siendo más prevalente el tumor primitivo del carcinoma hepatocelular. Por otro lado, el tumor benigno más común es el Hemangioma.<sup>19</sup>

#### 1.2.4. ESTADÍOS

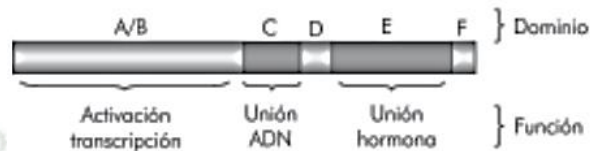
La clasificación de los estadios en el Hepatocarcinoma (Tabla 8) agrupados según pronóstico, fueron propuestos por AJCC (American Joint Committee on Cancer) dentro de sistema denominado TNM, el cual ha designado diferentes categorías tales como T (tumor primario), N (ganglios linfáticos regionales) y M (metástasis a distancia).<sup>19</sup>

## 2. RECEPTOR LRH-1

Un receptor nuclear es una clase de proteína, el cual se encuentra en el interior (núcleo) de diferentes tipos de células, trabaja junto con otras proteínas capaces de regular la expresión de genes específicos y así controlar procesos de desarrollo, metabolismo y homeostasis en el organismo. La única propiedad que diferencia un receptor nuclear de otros receptores es su capacidad de poder interactuar de forma directa con el ADN y así controlar la expresión génica, siempre y cuando esté presente el ligando.<sup>18</sup> Todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares comparten una organización estructural común (Figura 6) que para efectos de simplicidad, puede dividirse en tres regiones o dominios funcionales, siendo la primera una región N-terminal (*dominio A/B*), que varía en secuencia y longitud entre los diferentes miembros y contiene determinantes estructurales para la interacción con la maquinaria de transcripción basal y la regulación de su actividad; la segunda es una región muy conservada (*dominio C*, que también se conoce como *DBD* por las siglas del término en Inglés «Dominio de Unión a ADN»), implicada en la unión a ADN a nivel de los elementos genéticos específicos localizados en la región reguladora de cada gen diana y la tercera una

región moderadamente conservada a la cual se fija el ligando (o fármaco) de cada receptor (*domino de unión a ligando* o *LBD* por sus siglas en Inglés).<sup>27, 28</sup>

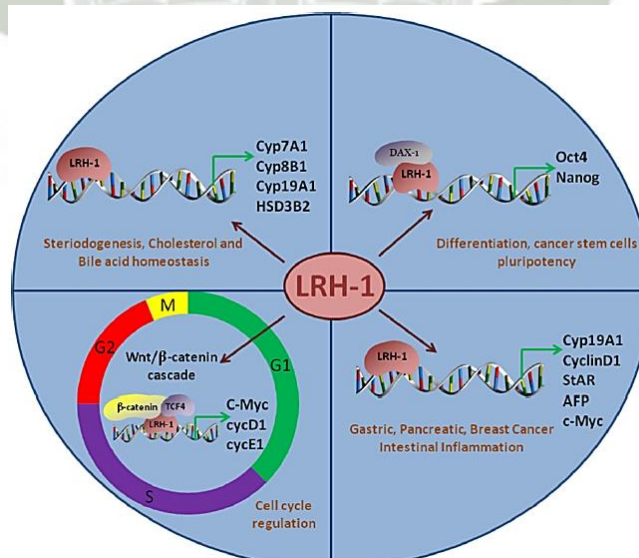
Cuando se refiere a un receptor nuclear huérfano, es aquel que hasta la actualidad no se ha logrado identificar algún ligando endógeno que se le une.<sup>29</sup> Un receptor huérfano juega un diverso e importante rol biológico en el crecimiento y la fisiología del adulto.<sup>30</sup>



**Figura 6.** Estructura común de Receptores Nucleares. *Fuente: Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares. Rev. Colombiana de Cardiología*

El receptor homólogo de hígado 1 (LRH-1, NR5A2) y Factor esteroideogénico-1 (SF-1, NR5A1) son dos receptores nucleares huérfanos, miembros de la subfamilia Ftz-F1 de los receptores nucleares, la cual comprende cuatro miembros NR5A1–NR5A4. LRH-1 se expresa en tejidos derivados del endodermo, incluyendo intestino, hígado y páncreas exocrino, así como en el ovario.<sup>31</sup>

## 2.1. ACTIVIDAD DE LRH-1



**Figura 7.** Acciones fisiológicas del LRH-1. *Fuente: Therapeutic potential of Liver Receptor Homolog-1 modulators. ELSEVIER.*

En tejidos como el de intestino, hígado, páncreas y ovario, LRH-1 desempeña un rol predominante en el desarrollo, transporte de colesterol inverso, homeostasis de ácidos biliares, esteroidogénesis y ciertas enfermedades, incluido el cáncer.<sup>31, 32</sup> (Figura 7)

#### 2.1.1. CONTROL DE VÍAS METABÓLICAS

LRH-1 juega un papel clave en el metabolismo de las diferentes vías del colesterol y homeostasis del ácido biliar, como son el transporte reverso de colesterol, síntesis de ácido biliar y circulación enterohepática.<sup>33</sup>

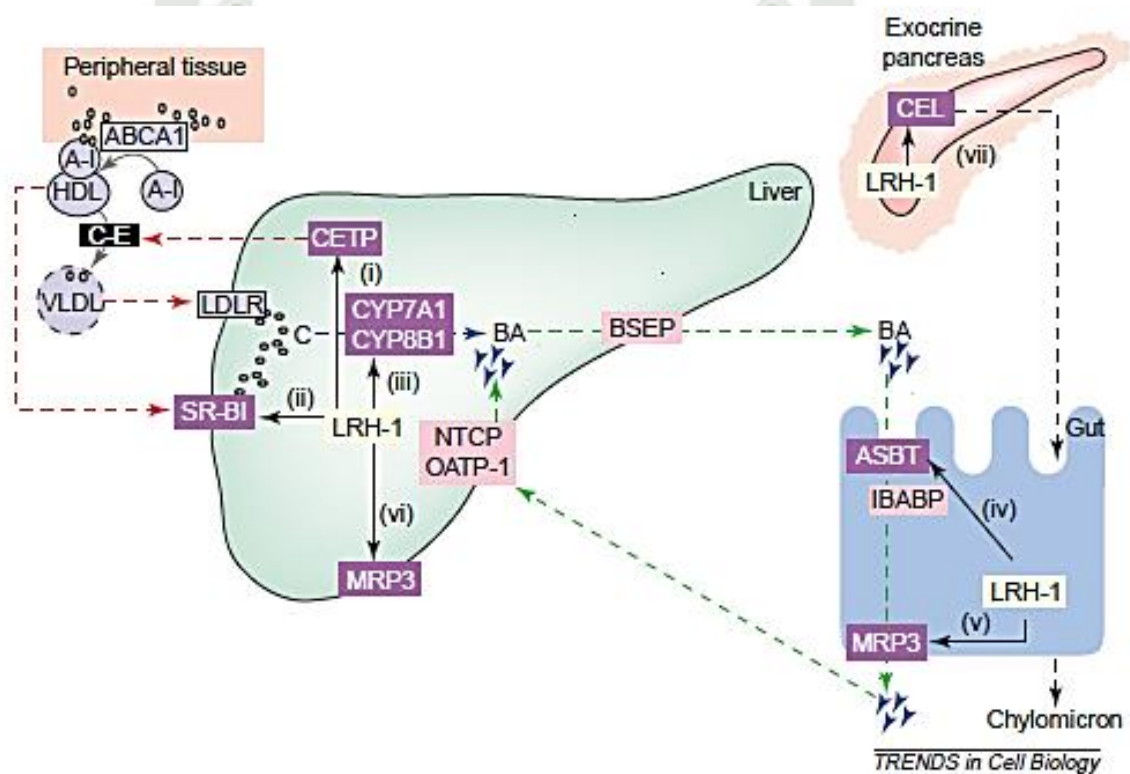
##### 2.1.1.1. EN HÍGADO

LRH-1 regula la expresión de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), la cual remodela las partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado.<sup>34</sup> Además induce la expresión del receptor de tipo scavenger BI (SR-BI), facilitando así la captación de colesterol de HDL por el hígado.<sup>35</sup> Una vez en el hígado, el colesterol se convierte en ácidos biliares, etapa que también es controlada por LRH-1 a través de la regulación de colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) y esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP8B1).<sup>36</sup> Adicionalmente, los efectos hepatoprotectores dependientes de LRH-1, activados por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  en la colestasis, el cual implica la eliminación del exceso de ácidos biliares en la circulación tras la inducción de MRP3 mediada por LRH-1, podrían tener profundas implicaciones para el transporte hepatobiliar en condiciones fisiológicas y patológicas normales.<sup>37</sup> (Figura 8)

##### 2.1.1.2. EN INTESTINO

Cuando se produce la circulación enterohepática, los ácidos biliares fluyen desde el hígado hacia el interior de la luz

intestinal a través de los conductos biliares, entran en el enterocito del íleon terminal y son transportados de regreso al hígado a través de la vena porta.<sup>38</sup> El receptor LRH-1 participa regulando la expresión del transportador ileal apical sódico-dependiente de ácido biliar (ASBT) y proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos (MRP3).<sup>37</sup> (Figura 8)



**Figura 8.** Vías metabólicas controladas por LRH-1. Líneas rojas, vías implicadas en transporte reverso de colesterol; líneas azules, síntesis de ácido biliar y líneas verdes, circulación enterohepática. A-1, apolipoproteína A-1; ABCA1, transportador de cassette-uni6n-ATP; BSEP, bomba de exportaci6n de sales biliares; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad; VLDL, poliproteína de muy baja densidad. Fuente: *LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. ELSEVIER.*

### 2.1.1.3. EN PÁNCREAS EXOCRINO

LRH-1 induce la expresión de la enzima carboxil éster lipasa (CEL), la cual es sintetizada principalmente en el páncreas y glándulas mamarias, está implicada en la absorción de ésteres de colesterilo y el ensamblaje de lipoproteínas por el intestino.<sup>39</sup> (Figura 8)

## 2.1.2. ROLES EMERGENTES DE LRH-1 EN ENFERMEDADES

### 2.1.2.1. DESORDENES METABÓLICOS

Uno de los lugares clave de la expresión y función del receptor LRH-1 es en los hepatocitos, donde se encarga de regular la transcripción de genes como Cyp7A1 y Cyp8B1, codificando enzimas cruciales para la síntesis de ácido biliar y colesterol. Hasta hace poco el efecto del LRH-1 en los desórdenes metabólicos no se conocía bien. Un estudio reciente describe dos fosfolípidos de fosfatidilcolina, dilauril fosfatidilcolina (DLPC) y diundecanoil fosfatidilcolina (DUPC) como potentes agonistas de LRH-1.<sup>3</sup> Ambos ligandos lipídicos activan potentemente los receptores NR5A, LRH-1 (homólogos humano y ratón) y SF-1 (homólogo ratón), no muestran efecto sobre la función de otros receptores nucleares.<sup>40</sup> Lee y sus colegas plantearon la hipótesis que la activación de LRH-1 en hígado podría incrementar la producción de ácido biliar obteniendo un efecto metabólico positivo en obesidad y diabetes. En ratones obesos inducidos por dieta, la administración de DPLC dio como resultado un aumento en la producción de ácido biliar, disminución de la esteatosis hepática y mejor utilización de la glucosa.<sup>3</sup>

### 2.1.2.2. CÁNCER DE COLON E INFLAMACIÓN

Evidencias recientes dan a conocer la influencia del LRH-1 en el crecimiento y progresión del cáncer de colon. El receptor

LRH-1 se encuentra altamente expresado en las criptas intestinales, donde es involucrado en la proliferación y renovación celular.<sup>4</sup> Botrugno et. al.<sup>4</sup> ha demostrado que el aumento de proliferación de células intestinales es producido por LRH-1 al estimular la expresión de ciclinas G1 como son las ciclinas D1 y E1.<sup>4</sup>

#### 2.1.2.3. CÁNCER DE MAMA

El receptor LRH-1 se encuentra expresado normalmente a bajos niveles en el tejido adiposo de mama, en humanos, específicamente localizado en la fracción estromal.<sup>41</sup> Sin embargo, en el cáncer su expresión es alta y está localizado tanto en células epiteliales tumorales como en intra-tumorales estromales.<sup>5</sup> Los estadíos en los que presenta alta expresión son en el carcinoma primario invasivo y carcinoma in situ. Aunque los efectos de LRH-1 en el cáncer de mama no se entienden completamente, la evidencia sugiere que sus roles son integrado con la vía de señalización de estrógenos.<sup>42</sup>

#### 2.1.2.4. CÁNCER DE PÁNCREAS

Los recientes estudios de asociación genómica han relacionado mutaciones en el gen LRH-1 y sus regiones promotoras ascendentes con células cancerígenas pancreáticas.<sup>6</sup> Además, se encuentra que la expresión de LRH-1 es elevada en los adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos. En células cancerígenas pancreáticas, LRH-1 también media la proliferación de células tumorales mediante la regulación ascendente de las ciclinas D1, E1 y c-Myc. Por el contrario el bloqueo de la expresión de LRH-1 dio como resultado la detención del ciclo celular, pero no la apoptosis en células de cáncer de páncreas.<sup>43</sup>

## 2.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LRH-1

### 2.2.1. ACTIVADORES DE LRH-1

Como reguladores de la actividad de LRH-1, se conocen como importantes activadores los fosfolípidos tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol se observó que se unían con LRH-1 humano y SF-1 tanto del ratón como del humano, identificándolos como ligandos endógenos.<sup>44</sup> La interrupción del tamaño y la forma de la bolsa de unión al ligando hidrófobo no parecen afectar su actividad transcripcional. Sin embargo, las mutaciones en la fracción LBD del LRH-1 humano reducen la unión de fosfolípidos y previenen el reclutamiento de co-activadores que causan una inhibición de la transcripcional de la actividad de LRH-1.<sup>45</sup> En apoyo de esta idea está la reciente identificación de DPLC y DUPC que actúan como activadores fuertes de LRH-1 en modelos *in vitro* e *in vivo*.<sup>46</sup>

### 2.2.2. CO-ACTIVADORES DE LRH-1

La actividad de LRH-1 es regulado principalmente por co-reguladores transcripcionales. LRH-1 también puede actuar como un factor de competencia vinculándose a otros receptores y complejos transcripcionales para mejorar la transcripción de los genes diana.<sup>47</sup>

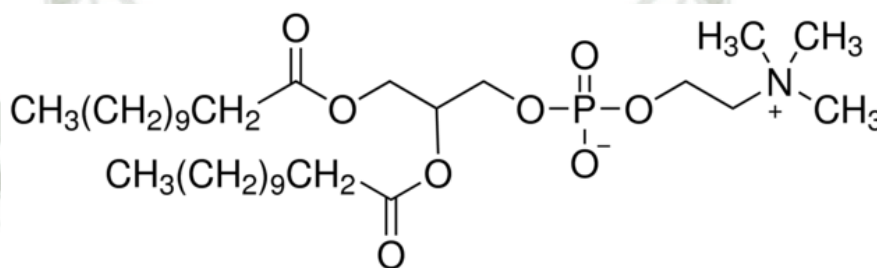
### 2.2.3. CO-REPRESORES DE LRH-1

Los receptores nucleares SHP y DAX-1 actúan como represores de muchos RNs incluyendo LRH-1 mediante la inhibición de co-activador vinculante.<sup>48</sup> Como mejor co-represor, SHP se une a la región AF-2 de LRH-1. La interacción LRH-1-SHP se produce a través de la interacción con LRH-1 residuos Arg361 y Glu534 que forman una pinza de carga atípica.<sup>49</sup>

## 3. DILAURIL FOSFATIDILCOLINA

Los estudios estructurales han identificado fosfolípidos como potenciales LRH -1 ligandos<sup>50</sup>, pero su relevancia funcional no está clara. Una fosfatidilcolina especie

inusual con dos laterales acilo de ácido graso saturado de 12 carbonos cadenas (dilauril fosfatidilcolina (DLPC)) (Figura 9) es un ligando agonista LRH-1 *in vitro*. El tratamiento con DLPC induce la biosíntesis de ácidos biliares, enzimas de hígado en ratón, aumenta los niveles de ácidos biliares, y disminuye triglicéridos a nivel hepático y glucosa en suero. Tratamiento con DLPC también disminuye esteatosis hepática y mejora la homeostasis de la glucosa en ratón de dos modelos de resistencia a la insulina. La pérdida del receptor nuclear LRH-1 disminuye los niveles de ácidos biliares, lo que indica que un agonista LRH-1 podría incrementarlos y mejorar el hígado graso.<sup>10</sup>



**Figura 9.** 1,2-Didodecanoyl-glycero-3-phosphocholine (DLPC)

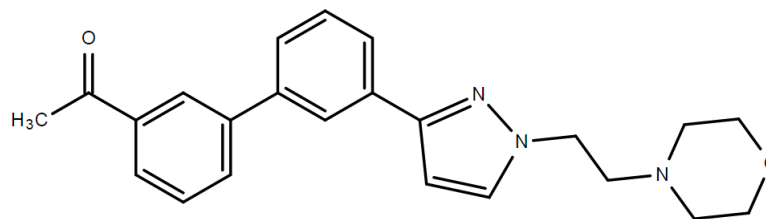
La activación de LRH-1 con DLPC da como resultado la disminución de la expresión de SREPB-1 en hígado de ratón y una reducción de esteatosis hepática en dos modelos de ratones de resistencia a la insulina.<sup>46</sup>

En mamíferos adultos, LRH-1 se expresa predominantemente en tejidos del endodermo como intestino, páncreas e hígado.<sup>51, 52</sup>

#### 4. ANTAGONISTA LRH-1

El antagonista LRH-1 (1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil) etil)-1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil) etanona) (Figura 10), es un compuesto permeable a las células, actúa como un antagonista específico del receptor de hígado homólogo-1 (LRH-1, NR5A2), bloqueando su actividad transcripcional. Reduce los niveles de mRNA G0S2 (IC<sub>50</sub>=5mM) en células HEK293. No presenta ninguna actividad antagonista contra andrógenos, estrógenos, o receptores de hormonas tiroideas. Demostrado

tener actividad anti-proliferativa en LRH-1 que expresa HT-29, líneas de células tumorales T47D y MDA-MB-468 ( $IC_{50}$  = de 15 a 20 mM).<sup>11</sup>



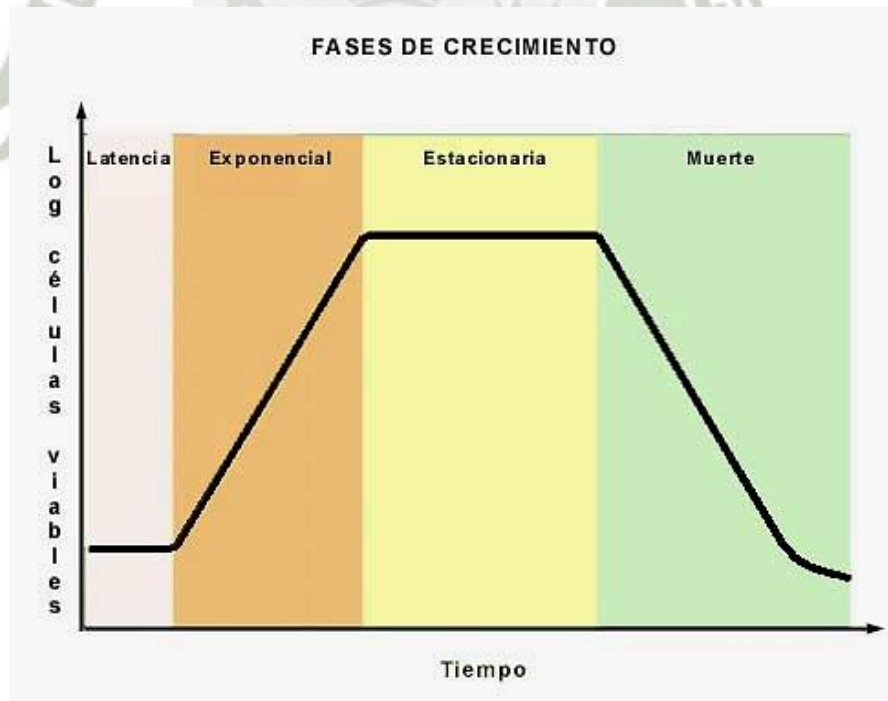
**Figura 10.** Antagonista LRH-1 (1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil) etil)-1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil) etanona)

Tratamientos en células AsPC-1 (páncreas), HT29 (colon) y T47D (mama) con el antagonista LRH-1 resultó en la inhibición medida del receptor de la proliferación de células cancerígenas.<sup>53</sup>

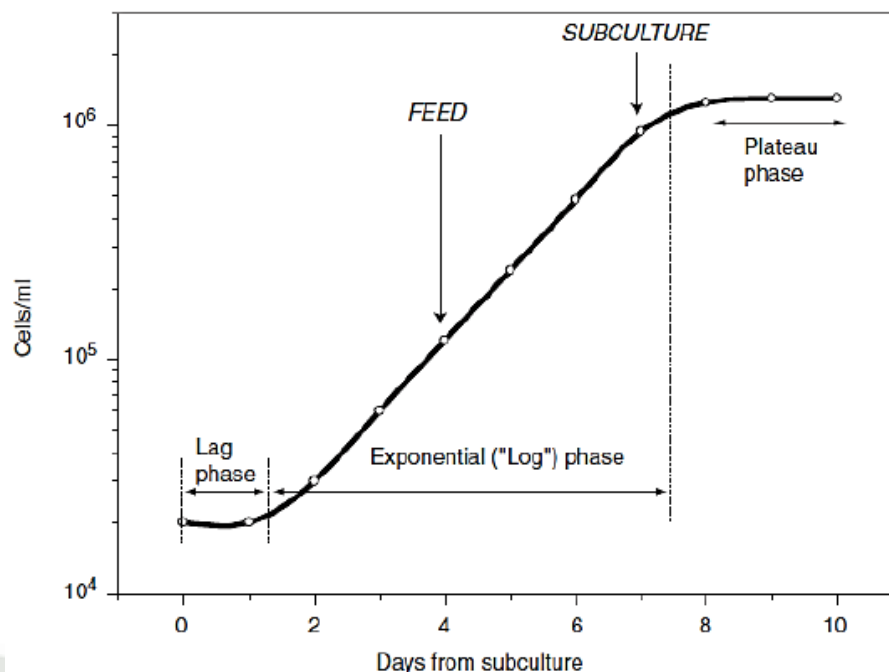
## 5. CULTIVO CELULAR

El cultivo celular es un procedimiento o técnica que consiste en la proliferación controlada de un tipo de célula, a partir de cantidades mínimas de células a condiciones controladas de temperatura, nutriente, pH, humedad, y presiones de gases como  $CO_2$  y  $O_2$ <sup>54</sup> y siguen un proceso de crecimiento (Figura 11) (Figura 12). Ésta técnica es de gran importancia ya que en la actualidad se realizan cultivos *in vitro* de diferentes tipos celulares, tejidos y órganos, ya sean normales o tumorales. Dichos cultivos son empleados en investigación científica para realizar diversos estudios en diferentes especialidades como inmunología, farmacología, toxicología, genómica, actividad intracelular, flujo de sustancias intracelulares, interacciones entre célula-célula, obtención de productos celulares e ingeniería de tejidos.<sup>55</sup> La mayor parte de las líneas celulares crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido. El crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares especialmente de células hematopoyéticas y tumores ascíticos. Según si la línea celular precise o no unirse al sustrato para proliferar se dice que es dependiente (adhesión) o independiente

(suspensión) de anclaje: la mayor parte de las células que se mantienen en cultivo proceden de disgregación tisular o de tumores formados por células adheridas y mantienen la característica que necesitan adherirse al sustrato para mantenerse. Por otro lado los cultivos en suspensión suelen coincidir con los de aquellas células que “in vivo” son circulantes, en general células sanguíneas. El gran interés que tiene el cultivo de células sanguíneas (linfocitos) ha extendido notablemente la caracterización de los cultivos en suspensión. Los tipos de sustrato más empleados en la actualidad son de vidrio, empleado usualmente como sustrato de cultivo tiene como ventajas su escaso coste y su facilidad de limpieza y esterilización. Asimismo, es especialmente útil para su posterior observación al microscopio por su calidad óptica. Otro es el plástico desechable, muy empleado en la actualidad como material desechable estéril por irradiación. El plástico más empleado es el poliestireno, de buena calidad óptica. Debido a que este plástico es hidrofóbico requiere un tratamiento mediante irradiación-gamma, químico, o mediante descargas eléctricas que produzca una superficie hidrofílica.<sup>56</sup>



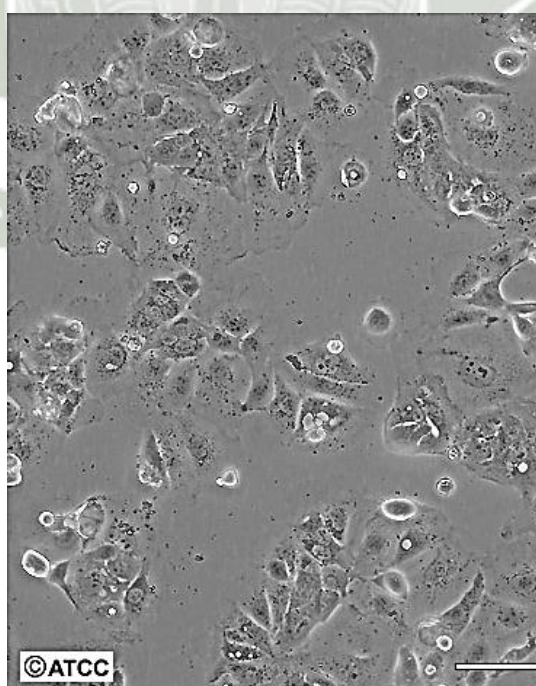
**Figura 11.** Fases de crecimiento celular.



**Figura 12.** Fase de crecimiento exponencial en células.

### 5.1. CACO-2 (CÉLULAS ADENOCARCINOMAS COLORRECTALES)

La línea celular Caco-2 (Figura 13) (Figura 14) es una línea continua de tejido epitelial colorrectal humano heterogéneo, fue aislado de un tumor de colon

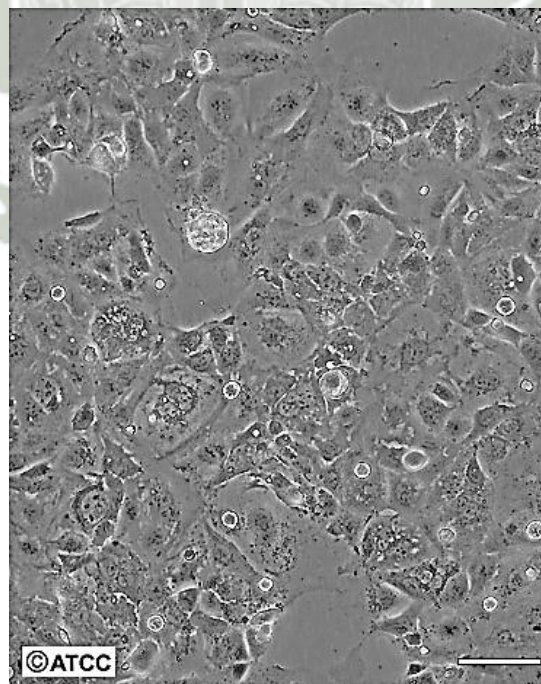


**Figura 13.** Células Caco-2, baja densidad.

primario en un varón de 72 años de raza caucásica usando la técnica de cultivo de explantes. Forman adenocarcinomas moderadamente bien diferenciados consistentes con el grado II primario colónico, en ratones desnudos.<sup>57</sup>

Este modelo presenta características semejantes a las de intestino humano (uniones estrechas y microvillus), expresa enzimas intestinales (aminopeptidasas, esterasas, sulfatasas, y citocromo P450), y transportadores (de ácidos biliares, de aminoácidos, de biotina, de ácidos monocarboxílicos, PEPT1 y Pgp), simula de manera muy completa los dos tipos de barreras para la absorción de fármacos, como son la bioquímica y la fisicoquímica. Además tiene la ventaja de que puede cultivarse sobre un soporte poroso o un filtro en el que se forma la monocapa celular polarizada en sólo unos días y se diferencia en células intestinales de morfología típica, que incluye la expresión de enzimas y la formación de uniones estrechas.<sup>58</sup>

Es importante mencionar que la heterogeneidad de las células Caco-2 y las diferentes condiciones de cultivo utilizadas por cada laboratorio ha dado lugar a la selección de diferentes poblaciones celulares que son conocidos como tendencia fenotípica, lo cual podría ser la causa de la gran variabilidad de resultados obtenidos por diferentes laboratorios. Normalmente, las células se



**Figura 14.** Células Caco-2, alta densidad.

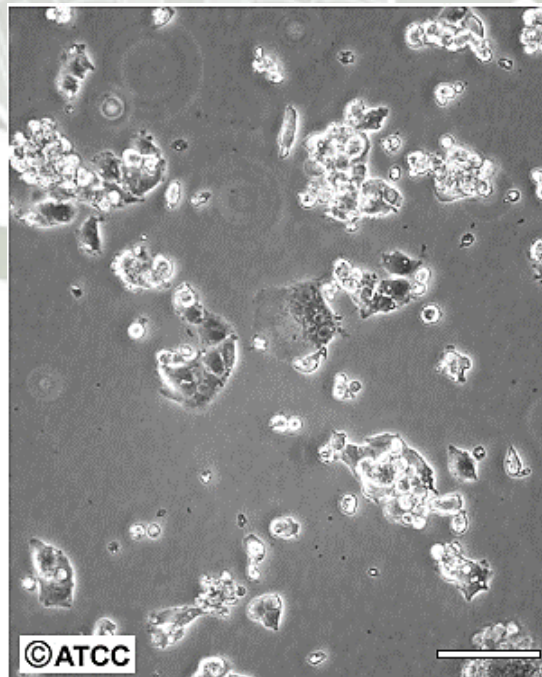
cultivan sobre un soporte de policarbonato. Crecen hasta una fase estacionaria en aproximadamente 10 días de cultivo y generalmente, los estudios de transporte se llevan a cabo después de 21 días, cuando la expresión de transportadores y enzimas alcanza su máximo.<sup>49</sup>

#### 5.1.1. APLICACIONES CIENTÍFICAS

Esta línea celular ha sido utilizada ampliamente para predecir la absorción intestinal de potenciales candidatos a fármacos.<sup>60</sup> Además, para estudiar si los componentes de la regulación sigma B en *Listeria monocytogenes* contribuyen a la invasión celular,<sup>61</sup> para estudiar la invasión intracelular por *Listeria ivanovii*,<sup>62</sup> análisis funcional de la bacteriocina divercin AS7<sup>63</sup> y estudiar el efecto del ácido maslínico, un triterpeno pentacíclico, en líneas celulares de cáncer de colon.<sup>7</sup>

#### 5.2. HEPG-2 (CÉLULAS CARCINOMAS HEPÁTICAS)

HepG-2 (Figura 15) (Figura 16) es una línea celular perpetua que deriva de un tejido extraído de un hígado de un varón Caucásico Americano de 15 años bien diagnosticado con carcinoma hepatocelular. Estas células son de morfología epitelial, tienen el modelo cromosómico número 55 y no son

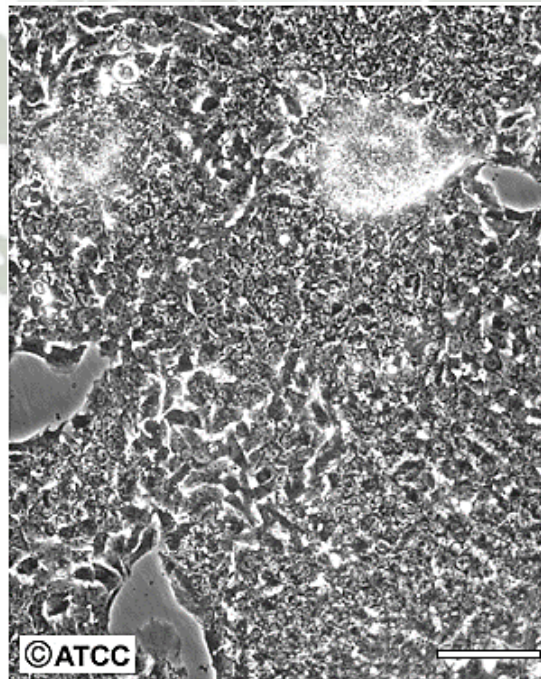


**Figura 15.** Células HepG-2, baja densidad.

tumorales en ratones atímicos o desnudos. Estas células segregan una variedad de plasma mayormente proteico; ejem, albumin, transferrin y acute phase proteins fibrinogen, alpha 2-macroglobulina, alpha 1-antirpsin, transferrin y plaminogen. Han sido cultivadas satisfactoriamente en sistemas de cultivo a gran escala. No se han detectado antígenos del virus de la Hepatitis B. Las células HepG2 han demostrado ser resistentes al G418 (400ug/mL). Las células responderán a la estimulación de la hormona de crecimiento humana.<sup>57</sup>

### 5.2.1. APLICACIONES CIENTÍFICAS

Sistema utilizado en el estudio de los hepatocitos polarizados humanos, modelo de estudio en el tráfico y dinamismo intracelular de las oclusiones de bilis y las proteínas y lípidos humanos de membrana sinusoidal en hepatocitos in vitro, sistema modelo para estudios sobre el metabolismo del hígado y la toxicidad de xenobióticos, detección de citroprotectores. Las células HepG-2 también son usadas en ensayos clínicos con sistemas de hígados bio-artificiales.<sup>8</sup>



**Figura 16.** Células HepG-2, alta densidad.

### 5.3. MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo juega un papel muy importante, ya que contiene compuestos que sirven de alimento y mantenimiento. Tanto su composición y/o preparación como su estado físico, ya sea líquido o semisólido, depende si es para microbiología o para líneas celulares.

#### 5.3.1. EMEM (EAGLE'S MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM)

Medio mínimo esencial de Eagle es similar al BME, pero con una mayor concentración de aminoácidos precursores de proteínas y vitaminas. Se modificó para contener la Solución salina balanceada de Eagle, aminoácidos no esenciales, de modo que el medio se aproxima más a la composición proteica de células de mamífero. Contiene L-glutamina 2mM, piruvato sódico 1mM y bicarbonato sódico 1500 mg/L. Con este medio se consigue un mayor mantenimiento de las células *in vitro*, sin requerir de renovaciones o cambios del medio de cultivo durante un período de tiempo. Este nivel reducido de bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ , 1.5 g/L) está destinado a ser utilizado en un 5%  $\text{CO}_2$  en aire. Puede requerirse bicarbonato de sodio adicional para su uso en incubadoras que contienen porcentajes más altos de  $\text{CO}_2$ . Las pruebas de esterilidad se realizan en cada lote de medio usando los métodos USP actuales. En cada lote de medio también se comprobó su capacidad para soportar el crecimiento de varias líneas celulares diferentes utilizando tanto subculturas secuenciales y eficiencias de galvanoplastia.<sup>64</sup>

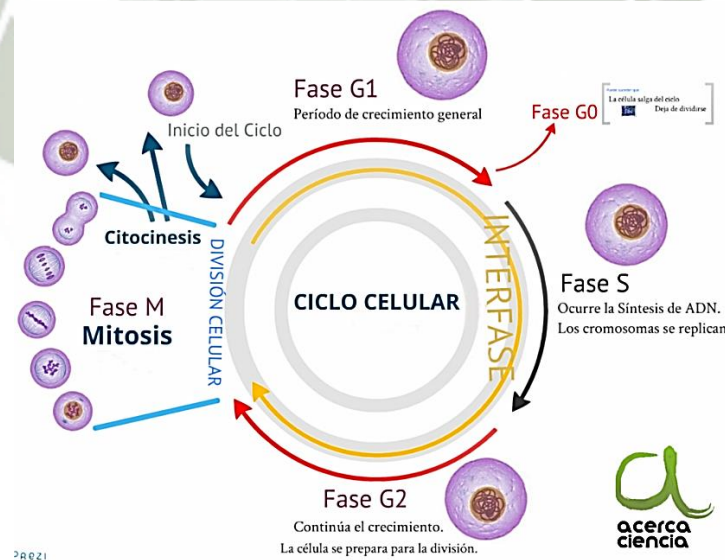
#### 5.3.2. DMEM (DULBECCO MODIFIED EAGLE MEDIUM)

Muchas modificaciones de Medio de Eagle se han desarrollado desde la formulación original. Entre los más utilizados de estas modificaciones es el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). El cual es una modificación del medio basal de Eagle (BME) que contiene cuatro veces más aminoácidos y vitaminas, así como componentes complementarios adicionales. Se caracteriza por contener

4mM de L-glutamina, 4500mg/L de glucosa, 1mM Piruvato sódico y 1500mg/L de bicarbonato sódico. Este nivel reducido de bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ , 1.5g/L) está destinado a ser utilizado en un 5%  $\text{CO}_2$  en aire. Puede requerirse bicarbonato de sodio adicional para su uso en incubadoras que contienen porcentajes más altos de  $\text{CO}_2$ . Las pruebas de esterilidad se realizan en cada lote de medio usando los métodos USP actuales. En cada lote de medio también se comprobó su capacidad para soportar el crecimiento de varias líneas celulares diferentes utilizando tanto subculturas secuenciales y eficiencias de galvanoplastia.<sup>64</sup>

## 6. CICLO CELULAR

El ciclo celular es la parte fundamental para la reproducción de los organismos. Aunque su función principal es el originar nuevas células, es relevante también mencionar funciones como el asegurarse de que el proceso se realice de una manera debida y con regulación requerida. El ciclo celular está conformada por dos grandes fases que son la interfase (dividida en fase  $G_1$ , S y  $G_2$ ) y la mitosis (comprendida por la profase, metafase, anafase y telofase).<sup>9</sup> (Figura 17)



**Figura 17.** Las fases del ciclo celular

La fase  $G_1$  sigue a la mitosis anterior y comprende un periodo de desarrollo y crecimiento de la célula. En este periodo también se produce la acumulación del

ATP necesario para que de esta manera pueda incrementar el tamaño de la célula. En la fase S se da la síntesis y replicación del ADN, donde la doble hélice se abre en diversos puntos los cuales son llamados “ojos de replicación” y es en estos donde se produce la síntesis del ADN, transcribiéndose simultáneamente los genes. Como último, se tiene la fase G<sub>2</sub>, proceso previo a la mitosis, en el cual la célula se prepara para su división celular. En este periodo, los cromosomas ya están duplicados, siendo dos cromátidas con uniones a nivel del centrómero.<sup>9, 65</sup> Como todo proceso, el ciclo celular está sujeto a una regulación la cual es realizada por proteínas específicas como son las cinasas y ciclinas.<sup>66</sup> En los organismos unicelulares la división celular requiere una verdadera reproducción, ya que la célula madre, divide su núcleo en dos núcleos hijos con la misma información genética, siendo el citoplasma y demás orgánulos repartidos. En organismos multicelulares se requieren más secuencias para realizar la división celular de manera exitosa.<sup>9, 67</sup>

## 6.1. INTERFASE

### 6.1.1. FASE G<sub>1</sub>

Esta fase, como bien se explica, es el paso posterior a la mitosis y previo a la fase S. es en esta fase donde la célula aumenta su material enzimático, provocando replicación de sus orgánulos y otras estructuras citoplasmáticas también aumentan en número, permitiéndole así a la célula, aumentar de tamaño. Existen estructuras que tienden a ser sintetizadas como microfilamentos de actina, microtúbulos, e incluso los ribosomas.<sup>9, 68, 69</sup>

Las células pueden entrar en un periodo de reposo, el cual es llamado G<sub>0</sub> donde pueden permanecer en un estado de no proliferación, ya sea por días, meses, años e incluso, no volver a proliferarse nunca más como es el caso de las neuronas o las fibras esqueléticas, que no se dividen, pero renuevan organelas.<sup>70, 71</sup>

### 6.1.2. SENESCENCIA CELULAR (FASE G<sub>0</sub>)

Este es una fase de ausencia de crecimiento y/o reposo. La ausencia de crecimiento, lleva a la célula a entrar en una especie de latencia celular,

en el cual la célula se queda varada y no avanza de  $G_1$ , en muchos casos porque es incapaz o sencillamente porque no lo necesita.<sup>9, 65, 68, 72</sup>

### 6.1.3. FASE S

Esta fase, llamada fase de síntesis, posee una función especial que es la replicación del ADN la cual comienza una vez que la célula haya alcanzado un tamaño suficiente, las proteínas necesarias y se cuenta con el ATP indicado. Puesto que el ADN lleva la información genética, este debe duplicarse antes de la mitosis, para que en lo posterior eta pueda ser distribuida entre las células hijas. El ADN al ser una doble hélice, durante la replicación se abre y permite que a estas se unan las nuevas dobles cadenas, las cuales quedan unida a la original haciendo el papel de molde siendo llamados estos puntos como “ojos de replicación”, estas cadenas quedan unidas por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de “cromátides hermanas”. A la vez, proteínas como las histonas y otras proteínas asociadas al ADN son sintetizadas.<sup>9,66, 73, 74</sup>

### 6.1.4. FASE G2

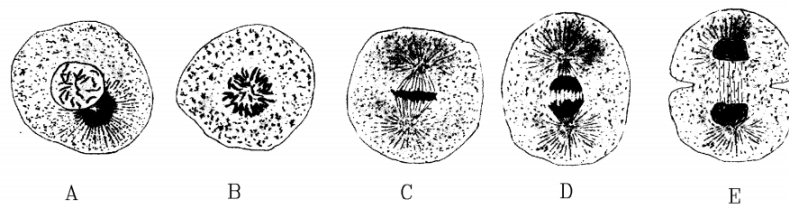
Esta fase es la última de la interfase previa a la mitosis en la cual se realiza la repartición del material genético. La cromatina recién duplicada queda esparcida por el núcleo en forma de filamentos, la cual comienza a enroscarse y compactarse llamándose cromosoma. En esta fase, se realiza una confirmación del ADN recientemente duplicado y se asigna estructuras equitativas para ambas células hijas, los cuales se desarrollarán en la mitosis.<sup>9, 75</sup>

## 6.2. MITOSIS

Posterior a la condensación de la cromatina (cromosoma) se produce la mitosis, pudiendo ser variable entre los diferentes organismos, pero, en conclusión, está conformado por 4 etapas: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales se encargan de la repartición del material genético.<sup>9,76</sup> (Figura 18)

### 6.2.1. PROFASE

Esta fase, es la más larga de la mitosis celular, y es aquí donde suceden fenómenos tanto a nivel nuclear como citoplasmático. La cromatina, se condensa formando cromosomas definidos. Cada uno de estos fue duplicado en la fase S y ahora, consta de dos cromátides hermanas que están unidas por el centrómero. La envoltura nuclear en sí, va rompiéndose y gran parte de los nucléolos van desapareciendo, los microtúbulos del huso entran a la región nuclear.<sup>9, 76</sup>



**Figura 18.** Fases de la mitosis. A. Profase; B. Metafase (vista polar); C. Metafase (vista ecuatorial); D. Anafase; E. Telofase

### 6.2.2. METAFASE

El huso mitótico está completamente desarrollado. Los cinetócoros interaccionan a ellos por medio de los microtúbulos del huso y los cromosomas se alinean en un plano ecuatorial constituyendo así la placa ecuatorial. Esta es una fase adecuada para la observación de cromosomas, para lo cual se rompe la célula a través de un choque osmótico.<sup>9</sup>

### 6.2.3. ANAFASE

Aquí los cinetócoros son separados y arrastrados a cada polo de la célula por cada cromátida. Este movimiento parece ser producido por un desensamblaje de los microtúbulos.<sup>9</sup>

### 6.2.4. TELOFASE

Los cromosomas son revestidos por retículo endoplasmático, los microtúbulos polares se alargan aún más para constituir la envoltura

nuclear. Los nucléolos comienzan a reaparecer, la cromatina condensa se expande y la mitosis llega a su fin.<sup>76</sup>

### 6.3. DURACIÓN DEL CICLO CELULAR

Este presenta variaciones entre el tipo de célula que sea y entre sus especies (Tabla 9). En células del epitelio humano la duración es de aproximadamente 8 horas mientras que, en otros tipos, la duración puede llegar a ser de días e incluso meses.<sup>67, 77, 78</sup>

Existen 3 tipos de células básicamente en el organismo: la primera clase que tiene una alta especialización estructural, pero que una vez que maduran, pierden la capacidad para dividirse. La segunda clase que normalmente no pueden dividirse, pero pueden iniciar el ciclo celular en respuesta a un determinado estímulo. La tercera clase que poseen un alto nivel de división celular, tales como células epiteliales, entre otras.<sup>67, 77, 78</sup>

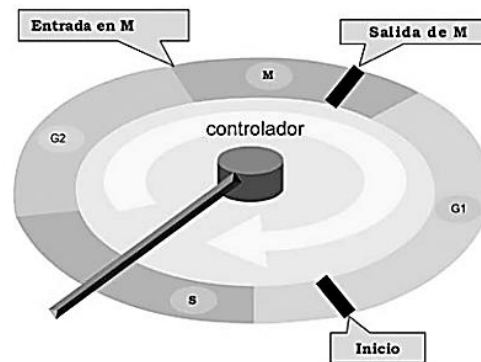
**Tabla 9.** Duración del ciclo celular

INTERFASE			MITOSIS
G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	M
5 horas	7 horas	3 horas	1 hora
MITOSIS			
Profase	Metafase	Anafase	Telofase
36 minutos	3 minutos	3 minutos	18 minutos

*Fuente: Elaboración propia.*

### 6.4. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Como todo proceso, este también tiene fases como la síntesis de ADN, la mitosis y la citocinesis, las cuales están reguladas por el sistema de control



**Figura 19.** Regulación del ciclo celular

central del ciclo celular, el cual, es un dispositivo bioquímico que actúa de manera cíclica (Figura 19). En el ciclo celular, este sistema está regulado por unos factores de retraso, los cuales pueden detener el ciclo en puntos determinados.<sup>67, 78, 79</sup>

#### 7. PROTEÍNA CICLINA D1

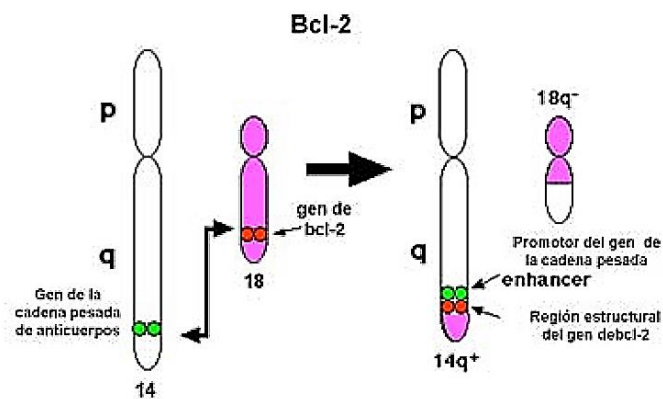
Tienen un papel en el control del ciclo celular. Las ciclinas D involucradas directamente en la fase G<sub>1</sub>/S. La prevalencia, significado biológico e impacto pronóstico de la expresión de Ciclina D1 en carcinoma de células renales es controvertido.<sup>80</sup>

Una alteración en las vías de control, pueden llevar a un proceso de oncogénesis. Un ejemplo muy observado es el de la mutación de ciclinas D1, el cual se expresa fuertemente en retina, afectando el retinoblastoma. En tumores como el de mama se da sobreexpresión de la Ciclina D1.<sup>81, 82</sup>

Esta sobreexpresión ha sido correlacionada con el aumento de inestabilidad cromosomal.<sup>83</sup> Una falla en la regulación en el mecanismo de control del ciclo celular lleva a una proliferación celular excesiva y como consecuencia a la aparición del cáncer.<sup>84</sup>

#### 8. PROTEÍNA BCL-2

La proteína Bcl-2 fue originalmente descubierta como el oncogén responsable del linfoma folicular humano de células B producido por translocación cromosomal 14:18, el cual produce una yuxtaposición entre el locus de Bcl-2 en el cromosoma 18 con la cadena pesada de la inmunoglobulina J del cromosoma 14.<sup>85</sup> (Figura 20)



**Figura 20.** Translocación 14:18 (según lo propuesto por Tsujimoto y colaboradores, 1987)

Desde hace años se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 no induce proliferación celular, por lo contrario, retarda ya que prolonga la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular<sup>86</sup> e incluso detener el proceso, lo cual es conocido como senescencia replicativa.<sup>87, 88</sup>

Bcl-2 es una proteína de supervivencia celular lo que permite que en altos niveles de dicha proteína, esta hará de todo para mantenerse viva induciendo sistemas de defensa, e incluso, detendrá el programa de muerte apoptótico. Por ende esto hace que para nosotros, la proteína Bcl-2 sea un arma de doble filo ya que no es un efecto deseable en células que contengan mutaciones, como en el caso de células cancerígenas.<sup>87, 88</sup>

Los mecanismos por los cuales Bcl-2 realiza la supervivencia, en la cual previene la muerte apoptótica, son la participación en el ciclo celular e inducción de sistemas antioxidantes.<sup>88</sup>

La familia de Bcl-2 se divide en dos grupos, el primero de ellos, conformado por las proteínas pro-apoptóticas que incluye a BAX, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad, Hrk, entre otros; en el segundo grupo tenemos a las proteínas anti-apoptóticas, en las cuales tenemos Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1, mcl-1, etc.<sup>89</sup>

Se ha reportado también que Bcl-2 no solo participa en la inducción del estado quiescente, sino que también en el estado senescente. La senescencia es aquel estado en el cual las células detienen su ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, lo cual las imposibilita de poder continuar su división celular.<sup>90</sup>

## 9. PROTEÍNA BAX

BAX es un componente clave para la apoptosis celular inducida a través del estrés mitocondrial.<sup>91</sup> Tras la estimulación de la apoptosis, BAX forma oligómeros y se transloca desde el citosol a la membrana mitocondrial.<sup>92</sup> A través de las interacciones con proteínas de poro en la membrana mitocondrial, BAX aumenta la permeabilidad de la membrana, lo que conduce a la liberación de citocromo c de la mitocondria, la activación de caspasa-9 y la iniciación de la vía de activación de la caspasa para la apoptosis.<sup>93</sup>





# **CAPÍTULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIALES

#### 1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

##### 1.1.1. CACO-2

Se utilizó la línea celular Caco-2 (ATCC®), las cuales fueron adquiridas y posteriormente criopreservadas a una temperatura de -200°C en una cámara de nitrógeno líquido (VWR® CryoPro® Rack Systems, BR Series Promotion Packages), en los laboratorios de investigación de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University*, Boston, USA.

Días después las células se incubaron en el medio de cultivo indicado, en condiciones óptimas para su proliferación.

##### 1.1.2. HEPG-2

Se utilizó la línea celular HepG-2 (ATCC®), las cuales fueron proporcionadas por Alejandro Rondón Ortiz, MSc. ya se encontraban en uso (pasaje 5), almacenadas en una incubadora (VWR® symphony™ Air-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubators, Models 5.3A and 8.5A) a una temperatura de 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, en los laboratorios de investigación de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University*,

#### 1.2. EQUIPOS UTILIZADOS

Para el desarrollo de éste proyecto se utilizó cámaras de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2) (Figura 21), incubadora con fuente de CO<sub>2</sub> (VWR® symphony™ Air-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubators, Models 5.3A and 8.5A), cámara de nitrógeno líquido (VWR® CryoPro® Rack Systems, BR Series Promotion Packages), microscopio invertido (Olympus®, CKX31), contador celular (Nexelom Bioscience®, Cellometer® Auto T4), centrífuga (Clay Adams™ DYNAC® III Centrifuge, Model 420104), baño térmico de perlas metálicas (Lab Armor®, Bead Bath™ Model 74300-706), lector de microplatos

(BioTek<sup>®</sup>, Synergy<sup>™</sup> microplates), fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad<sup>®</sup>, PowerPac<sup>™</sup> HC High-Current Power Supply), cámara de electroforesis (Bio-Rad<sup>®</sup>, Criterion<sup>™</sup> Vertical Electrophoresis Cell), sistema de transferencia (Bio-Rad<sup>®</sup> Trans-Blot<sup>®</sup>, Turbo<sup>™</sup> transfer system), microcentrífuga (Fisher Scientific<sup>®</sup>, Eppendorf<sup>™</sup> 5424R Microcentrifuges), lector de membrana (Li-Cor<sup>®</sup>, C-DiGit<sup>®</sup> Blot Scanner), incubadora de microplatos (VWR<sup>®</sup>, Signature<sup>™</sup> Incubating/Cooling Shaker) y sonicador de punta Branson (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>).



**Figura 21.** Cámaras de flujo laminar Clase II Tipo A2.

### 1.3. REACTIVOS

Los reactivos utilizados durante el desarrollo del trabajo de investigación como medios de cultivo fueron Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC<sup>®</sup> 30-2003<sup>™</sup>) para células Caco-2 y Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) (ATCC<sup>®</sup> 30-2002<sup>™</sup>) para células HepG-2. Penicilina-Estreptomicina (Penicilina 10,000I.U/mL - Estreptomicina 10,000ug/mL) (ATCC<sup>®</sup> 30-2300), suero fetal de bovino (FBS) (ATCC<sup>®</sup> 30-2020), Tripsina-EDTA (0.25% tripsina/0.53mM EDTA) (ATCC<sup>®</sup> 30-2101).

Para el conteo celular se utilizó la solución Azul de Tripán 0.4% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, T8154).

Las drogas utilizadas fueron Dilauril fosfatidilcolina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, P1534 Sigma, 1,2-Didodecanoyl-glycero-3-phosphocholine, DLPC) y el Antagonista LRH-1 (EMD Millipore<sup>®</sup> 505601, 1-(3'-(1-(2-(4-

Morpholinyl)ethyl)-1H-pyrazol-3-yl)-3-biphenyl)ethanone (LRH-1 Antagonist) , cuyos disolventes fueron etanol absoluto 200 proof grado Biología molecular (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Fisher BioReagents<sup>™</sup>) y dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, D4540) respectivamente.

Para la viabilidad celular se utilizó el reactivo MTS (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin).

En el proceso del ensayo de Western-Blot se utilizó M-PER (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Fisher BioReagents<sup>™</sup>) para producir lisis y Cockteil (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Fisher BioReagents<sup>™</sup>) inhibidor de proteasas, reactivos BCA (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Fisher BioReagents<sup>™</sup>), SDS-Sample Buffer 4X reducing (Boston BioProducts<sup>®</sup>, BP-110R), PBS 1X (Corning<sup>®</sup>), TBS-Tween 20X (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Fisher BioReagents<sup>™</sup>), buffer tris-glicina SDS 10X (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Fisher BioReagents<sup>™</sup>), gel de tris glicina 10% (Thermo Scientific<sup>®</sup>), ladder (PageRuler<sup>™</sup> Unstained Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>), leche en polvo sin calorías (Boston BioProducts<sup>®</sup>), membrana de nitrocelulosa 0.45 $\mu$ m (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>), papel filtro de Western-Blot (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>), anticuerpos primarios de conejo LRH-1 (Anti-NR5A2/LRH-1 antibody [EPR7000] (ab125034), ABCam<sup>®</sup>), Ciclina D1 (Anti-Cyclin D1 antibody [EPR2241] (ab134175), ABCam<sup>®</sup>), Bcl-2 ((sc-492) Bcl-2 antibody (N-19), CiteAb<sup>®</sup>) y BAX (Anti-Bax antibody [E63] (ab32503), ABCam<sup>®</sup>), anticuerpo primario de  $\beta$ -actina (Anti-beta Actin antibody [AC15] (HRP) (ab49900), ABCam<sup>®</sup>), anticuerpo secundario cabra anti-conejo (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab97051), ABCam<sup>®</sup>), substrato químicoluminiscente (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) y buffer stripping WB PLUS (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>).

#### 1.4. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Post-Grado de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University* (MCPHS), Boston, USA. (Figura 22)



**Figura 22.** Laboratorio Post-Grado MCPHS.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. CULTIVO CELULAR

El proceso de cultivo celular se realizó en una cámara de flujo laminar bajo condiciones estériles e inhibiendo la proliferación microbiana con etanol 70%.

#### 2.1.1. CACO-2

Ésta línea celular, contenida en un vial, se extrajo de la cámara de nitrógeno líquido ( $-200^{\circ}\text{C}$ ) para luego ser acondicionado a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño térmico de perlas metálicas y posterior a esto se llevó a cabo su reconstitución y transferencia a un frasco de incubación ( $75\text{cm}^2$ ) con Eagle's Minimun Essential Medium (EMEM) al cual se agregó previamente 1% de Penicilina-Estreptomicina (10,000I.U/mL Penicilina-10,000ug/mL Estreptomicina) y 20% de suero fetal de bovino (FBS). Las células en el frasco fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de siete días, se evidenció las formas desarrolladas de las células, siendo éste el pasaje uno.

Para generar un nuevo pasaje se desechó el medio de cultivo del frasco de incubación, seguidamente se enjuagó con 10mL de una solución salina buffer de fosfato estéril (PBS) y se dejó reposar por dos minutos, posterior a éste tiempo se desechó. Luego fueron agregados 7mL de Tripsina-EDTA (0.25% tripsina/0.53mM EDTA) y se incubó por siete minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Culminado el tiempo

el frasco fue extraído de la incubadora y se realizó una agitación ligera, se continuó el proceso en la cámara de flujo, donde la tripsina fue extraída con una pipeta volumétrica y transferida a un tubo Falcon. A continuación, fue centrifugado a 1000rpm por cinco minutos, terminado esto, se decantó el sobrenadante (medio de cultivo), quedándonos sólo con el pellet, el cual fue resuspendido con 2mL de Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM).

### 2.1.2. HEPG-2

Ésta línea celular fue recepcionada en el pasaje 5, la cual se encontraba almacenada en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para generar un nuevo pasaje se desechó el medio de cultivo del frasco de incubación (75cm<sup>2</sup>), seguidamente se enjuagó con 10mL de una solución salina buffer de fosfato estéril (PBS) y se dejó reposar por dos minutos, posterior a éste tiempo se desechó. Luego fueron agregados 5mL de Tripsina-EDTA (0.25% tripsina/0.53mM EDTA) y se incubó por siete minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Culminado el tiempo el frasco fue extraído de la incubadora y se realizó una agitación ligera, se continuó el proceso en la cámara de flujo, donde la tripsina fue extraída con una pipeta volumétrica y transferida a un tubo Falcon. A continuación, fue centrifugado a 1000rpm por cinco minutos, terminado esto, se decantó el sobrenadante (medio de cultivo), quedándonos sólo con el pellet, el cual fue resuspendido con 2mL de Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM), al cual se agregó previamente 1% de Penicilina-Estreptomicina (10,000I.U/mL Penicilina-10,000ug/mL Estreptomicina) y 10% de suero fetal de bovino (FBS).

## 2.2. CONTEO CELULAR

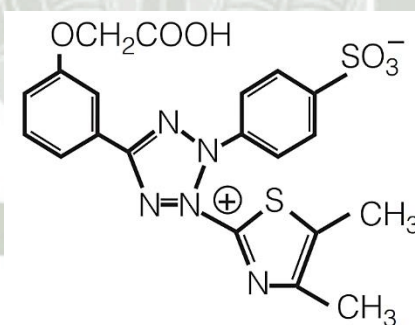
Es la evaluación de una población celular que sirve como un procedimiento de control para establecer el momento óptimo de utilización de las células. Entre las técnicas más clásicas tenemos el ensayo con Azul de Tripán, siendo

este un ensayo rápido y sencillo dándole como desventaja la poca sensibilidad.<sup>94</sup>

A partir de la resuspensión del pellet se realizó el recuento celular, fueron tomados 30µL de la resuspensión de células y 30µL de reactivo Azul de Tripán, se homogenizó y posterior a esto se tomó 20µL para agregar a una cámara de conteo que luego fue insertada al contador celular y por medio del software Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter se obtuvo la cantidad de células vivas/mL junto a un porcentaje de viabilidad >90% en células Caco-2 y >95% en células HepG-2.

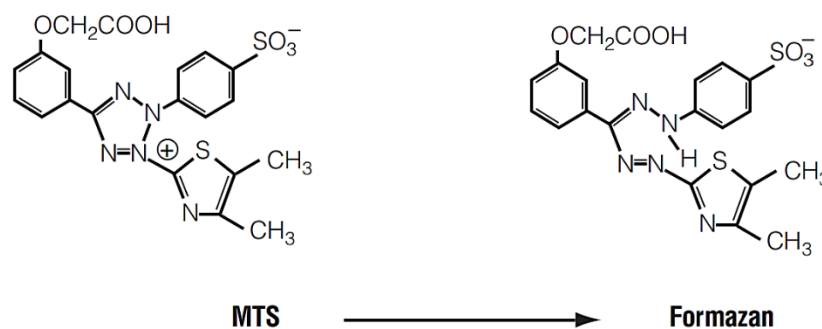
### 2.3. VIABILIDAD CELULAR

Es la evaluación de la cantidad de células viables después de aplicar procedimiento. El MTS es un método colorimétrico que nos permite determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El reactivo está compuesto por tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Figura 23) junto a un electrón acoplado (fenazina etosulfato, PES).<sup>95</sup>



**Figura 23.** Estructura de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

El compuesto tetrazolio MTS es biorreducido por células en un producto formazano el cual es soluble en medio de cultivo (Figura 24).<sup>95</sup>



**Figura 24.** Reducción del MTS en un producto formazano.

En relación a la concentración de células vivas obtenidas en el recuento celular se realizaron los cálculos respectivos para determinar las células por pocillo en platos de 96 pocillos, las cuales fueron agregadas en diferentes concentraciones ( $5 \times 10^3$ ,  $10 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $20 \times 10^3$  células/pocillo) y por quintuplicado (Tabla 10).

**Tabla 10.** Diluciones de las células para elección de células (a partir de  $1 \times 10^6$  células/mL).

Células/pocillo	Resuspensión de Células	Medio de Cultivo
$5 \times 10^3$	50 $\mu$ L	1950 $\mu$ L
$10 \times 10^3$	100 $\mu$ L	1900 $\mu$ L
$15 \times 10^3$	150 $\mu$ L	1850 $\mu$ L
$20 \times 10^3$	200 $\mu$ L	1800 $\mu$ L

**Fuente:** Elaboración propia.

Se dejó incubar por 24h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se añadió 10 $\mu$ L/pocillo del reactivo MTS, luego se incubó por 3h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, terminado el tiempo se realizó la lectura en el lector de microplatos a 490nm por medio del software Gen 5 Microplate Reader. Todo ello se realizó con el fin de conocer la concentración

óptima, en relación a la curva de regresión lineal obtenida entre los datos de las concentraciones y sus absorbancias, para la posterior aplicación del tratamiento.

## 2.4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Para la preparación de las soluciones de trabajo aplicadas en el tratamiento, se preparó una solución stock de cada droga.

### 2.4.1. DLPC

Para la preparación de la solución stock a concentración de 10mM se pesó 9.3mg de DLPC y se diluyó con 1.4956mL de etanol, a partir de ésta se preparó las soluciones de trabajo a concentraciones de 20, 60, 200, 600, 2000 y 6000  $\mu$ M. Como solvente se utilizó etanol grado Biología molecular.

$$\frac{9.3 \text{ mg}}{1.4956 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mmol}}{621.83 \text{ mg}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 10 \text{ mM}$$

### 2.4.2. ANTAGONISTA LRH-1

Para la preparación de la solución stock a concentración de 50mM se pesó 25mg de Antagonista-LRH-1 y se diluyó con 1.3317mL de DMSO, a partir de ésta se preparó las soluciones de trabajo a concentraciones de 20, 60, 200, 600, 2000 y 6000  $\mu$ M. Como solvente se utilizó DMSO.

$$\frac{25 \text{ mg}}{1.3317 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mmol}}{375.46 \text{ mg}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 50 \text{ mM}$$

## 2.5. APLICACIÓN DE TRATAMIENTO

### 2.5.1. PARA VIABILIDAD

Posterior a la incubación (24h) de la cantidad de células requeridas, se retiró el medio de los pocillos y luego se procedió a la aplicación del

tratamiento con las drogas previamente incluidas en el medio de cultivo a concentraciones de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30  $\mu\text{M}$ . Se realizó un vehículo y un blanco de cada droga, donde el vehículo en lugar de contener la solución de trabajo se agregó el solvente y se mezcló con el medio de cultivo, mientras que en el blanco solo se agregó medio de cultivo. Todo esto se aplicó en ambas líneas celulares.

#### 2.5.2. PARA LISIS CELULAR

Posterior a la incubación (24h) de la cantidad de células requeridas, se retiró el medio de los frascos, se enjuagó con 5mL PBS y luego se procedió a la aplicación del tratamiento con las drogas previamente incluidas en el medio de cultivo. Se realizó un vehículo de cada droga, donde el vehículo en lugar de contener la solución de trabajo se agregó el solvente y se mezcló con el medio de cultivo. Todo esto se aplicó en ambas líneas celulares.

#### 2.6. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO

Transcurrido el tiempo de incubación con el tratamiento, se extrajo el medio de los pocillos y se agregó 10 $\mu\text{L}$ /pocillo del reactivo MTS, mezclados previamente con 190  $\mu\text{L}$  de medio/pocillo. Para el vehículo, se agregó el reactivo MTS mezclado con medio, mientras que al blanco solo fue medio de cultivo. Se dejó incubar por 3h a 37°C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , luego se realizó la cuantificación en el lector de microplatos a 490nm por medio del software Gen 5 Microplate Reader. Todo esto se aplicó en ambas líneas celulares.

#### 2.7. LISIS CELULAR

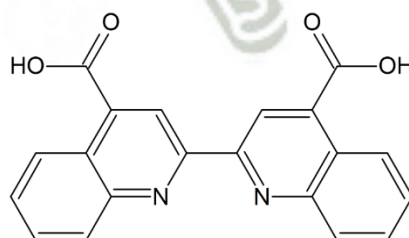
Es un proceso de ruptura de la membrana celular lo cual permite obtener los componentes intracelulares, proteínas, ácidos nucleicos y demás para su posterior análisis. Todas las células poseen una capa de fosfolípidos que tienen embebidas las proteínas de membrana.<sup>96</sup> La lisis por medio de detergentes (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent<sup>®</sup>) es una manera de romper la

membrana celular. Estas actúan rompiendo la capa de fosfolípidos, interrumpiendo la unión de lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína.<sup>97</sup> Este reactivo extrae proteínas citoplasmáticas y nucleares de manera rápida, suave y eficiente utilizando un detergente patentado en tampón de bicina a 25mM (pH 7.6), es muy beneficioso ya que la composición simple de este reactivo es compatible con todo tipo de ensayo.<sup>97</sup>

Luego de observarse un buen crecimiento de las células con tratamiento en los frascos de cultivo, se removió el medio de cultivo y enjuagó dos veces con 1mL de PBS refrigerado (5°C), seguidamente se preparó una solución con 5mL de la solución detergente buffer de lisis celular M-PER<sup>®</sup> (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher<sup>®</sup>), al cual se le agregó 50μL de cocktail (inhibidor de proteasa y fosfatasa) y 50μL de EDTA 0.5M, las cantidades que se agregaron por frasco fueron 400μL para Caco-2 y para células HepG-2, se utilizó un rastrillo para desprender las células adheridas a la base de los frascos, se colocó sobre hielo y rápidamente se extrajo las células con una micropipeta, éstas fueron transferidas a tubos Eppendorff y colocadas inmediatamente en hielo, a continuación se sonicó por 5 segundos y luego se dejó reposar por 5 minutos en hielo, este proceso se repitió tres veces. A continuación, se llevó a centrifugar a 14000rpm por 10 minutos. Culminado el tiempo se extrajo el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorff. Su almacenamiento fue a una temperatura de -80°C.

## 2.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Existen diferentes métodos para cuantificar la concentración de proteínas, ya sea por determinación de absorbancia o formando complejos coloreados.<sup>98</sup>

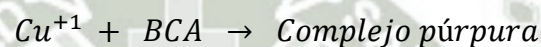


**Figura 25.** Ácido bicinónico.

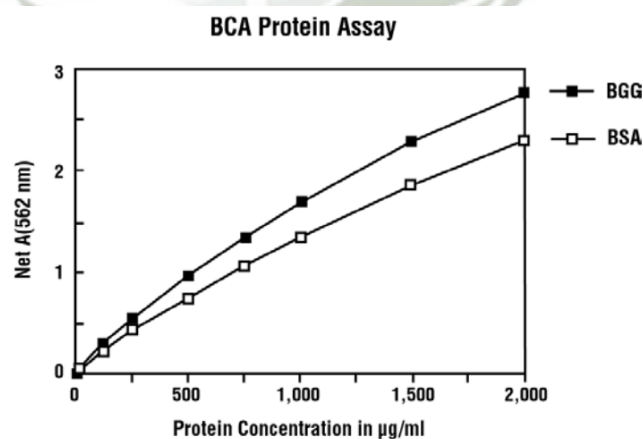
BCA es un método altamente sensible cuya formulación con detergentes está basado en el ácido bicinconínico (BCA) (Figura 25). Este ensayo combina la reacción con  $\text{Cu}^{+2}$  produciendo  $\text{Cu}^{+1}$  en forma alcalina.<sup>99</sup>

### 2.8.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

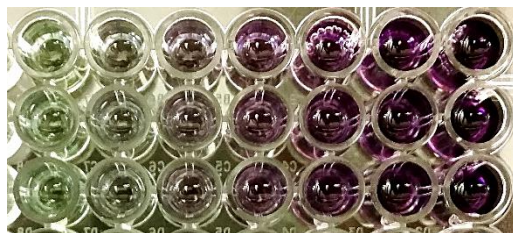
El color púrpura de este ensayo se produce por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso, lo que permite realizar una comparación en la curva de calibración a través de la medición de absorbancias (Figura 26). Este complejo evidencia una gran absorbancia a 562 nm.<sup>99</sup>



Para la curva de calibración se usaron siete concentraciones 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de un estándar de albúmina. Una vez preparados, se agregó 20  $\mu\text{L}$ /pocillo, luego se adicionó una mezcla de 180  $\mu\text{L}$ /pocillo de reactivo A y reactivo B (50:1) (BCA). La cuantificación se hizo en el lector de microplatos Synergy a una longitud de onda de 562nm y por triplicado. Se realizó una curva para cada línea celular. (Figura 27)



**Figura 26.** Curva de Calibración de BSA (Albúmina de suero bovino)



**Figura 27.** Pocillos con concentraciones de albúmina de 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 $\mu$ g/mL por triplicado para la curva de calibración.

*Fuente: Elaboración propia.*

### 2.8.2. MUESTRA

Del sobrenadante obtenido en la lisis celular se realizó una dilución 1:10 para células Caco-2, para lo cual se tomó 10 $\mu$ L del sobrenadante y se agregó 90 $\mu$ L de PBS; para células HepG-2 se realizó una dilución 1:5 por lo cual se tomó 20 $\mu$ L del sobrenadante y se agregó 80 $\mu$ L de PBS. Esto se realizó para cada droga con su respectivo vehículo. Luego se agregó 20 $\mu$ L/pocillo de cada dilución y 180 $\mu$ L/pocillo de la mezcla de reactivo A y reactivo B (50:1) (BCA). La cuantificación se hizo en el lector de microplatos Synergy a una longitud de onda de 562nm y por triplicado.

### 2.9. WESTERN BLOT

La electroforesis es una técnica que consiste en la separación de moléculas, existen dos tipos, vertical (Western-Blot) y horizontal. La horizontal se lleva a cabo en un gel de agarosa para ácidos nucleicos y la migración de la muestra es diferente a la electroforesis vertical, siendo de izquierda a derecha (cátodo a ánodo).<sup>100</sup> Por otro lado, Western-Bot es una técnica que sirve para la detección y cuantificación específica de proteínas en una mezcla de proteínas presentes en las células.<sup>101, 102</sup> Esta técnica consiste en la transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida Sodio Dodecil Sulfato (SDS) a una membrana absorbente de Nitrocelulosa, siendo esta última una copia exacta de la membrana que fue sometido a una electroforesis para realizar la separación de proteínas.<sup>103</sup> La membrana es incubada con dos anticuerpos, uno primario que es el que se une a la proteína en sí y otra secundaria, que se une al anticuerpo primario.<sup>104</sup>

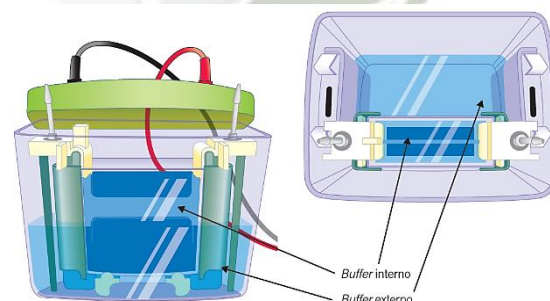
### 2.9.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez realizado el BCA y obtenidas las concentraciones de las proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ), se realizó los cálculos haciendo uso de estas concentraciones, en donde la concentración de proteínas a preparar para las muestras de células Caco-2 fue de  $1000\mu\text{g/mL}$  y de células HepG-2 fue de  $500\mu\text{g/mL}$ , excepto la muestra con DLPC que fue de  $400\mu\text{g/mL}$ . En la preparación de las muestras para WB el 25% fue de SDS-BIS (del volumen total) y el restante con PBS. Se vortexeó y llevó a una temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  a  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

### 2.9.2. ELECTROFORESIS

Las proteínas al unirse al SDS crean complejos cargados negativamente. La cantidad de SDS unida a la proteína desnaturalizada es proporcional al peso molecular de estas mismas. Todo esto permite que al aplicar corriente, el complejo que formamos (SDS-proteína), el cual está cargado negativamente, migre por el gel de poliacrilamida en base al tamaño del polipéptido.<sup>105</sup>

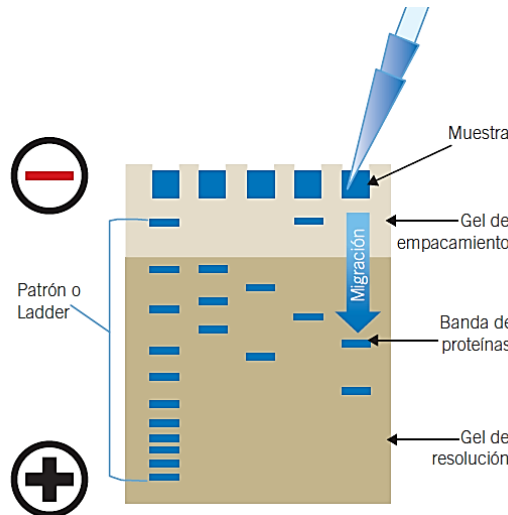
El gel debe estar entre dos placas rectangulares de vidrio donde la corriente se generara por medio del buffer en el que se encuentra embebido el gel y llena los compartimientos del ánodo y cátodo.<sup>99</sup> (Figura 28).



**Figura 28.** Electroforesis vertical.

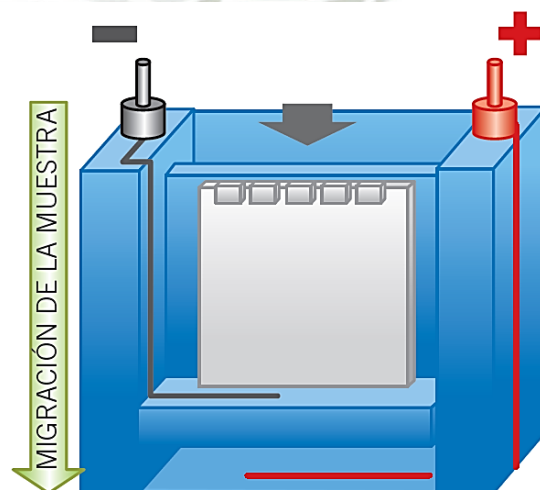
Se diluyó la solución de running buffer de 10X a 1X, para ser vertida en la cámara de electroforesis (Figura 28). Se colocó el cassette que contenía el gel de poliacrilamida 7.5%. Se realizó un diseño con el

orden y volumen de las muestras, el cual puede visualizarse en el Anexo I, luego se procedió a agregar 5 $\mu$ L de ladder (marcador de referencia de proteínas) en dos pocillos, 20 $\mu$ L de Caco-2 y 40 $\mu$ L de HepG-2 de cada muestra (vehículo de DLPC, vehículo de Antagonista LRH-1 y Antagonista LRH-1) excepto en la muestra con DLPC que fue 50 $\mu$ L, obteniendo una concentración de 20 $\mu$ g/mL en cada pocillo. (Figura 29).



**Figura 29.** Electroforesis de Proteínas

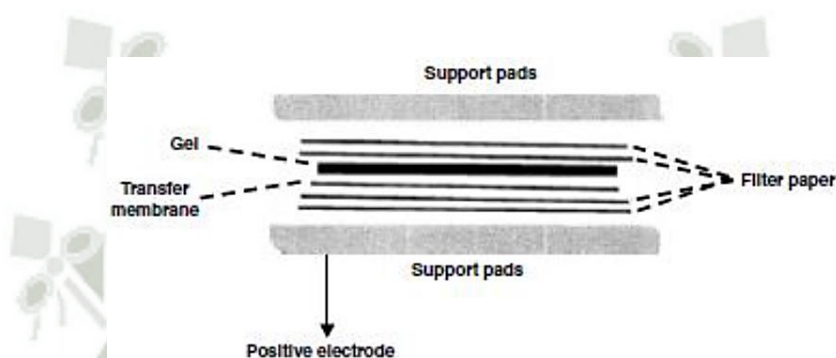
Se cerró la cámara electroforética con sus electrodos correspondientes, se conectó a una fuente de poder y se configuró a 125V por 45 minutos y corrieron las muestras. (Figura 30)



**Figura 30.** Cámara de electroforesis vertical

### 2.9.3. ELECTROTRANSFERENCIA

Es la técnica más utilizada para transferir proteínas de un gel de poliacrilamida a una MNC, después de que la electroforesis haya terminado. Esta transferencia sigue el modelo de montaje de tipo sándwich (Figura 31). La velocidad y eficacia de esta técnica indican una gran ventaja respecto a otras técnicas de mismo uso como son por difusión o al vacío.<sup>103</sup>



**Figura 31.** Montaje del sándwich para transferencia de gel a membrana

Terminada la electroforesis, se acondicionó dos filtros y una membrana de nitrocelulosa 0.45  $\mu\text{m}$ , sumergidos en buffer de transferencia. Se retiró el cassette de la cámara y fue sumergido en buffer de transferencia. Luego se abrió el cassette con una espátula y se colocó uno de los filtros sobre el gel, luego la membrana en contacto con el gel, para quitar las burbujas se pasó un rodillo y el segundo filtro. Seguidamente se transfirió el “sándwich” (Figura 31) al equipo de Transblot con el lado de la membrana hacia abajo y se configuró a 1.3A, 25V por 7 minutos.

### 2.9.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Terminada la transferencia, se enjuagó la membrana en Tbs-t (buffer de lavado 1X), se lavó 2 veces por 5 minutos, luego se bloqueó la membrana con 15mL de leche 5% por 1 hora, luego se agregó 10mL de anticuerpo primario de LRH-1 (1:10 000) y guardó a 4°C por 12 horas.

Transcurrido el tiempo, se retiró la solución con anticuerpo primario y añadió el anticuerpo secundario (cabra anticonejo) 5uL en 10mL de leche durante 1 hora a temperatura ambiente en el plato mezclador, terminado esto, fue lavado 2 o 3 veces por 5 minutos con Tbs-t y se añadió 6mL de substrato A:B (1:1), se dejó por 5 minutos y finalmente se realizó la lectura de la membrana en el escáner.

#### 2.9.5. STRIPPING

Esta técnica se basa en “borrar” el Western Blot para volverlo a hibridar, teoría propuesta por Kaufmann e.t al. 1987.<sup>106</sup> Existen diferentes tampones que cumplen dicha función, el cual consiste en retirar de la membrana los anticuerpos manteniendo las proteínas de interés adheridas a la membrana en condición de poder ser incubadas con nuevos anticuerpos.<sup>105</sup>

Para realizar el stripping en las membranas de nitrocelulosa, primero se lavó la membrana con TBS tres veces, luego se agregó 5mL del buffer de stripping inmerso con la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se removió el buffer y se enjuagó con TBS tres veces, seguidamente se bloqueó la membrana con la dilución de leche 5% por 1 hora, luego se repitió el procedimiento de agregar 10mL de otro anticuerpo primario como la Ciclina D1 (1:50 000), se guardó a 4°C por 12 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución con anticuerpo primario y añadió el anticuerpo secundario (cabra anticonejo) 5uL en 10mL de leche durante 1 hora a temperatura ambiente en el plato mezclador, terminado esto, fue lavado 2 o 3 veces por 5 minutos con Tbs-t y se añadió 6 mL del substrato A:B (1:1), se dejó por 5 minutos y finalmente se realizó la lectura de la membrana en el escáner. El mismo proceso se realizó con Bcl-2 (1:500), Bax (1:5000). En el caso del anticuerpo primario de  $\beta$ -Actina (1:10 000), no se le agregó anticuerpo secundario y se pasó a agregar directo 6mL del sustrato A:B (1:1) previamente enjuagado 3 veces por 5 minutos con Tbs-t.

## 2.10. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los resultados presentados en esta tesis, fueron expresados como media  $\pm$  CI y como media  $\pm$  DS. Para las pruebas de significancia estadística fue usado el análisis de varianza ANOVA junto a un posterior análisis con el test de Dunnett, el cual fue utilizado para realizar comparaciones múltiples con el respectivo vehículo a un  $p < 0.05$ . Todo esto fue realizado por el software estadístico GraphPad Prisma 6.





# **CAPÍTULO III**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CONTEO CELULAR

#### 1.1. CÉLULAS CACO-2

**Tabla 11.** Número de células Caco-2 contadas en el Cell Counter.

	CANTIDAD DE CÉLULAS (células/mL)	VIABILIDAD (%)
<b>Primera Lectura</b>	5.77 x 10 <sup>6</sup>	97.7
<b>Segunda Lectura</b>	5.82 x 10 <sup>6</sup>	98.7
<b>Tercera Lectura</b>	6.40 x 10 <sup>6</sup>	98.4
<b>Cuarta Lectura</b>	5.36 x 10 <sup>6</sup>	96.3
<b>Quinta Lectura</b>	5.75 x 10 <sup>6</sup>	97.5
<b>PROMEDIO</b>	<b>5.82 x 10<sup>6</sup></b>	<b>97.7</b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Posterior a la resuspensión de células (7 días), se realizó el conteo de las células en el cual el desarrollo de la línea celular fue el óptimo, obteniendo una viabilidad media de 97.7% y una cantidad celular media de 5.82 x 10<sup>6</sup> células, de cinco lecturas realizadas (Tabla 11); esto se debe a que las condiciones brindadas fueron las adecuadas, además que el medio selectivo EMEM al contener mayor cantidad de FBS favoreció la alimentación de éstas y por ende su desarrollo, a pesar que el desarrollo de éstas células es lento en comparación de las células HepG-2.

#### 1.2. CÉLULAS HEPG-2

**Tabla 12.** Número de células HepG-2 contadas en Cell Counter

	CANTIDAD DE CÉLULAS (células/mL)	VIABILIDAD (%)
<b>Primera Lectura</b>	9.29 x 10 <sup>6</sup>	96.7
<b>Segunda Lectura</b>	9.26 x 10 <sup>6</sup>	97.1
<b>Tercera Lectura</b>	9.01 x 10 <sup>6</sup>	96.3
<b>Cuarta Lectura</b>	9.46 x 10 <sup>6</sup>	98.8
<b>Quinta Lectura</b>	9.35 x 10 <sup>6</sup>	98.4
<b>PROMEDIO</b>	<b>9.27 x 10<sup>6</sup></b>	<b>97.5</b>

*Fuente: Elaboración propia.*

Obtenidas las células en el pasaje 5, se procedió a realizar el conteo de éstas, donde el desarrollo de la línea celular fue el óptimo, obteniendo una viabilidad media de 97.5% y una cantidad celular media de  $9.27 \times 10^6$  células, de cinco lecturas realizadas (Tabla 12); lo cual se debe a que las condiciones brindadas fueron las adecuadas, además que el medio selectivo DMEM favoreció la alimentación de éstas y por ende su desarrollo, dado que el crecimiento de éstas células es rápido en comparación de las células Caco-2, no necesitaron mayor cantidad de FBS.

Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar si la cantidad de células sembradas en los frascos se encontraban en condiciones óptimas de crecimiento para comenzar con el desarrollo del estudio, el cual fue positivo en ambos casos; no obstante, otro factor que permitió la obtención de datos poco variados fue el corto tiempo de exposición al reactivo azul de tripán, ya que a mayor exposición éste produce toxicidad en las células, produciendo así lecturas muy variadas.

## 2. VIABILIDAD CELULAR (ELECCIÓN DE CÉLULAS)

### 2.1. CÉLULAS CACO-2

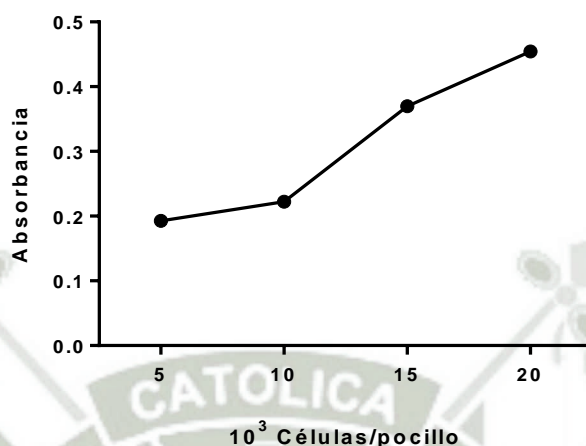
**Tabla 13.** Absorbancias de células Caco-2 a diferentes concentraciones de células.

	Células/pocillo			
	$5 \times 10^3$	$10 \times 10^3$	$15 \times 10^3$	$20 \times 10^3$
<b>Absorbancia</b>	0.1926	0.2224	0.3698	0.4544

*Fuente: Elaboración propia.*

Sembradas las células en los pocillos a diferentes concentraciones, posterior a un periodo de incubación de 24 horas (tiempo óptimo en el que las células se encuentran adheridas en su totalidad a la base de los pocillos) y a la aplicación del reactivo MTS, las lecturas de las absorbancias obtenidas por el lector de microplatos Synergy se puede observar en el Anexo II, de las cuales de acuerdo a la media de las absorbancias (Tabla 13), se decidió elegir la concentración de  $10 \times 10^3$  células/pocillo, ya que como se muestra en la curva de calibración (Figura 32) a esta concentración de células la absorbancia

obtenida no es muy elevada ni muy baja, por tanto consideramos que fue la óptima para que al realizar la aplicación de las drogas, las absorbancias que se obtengan sean por efecto de las drogas y no por saturación de las células.



**Figura 32.** Curva de calibración de células Caco-2 para determinar la concentración de células.

## 2.2. CÉLULAS HEPG-2

**Tabla 14.** Absorbancias de células HepG-2 a diferentes concentraciones de células.

	Células/pocillo			
	5 x 10 <sup>3</sup>	10 x 10 <sup>3</sup>	15 x 10 <sup>3</sup>	20 x 10 <sup>3</sup>
Absorbancia	0.1640	0.3054	0.3420	0.3952

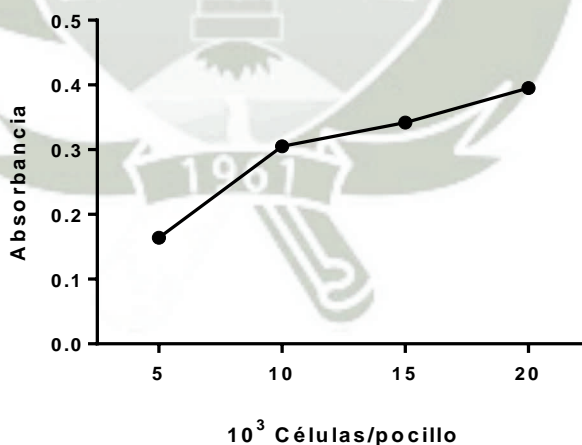
*Fuente: Elaboración propia.*

Una vez sembradas las células a diferentes concentraciones en los pocillos, posterior a 24 horas de incubación (tiempo óptimo en el que las células se adhieren en su totalidad a la base de los pocillos) y a la aplicación del reactivo MTS, las lecturas de las absorbancias obtenidas por el lector de microplatos Synergy pueden observarse en el Anexo III, de las cuales de acuerdo a la media de las absorbancias (Tabla 14), se decidió elegir la concentración de 10000 células/pocillo, ya que como se muestra en la curva de calibración

(Figura 33) a esta concentración de células la absorbancia obtenida no es muy elevada ni muy baja, por tanto consideramos que fue la óptima para que al realizar la aplicación de las drogas, las absorbancias que se obtengan sean por efecto de las drogas y no por saturación de las células.

El motivo por el que se aplicó la técnica de MTS para determinar la cantidad de células de trabajo es debido a la mayor precisión y sensibilidad que presenta en comparación al azul de tripán, no obstante, se debe tener en cuenta que en caso de exceder el periodo de 3 horas de incubación con el reactivo, es muy probable que se produzca la saturación de éste y no permita diferenciar las absorbancias.

Por otro lado en cuanto a la elección de la cantidad de células en relación a las absorbancias obtenidas, no elegimos 5000 células/pocillo por estar al límite y evitar problemas de detección en caso de que el efecto de la droga disminuya en gran tamaño las absorbancias, tampoco elegimos 15 000 ni 20 000 células/pocillo para evitar la posibilidad de que el efecto de la droga aumente en gran tamaño las absorbancias a tal punto que no se pueda diferenciar las absorbancias obtenidas al aplicar diferentes concentraciones de droga.



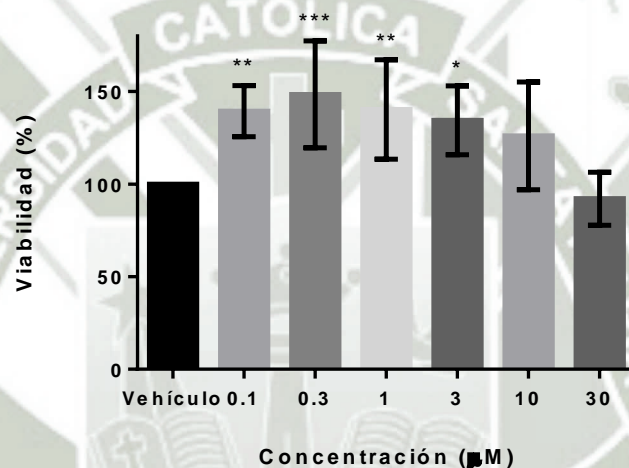
**Figura 33.** Curva de calibración de células HepG-2 para determinar la concentración de células.

3. VIABILIDAD CELULAR (TRATAMIENTO)  
3.1. CÉLULAS CACO-2  
3.1.1. DLPC

**Tabla 15.** Viabilidad de células Caco-2 a diferentes concentraciones de DLPC.

Vehículo	0.1 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$
100%	139%	148%	140%	134%	126%	92%

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 34.** Significancia del efecto de DLPC a diferentes concentraciones en células Caco-2. (n=5;  $p < 0.05$ , diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Una vez aplicado el tratamiento en las células y realizado el ensayo de MTS, se obtuvo la lectura de las absorbancias obtenidas por el lector de microplatos Synergy que pueden observarse en el Anexo IV, seguidamente para proceso de datos se restó la absorbancia del blanco al grupo vehículo y a los grupos expuestos a diferentes concentraciones de DLPC, luego se realizó la comparación entre el vehículo y cada una de las diferentes concentraciones, asumiendo que el vehículo es el

100% de células viables se logró determinar si el efecto de la droga produce incremento o disminución en la proliferación celular.

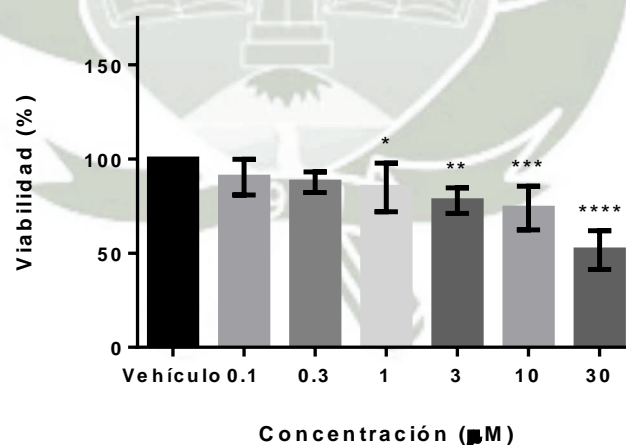
Es por ello que se logró evidenciar incrementos significantes de 139% de la proliferación a 0.1 $\mu$ M, de 148% a 0.3  $\mu$ M, de 140% a 1 $\mu$ M y de 134% a 3 $\mu$ M (Tabla 15) obteniendo un pico máximo a concentración de 0.3 $\mu$ M (Figura 34). No obstante, también se evidenció un incremento de 126% de la proliferación a concentración de 10 $\mu$ M y una disminución de 92% de la proliferación a concentración de 30 $\mu$ M, pero no fueron significantes al ser comparadas con el vehículo (Tabla 15) (Figura 34).

### 3.1.2. ANTAGONISTA LRH-1

**Tabla 16.** Viabilidad de células Caco-2 a diferentes concentraciones de Antagonista LRH-1.

Vehículo	0.1 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M
100%	90%	88%	85%	78%	74%	52%

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 35.** Significancia del efecto del Antagonista LRH-1 a diferentes concentraciones en células Caco-2. (n=5; p<0.05, diferencias significantes respecto al vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Aplicado el tratamiento en las células y realizado el ensayo de MTS, se hizo la lectura de las absorbancias obtenidas por el lector de microplatos Synergy que pueden observarse en el Anexo V, seguidamente para procesar los datos se restó la absorbancia del blanco al grupo vehículo y a los grupos expuestos a diferentes concentraciones de Antagonista LRH-1, luego se realizó la comparación entre el vehículo y cada una de las diferentes concentraciones, asumiendo que el vehículo es el 100% de células viables se logró determinar si el efecto de la droga produce incremento o disminución en la proliferación celular. Es por ello que se logró evidenciar disminuciones significantes de 85% de la proliferación a  $1\mu\text{M}$ , de 78% a  $3\mu\text{M}$ , de 74% a  $10\mu\text{M}$  y de 52% a  $30\mu\text{M}$  (Tabla 16) obteniendo el pico más bajo y significativo a concentración de  $30\mu\text{M}$  (Figura 35). No obstante, también se evidenció disminución de 90% de la proliferación a concentración de  $0.1\mu\text{M}$  y de 88% a concentración de  $0.3\mu\text{M}$ , pero no fueron significantes al ser comparadas con el vehículo (Tabla 16) (Figura 35), esto nos indica que el efecto del Antagonista LRH-1 no es eficaz en células Caco-2 a concentraciones menores de  $1\mu\text{M}$ .

En este caso lo que nos indica el ensayo de proliferación celular es que al haber una inducción del receptor LRH-1 en las células Caco-2 se va a producir un incremento de éstas y al ser bloqueado por el antagonista se va a favorecer a la disminución de la proliferación.

En investigaciones realizadas por Benod et. al., 2011<sup>107</sup>, demuestra que el receptor nuclear LRH-1 regula el crecimiento y proliferación del cáncer pancreático, silenciando el receptor LRH-1 con siRNA en cuatro líneas celulares cancerígenas de páncreas, de tal manera que los resultados reportaron que la proliferación celular fue inhibida comparada a su control.<sup>107</sup>

De tal manera podemos decir que el efecto del receptor LRH-1 en células cancerígenas pancreáticas es igual o parecido que en las células Caco-2 de colon.

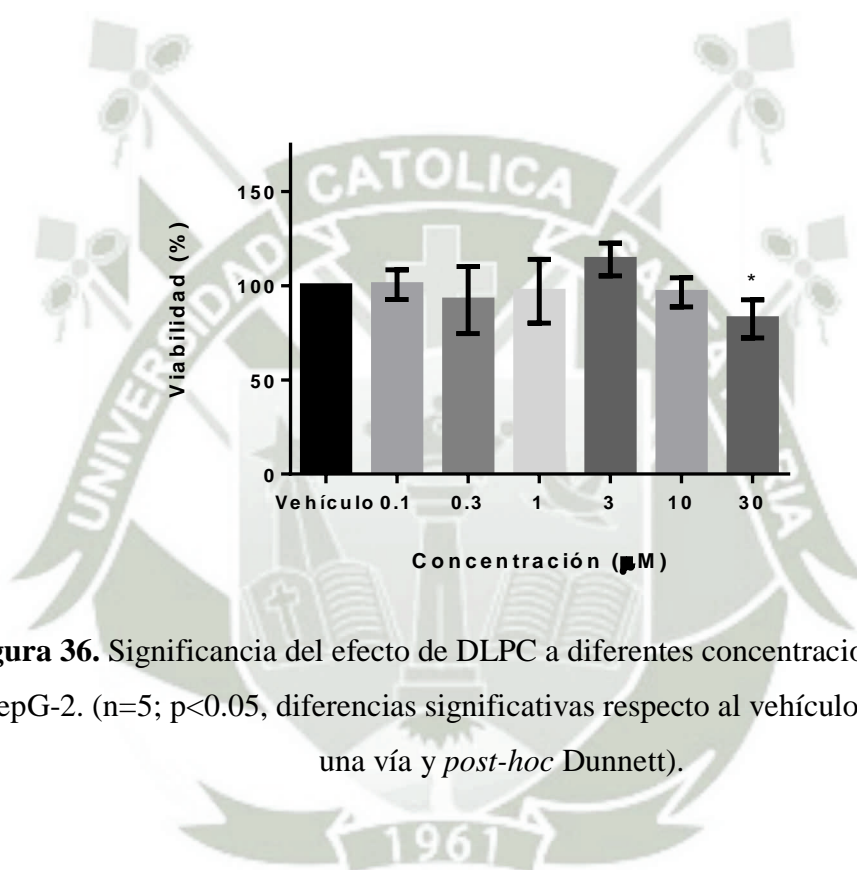
### 3.2. CÉLULAS HEPG-2

#### 3.2.1. DLPC

**Tabla 17.** Viabilidad de células HepG-2 a diferentes concentraciones de DLPC.

Vehículo	0.1 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$
100%	101%	92%	97%	114%	96%	82%

*Fuente:* Elaboración propia.



**Figura 36.** Significancia del efecto de DLPC a diferentes concentraciones en células HepG-2. (n=5;  $p < 0.05$ , diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Una vez aplicado el tratamiento en las células y realizado el ensayo de MTS, se hizo la lectura de las absorbancias obtenidas por el lector de microplatos Synergy que pueden observarse en el Anexo VI, a continuación, para procesar los datos se restó la absorbancia del blanco al grupo vehículo y a los grupos expuestos a diferentes concentraciones de DLPC, luego se realizó la comparación entre el vehículo y cada una de las diferentes concentraciones, asumiendo que el vehículo es el 100% de células viables se logró determinar si el efecto de la droga produce incremento o disminución en la proliferación celular.

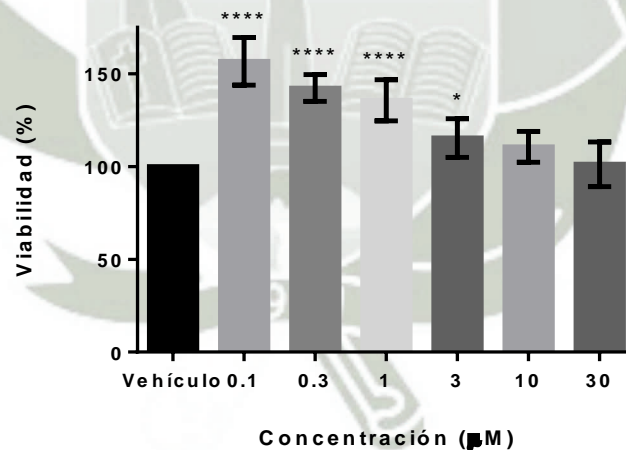
Es por ello que se logró evidenciar disminución significativa de 82% de la proliferación a 30 $\mu$ M (Tabla 17) (Figura 36). No obstante, también se evidenció disminución de 92% de la proliferación a concentración de 0.3 $\mu$ M, de 97% a 1 $\mu$ M y de 96% a 1 $\mu$ M, además de incrementar en 101% a 0.1 $\mu$ M y 114% a 10 $\mu$ M, pero no fueron significantes al ser comparadas con el vehículo (Tabla 17) (Figura 36), esto nos indica que el efecto de DLPC no es eficaz en células HepG-2 a concentraciones menores de 30 $\mu$ M.

### 3.2.2. ANTAGONISTA LRH-1

**Tabla 18.** Viabilidad de células HepG-2 a diferentes concentraciones de Antagonista LRH-1.

Vehículo	0.1 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M
100%	157%	142%	136%	115%	111%	101%

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 37.** Significancia del efecto del Antagonista LRH-1 a diferentes concentraciones en células HepG-2. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto al vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Aplicado el tratamiento en las células y realizado el ensayo de MTS, se hizo la lectura de las absorbancias obtenidas por el lector de microplatos Synergy que pueden observarse en el Anexo VII, a continuación, para procesar los datos se restó la absorbancia del blanco al grupo vehículo y a los grupos expuestos a diferentes concentraciones de Antagonista LRH-1, luego se realizó la comparación entre el vehículo y cada una de las diferentes concentraciones, asumiendo que el vehículo es el 100% de células viables se logró determinar si el efecto de la droga produce incremento o disminución en la proliferación celular. Es por ello que se logró evidenciar incrementos significantes de 157% de la proliferación a 0.1 $\mu$ M, de 142% a 0.3 $\mu$ M, de 136% a 1 $\mu$ M y de 115% a 3 $\mu$ M (Tabla 18) obteniendo un pico máximo a concentración de 0.1 $\mu$ M (Figura 37). No obstante, también se evidenció incremento de 111% de la proliferación a concentración de 10 $\mu$ M y de 101% a 30 $\mu$ M, pero no fueron significantes al ser comparadas con el vehículo (Tabla 18) (Figura 37).

En este caso lo que nos indica el ensayo de proliferación celular es que al haber una inducción del receptor LRH-1 en las células HepG-2 se va a producir una disminución de éstas y al ser bloqueado por el antagonista se va a favorecer al incremento de la proliferación.

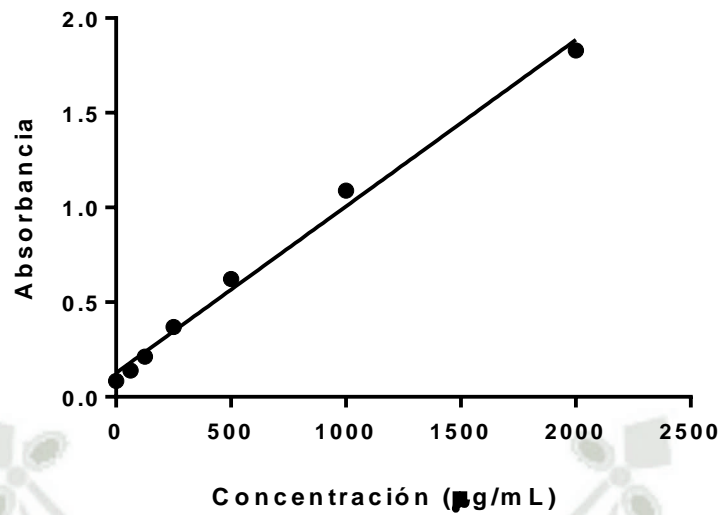
#### 4. CONTEO DE PROTEÍNAS (BCA)

##### 4.1. CÉLULAS CACO-2

**Tabla 19.** Absorbancias de Albúmina a diferentes concentraciones

Albúmina ( $\mu$ g/mL)						
2000	1000	500	250	125	62.5	0
1.8290	1.0893	0.6233	0.3687	0.2127	0.1397	0.0843

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 38.** Curva de calibración de albúmina.  $R=0.9926$ ,  $Y = 0.0008794 * X + 0.1263$

**Tabla 20.** Cantidad de proteínas en células Caco-2 post-tratamiento (µg/mL).

Vehículo DLPC	DLPC	Vehículo Antagonista LRH-1	Antagonista LRH-1
2365.63	2198.85	2805.32	2479.34

*Fuente:* Elaboración propia.

Una vez realizadas las diluciones de albúmina, se diseñó la curva de calibración (Figura 38) a partir de la media de las absorbancias de cada concentración (Tabla 19), cuyas absorbancias netas se pueden observar en el Anexo VIII.

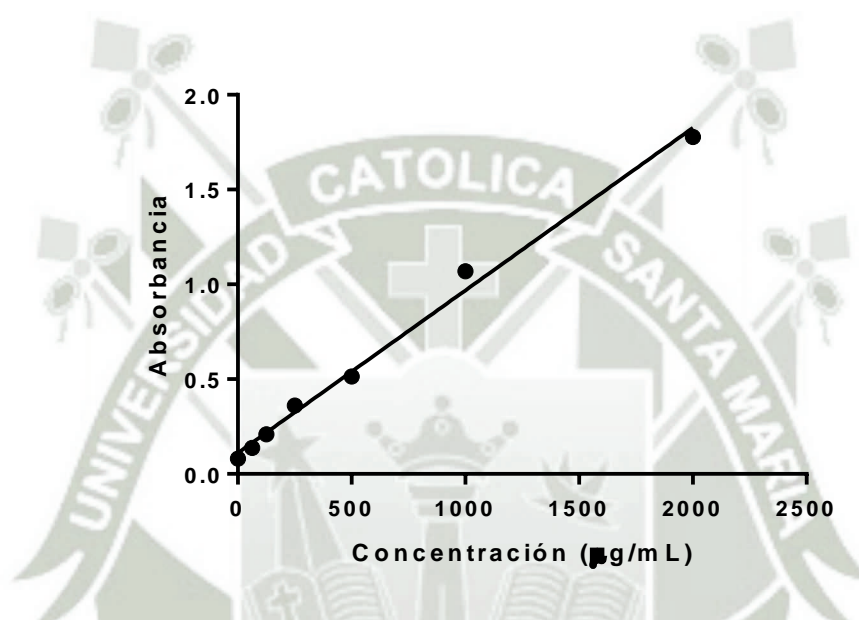
A partir de los datos de la curva de calibración, se pudo realizar la extrapolación de los datos para obtener la concentración total de proteínas presentes en las células post-tratamiento a partir de la media de las absorbancias (Tabla 20), cuyas absorbancias netas se pueden observar en el Anexo IX.

#### 4.2. CÉLULAS HEPG-2

**Tabla 21.** Absorbancias de Albúmina a diferentes concentraciones

Albúmina (µg/mL)						
2000	1000	500	250	125	62.5	0
1.7783	1.0693	0.5150	0.3600	0.2097	0.1483	0.0813

*Fuente:* Elaboración propia.



**Figura 39.** Curva de calibración de albúmina.  $R=0.9931$ ,  $Y = 0.0008575 * X + 0.1108$

**Tabla 22.** Cantidad de proteínas en células HepG-2 post-tratamiento (µg/mL).

Vehículo DLPC	DLPC	Vehículo Antagonista LRH-1	Antagonista LRH-1
838.87	586.20	848.59	833.04

*Fuente:* Elaboración propia.

Realizadas las diluciones de albúmina, se diseñó la curva de calibración (Figura 39) a partir de la media de las absorbancias de cada concentración (Tabla 21), cuyas absorbancias netas se pueden observar en el Anexo X. A

partir de los datos obtenidos de la curva de calibración, se pudo realizar la extrapolación de los datos para obtener la concentración total de proteínas presentes en las células post-tratamiento a partir de la media de las absorbancias (Tabla 22), cuyas absorbancias netas se pueden observar en el Anexo XI.

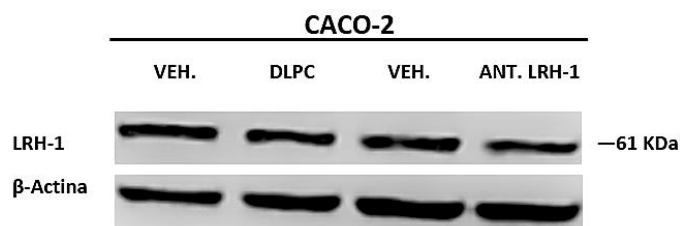
El motivo por el que se realizó la técnica de BCA para la cuantificación de proteínas es por alta sensibilidad y selectividad en relación a otras técnicas, esto se debe a que el reactivo A contiene ácido bicinconínico, carbonato y bicarbonato de sodio y tartrato de sodio (los cuales le confieren estabilidad al medio del compuesto) en 0.1M de hidróxido de sodio; por otro lado, el reactivo B contiene 4% de sulfato cúprico. Esta técnica se fundamenta en la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  quelado por dos moléculas de ácido bicinconínico, que a mayor presencia de proteínas toma una coloración púrpura intensa.

#### 5. WESTERN-BLOT

En este ensayo la concentración aplicada de las drogas fue  $30\mu\text{M}$  en ambas líneas celulares, lo cual se determinó posterior al ensayo de MTS, con el fin de trabajar en condiciones iguales. En la preparación de proteínas la razón por la que se expuso las muestras a temperatura entre  $90-100^\circ\text{C}$  fue para asegurar la desnaturalización en su totalidad y así al estar las proteínas separadas poder realizar la identificación y cuantificación de cada una. Por otro lado, la concentración mínima de proteínas que se puede agregar en los pocillos es de  $10\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, el motivo por el que las muestras fueron agregadas en los pocillos a una concentración de  $20\mu\text{g/mL}$  fue por ser una cantidad detectable y confiable. Durante la electroforesis la energía proporcionada por la fuente de poder permitió el desplazamiento de las muestras hacia abajo, de acuerdo a su peso molecular, reteniendo a las moléculas más pesadas en la parte superior y permitiendo el paso de las más ligeras a la parte inferior, dando como resultado la separación de las proteínas por bandas. Seguidamente en la electrotransferencia tipo “sándwich” la membrana va posicionada hacia la parte inferior ya que, al ser una migración de cátodo a ánodo, la fuente de poder permite el desplazamiento de las machas del gel a la membrana.

## 5.1. LRH-1

### 5.1.1. CÉLULAS CACO-2

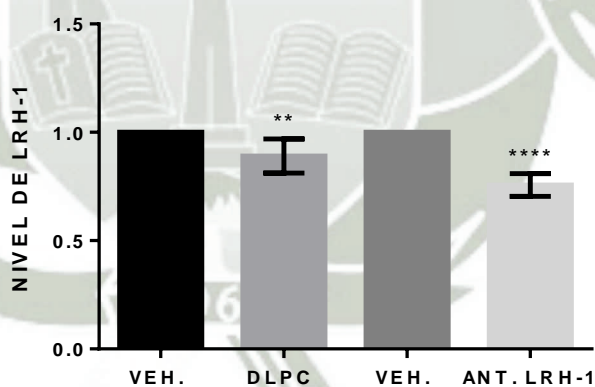


**Figura 40.** Bandas de LRH-1 en células Caco-2, Western-Blot.

**Tabla 23.** Nivel de LRH-1 expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	0.8911	1.0000	0.7571

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 41.** Nivel de LRH-1 en células Caco-2, Western-Blot. (n=6;  $p < 0.05$ , diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

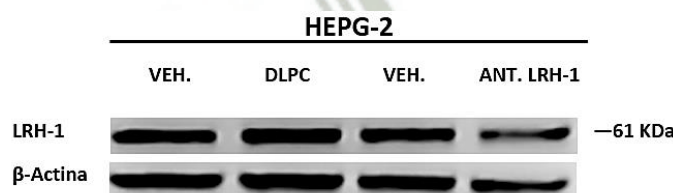
Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 61 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 40), las cuales

pueden observarse en el Anexo XII, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 23) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y a partir de esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína LRH-1 en las células expuestas a las drogas (Figura 41). Se observó disminución significativa de 0.8911 con la droga DLPC y de 0.7571 con la droga Antagonista LRH-1, no obstante, el Antagonista LRH-1 presentó disminución mucho más significativa que el DLPC, comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 23) (Figura 41). De acuerdo a los datos obtenidos en proliferación celular el nivel de LRH-1 debió estar incrementado al ser expuesto a DLPC. Por otro lado al relacionar el nivel expresado de LRH-1 con la proliferación celular, expuesto al Antagonista LRH-1, se obtuvo una gran disminución de LRH-1, lo cual nos confirma que la proliferación de células Caco-2 está directamente relacionada con la presencia del receptor.

Investigaciones realizadas por Pan et. al., 2006<sup>108</sup>, demuestra por medio del ensayo de Western-Blot que al silenciar el receptor LRH-1 con siLRH reduce la expresión de LRH-1 en células Caco-2.<sup>108</sup>

Con la investigación antes mencionada se respalda que al bloquear el receptor LRH-1 va a disminuir la expresión de éste en la línea celular Caco-2.

#### 5.1.2. CÉLULAS HEPG-2

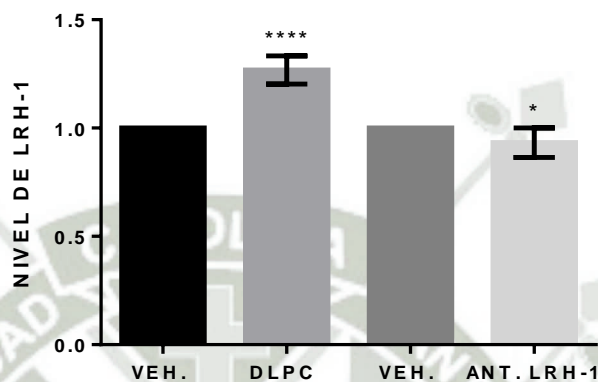


**Figura 42.** Bandas de LRH-1 en células HepG-2, Western-Blot.

**Tabla 24.** Nivel de LRH-1 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	1.2682	1.0000	0.9328

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 43.** Nivel de LRH-1 en células HepG-2, Western-Blot. (n=6; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 61 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 42), las cuales pueden observarse en el Anexo XIII, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 24) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína LRH-1 en las células expuestas a las drogas (Figura 43), se observó incremento significativo de 1.2682 con la droga DLPC y disminución significativa de 0.9328 con la droga Antagonista LRH-1, no obstante, el Antagonista LRH-1 presentó disminución más significativa que el DLPC, comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 24) (Figura 43).

De acuerdo a la relación de los datos obtenidos en proliferación celular y nivel expresado de LRH-1, expuesto a DLPC, se obtuvo un gran incremento de LRH-1, lo cual nos confirma que la proliferación de células HepG-2 está relacionada de forma inversa con la presencia del receptor.

En el caso de la relación entre la proliferación y Antagonista LRH-1, la proliferación debió estar incrementada, la concentración que debió probarse en este caso tenía que ser  $0.1\mu\text{M}$ .

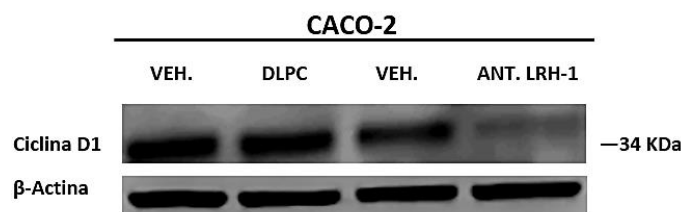
Los estudios realizados por Venteclef et. al., 2008<sup>109</sup>, sustentan que la expresión ectópica de LRH-1 cuantificada en niveles de mRNA aplicando el método de QPCR en células HepG-2 dio lugar a un aumento significativo en todos los genes diana bien establecidos, incluyendo APOAI, CYP7A1, CYP8B1, SHP y SR-B1. Un aumento de cuatro veces las transcripciones de APOM, se observó en respuesta a LRH-1 sobreexpresión, se encuentra involucrada de forma positiva en el metabolismo del colesterol.<sup>109</sup>

Con la investigación antes mencionada se puede confirmar que la influencia del receptor LRH-1 en células HepG-2 es positiva, ya que incrementa la expresión de apolipoproteínas que cumplen un papel muy importante en la producción de HDL y mejoran el metabolismo del colesterol.

Comparando el efecto de ambas drogas en relación al LRH-1 y la proliferación en las células Caco-2 y HepG-2. En el caso de las Caco-2 el receptor LRH-1 actúa de manera desfavorable en el carcinoma colorrectal, ya que, al ser bloqueado, éste se va a encontrar en menores cantidades y así se evitará la proliferación y renovación de las células. En cambio, en el caso de las HepG-2, el receptor LRH-1 actúa de manera favorable en el cáncer hepatocelular, ya que al encontrarse en mayores cantidades éste va a favorecer en el metabolismo del colesterol y de esta manera disminuye la proliferación de esta línea celular.

## 5.2. CICLINA D1

### 5.2.1. CÉLULAS CACO-2

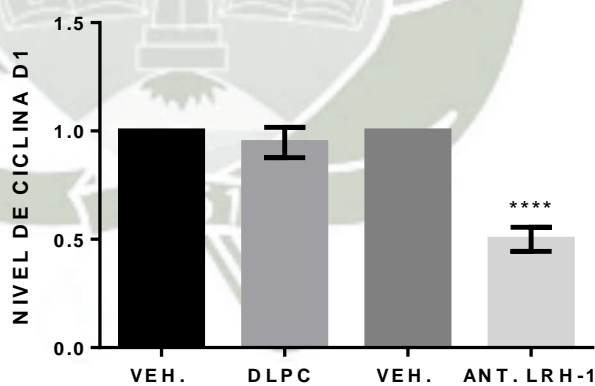


**Figura 44.** Bandas de Ciclina D1 en células Caco-2, Western-Blot.

**Tabla 25.** Nivel de Ciclina D1 expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	0.9469	1.0000	0.5002

*Fuente: Elaboración propia.*



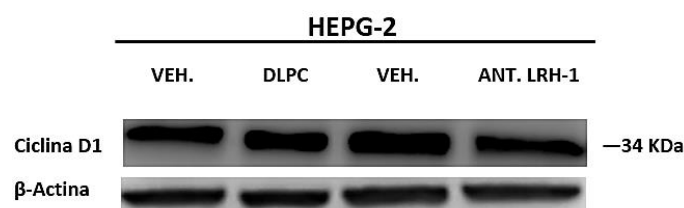
**Figura 45.** Nivel de Ciclina D1 en células Caco-2, Western-Blot. (n=5;  $p < 0.05$ , diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 34 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 44), las cuales pueden observarse en el Anexo XIV, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 25) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína Ciclina en las células expuestas a las drogas (Figura 45), se observó disminución bastante significativa de 0.5002 con la droga Antagonista LRH-1, mientras que con DLPC se obtuvo disminución de 0.9469 pero no fue significativa, comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 25) (Figura 45).

Relacionando los ensayos realizados y los resultados obtenidos de proliferación, expresión del receptor LRH-1 y ahora expresión de la proteína Ciclina D1, afirmamos que el mecanismo por el que LRH-1 interviene en células Caco-2 es incrementando los niveles de Ciclina D1, el cual está presente en la regulación del ciclo celular, es esta la razón por la que aumenta la proliferación celular, obviamente al bloquear el receptor va a disminuir la sobreexpresión de Ciclina D1 y por ende la proliferación.

Estudios realizados por Benod et. al.<sup>107</sup>, sustentan por medio de ensayos de Western Blot que el bloqueo específico de LRH-1 en el cáncer de páncreas (AsPC-1) y en el cáncer de colon (COLO 357) induce una detención del ciclo celular en la fase G0/G1 ralentizando la G1 / S. No hay aumento en la población de células apoptóticas.<sup>107</sup>

### 5.2.2. CÉLULAS HEPG-2

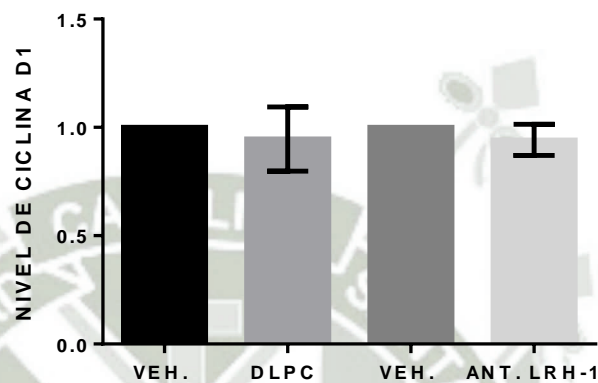


**Figura 46.** Bandas de Ciclina D1 en células HepG-2, Western-Blot.

**Tabla 26.** Nivel de Ciclina D1 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	0.9463	1.0000	0.9422

*Fuente:* Elaboración propia.



**Figura 47.** Nivel de Ciclina D1 en células HepG-2, Western-Blot. (n=5; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 34 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 46), las cuales pueden observarse en el Anexo XV, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 26) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína Ciclina en las células expuestas a las drogas (Figura 47), se observó disminución de 0.9463 con la droga DLPC y de 0.9422 con Antagonista LRH-1 pero no fueron significantes, comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 26) (Figura 47).

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que el efecto del receptor LRH-1 en las células HepG-2 no tiene relación con la proteína Ciclina D1, ya que en la cuantificación de ésta no se evidenció significancia.

Por lo tanto la intervención del LRH-1 en la línea celular HepG-2 no afecta al ciclo celular

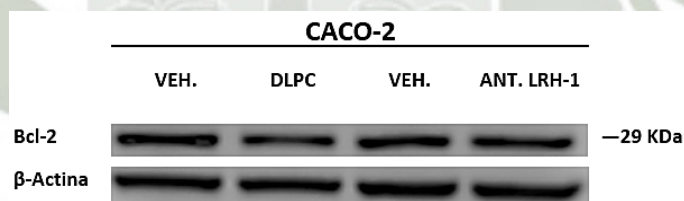
Comparando el efecto de ambas drogas en relación a la proliferación, el receptor LRH-1 y la Ciclina D1, proteína importante que interviene en el ciclo celular, en las células Caco-2 y HepG-2.

En el caso de las Caco-2, existe una intervención directa a nivel del ciclo celular por medio del bloqueo al receptor, al no promover el desarrollo de las células en fase G<sub>1</sub>, lo que conlleva a desfavorecer el ciclo celular y por ende disminuir la proliferación celular.

Por otro lado, en el caso de las HepG-2, no se observó diferencia alguna en la cantidad de Ciclina D1 expresada, por tanto, el mecanismo que sigue el LRH-1 en relación a la proliferación no es por medio del ciclo celular.

### 5.3. BCL-2

#### 5.3.1. CÉLULAS CACO-2

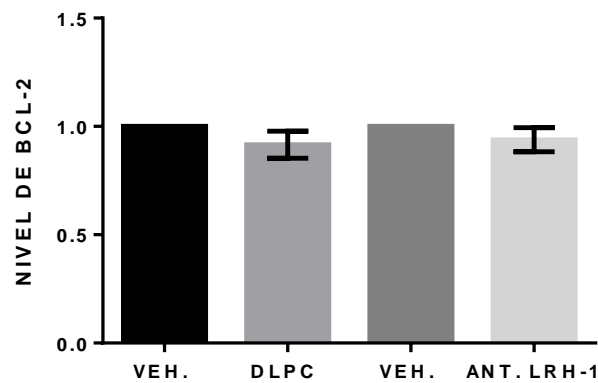


**Figura 48.** Bandas de Bcl-2 en células Caco-2, Western-Blot.

**Tabla 27.** Nivel de Bcl-2 expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	0.9156	1.0000	0.9385

**Fuente:** Elaboración propia.



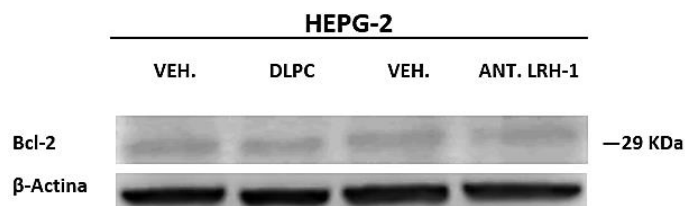
**Figura 49.** Nivel de Bcl-2 en células Caco-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 29 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 48), las cuales pueden observarse en el Anexo XVI, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 27) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína Bcl-2 en las células expuestas a las drogas (Figura 49).

Se observó disminución de 0.9156 con la droga DLPC y de 0.9385 con Antagonista LRH-1 pero no fueron significantes, comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 27) (Figura 49).

Tomando en cuenta todos los resultados anteriores, en células Caco-2 se determinó que el mecanismo por el que influye el receptor LRH-1 es por el descontrol en el ciclo celular, lo cual evita que se produzca apoptosis en estas células cancerígenas.

### 5.3.2. CÉLULAS HEPG-2

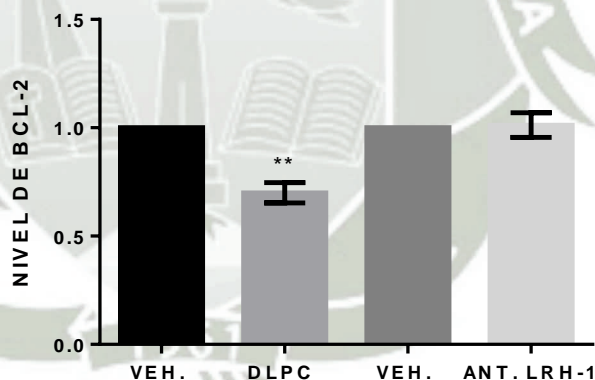


**Figura 50.** Bandas de Bcl-2 en células HepG-2, Western-Blot.

**Tabla 28.** Nivel de Bcl-2 expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	0.6996	1.0000	1.0124

*Fuente: Elaboración propia.*



**Figura 51.** Nivel de Bcl-2 en células HepG-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 29 KDa y β-Actina (Figura 50), las cuales

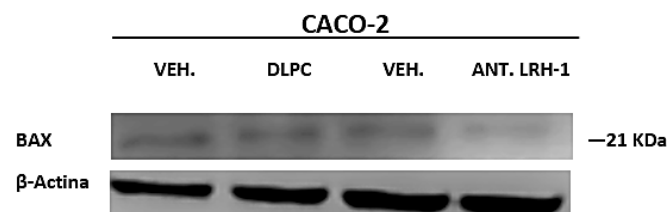
pueden observarse en el Anexo XVII, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 28) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína Bcl-2 en las células expuestas a las drogas (Figura 51), se observó disminución significativa de 0.6996 con la droga DLPC y un aumento no significativo de 1.0124 con Antagonista LRH-1. Comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 28) (Figura 51).

Comparando el efecto de ambas drogas en relación a la proliferación y Bcl-2 en las células Caco-2 y HepG-2. En el caso de Caco-2 con ambas drogas no se obtiene disminución o aumento significativo, sin embargo, comparando la proliferación y la expresión de Bcl-2 en las células Caco-2 tratadas con Antagonista LRH-1 es muy probable que el mecanismo sea por la prolongación de la fase G<sub>1</sub> en el ciclo celular, la cual hace que la proliferación se reduzca o se desarrolle de forma lenta, debido a una expresión mínima de Bcl-2.

En el caso de las HepG-2, usando DLPC existe una disminución en la proliferación y expresión de Bcl-2, esto nos indica que sí interviene en el programa de muerte apoptótica ya que cuando esta proteína está altamente expresada, induce mecanismos de defensa y detiene la apoptosis. En este caso, la expresión esta reducida, por ende, nos da indicios que el programa de muerte celular apoptótica está activada y ello conlleva a la disminución de su proliferación.

#### 5.4. BAX

##### 5.4.1. CÉLULAS CACO-2

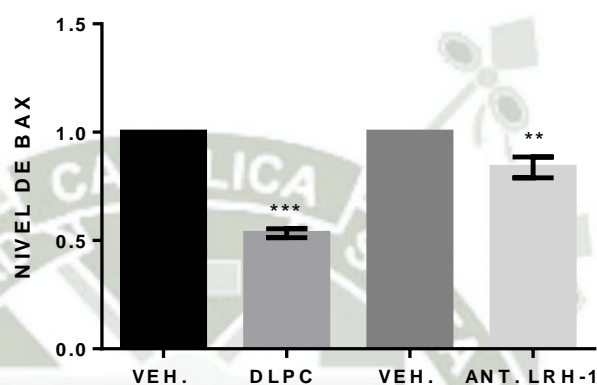


**Figura 52.** Bandas de BAX en células Caco-2, Western-Blot.

**Tabla 29.** Nivel de BAX expresado en células Caco-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	0.5334	1.0000	0.8377

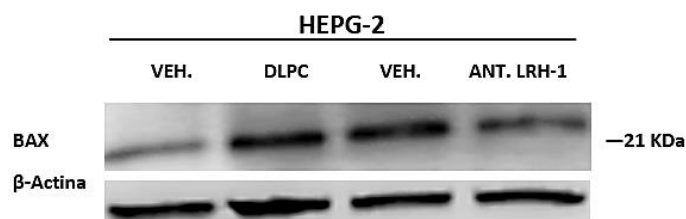
*Fuente:* Elaboración propia.



**Figura 53.** Nivel de BAX en células Caco-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 21 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 52), las cuales pueden observarse en el Anexo XVIII, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 29) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína BAX en las células expuestas a las drogas (Figura 53), se observó disminución significativa con ambas drogas, siendo de 0.5334 con DLPC y de 0.8377 con Antagonista LRH-1. Comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 29) (Figura 53).

5.4.2. CÉLULAS HEPG-2

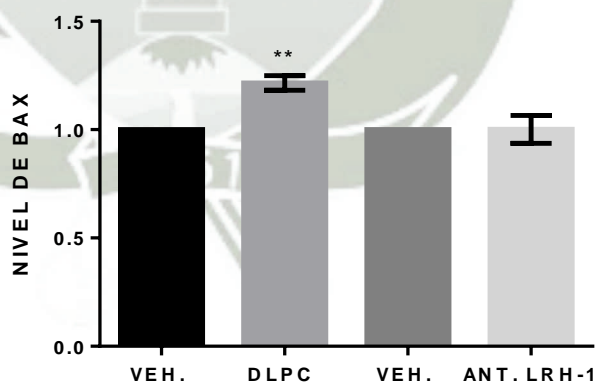


**Figura 54.** Bandas de BAX en células HepG-2, Western-Blot.

**Tabla 30.** Nivel de BAX expresado en células HepG-2 al ser tratadas con DLPC y Antagonista LRH-1

Vehículo	DLPC	Vehículo	Antagonista LRH-1
1.0000	1.2160	1.0000	1.0014

*Fuente:* Elaboración propia.



**Figura 55.** Nivel de BAX en células HepG-2, Western-Blot. (n=2; p<0.05, diferencias significativas respecto a su vehículo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Realizado el escáner en el lector de membrana Li-Cor, se obtuvo la densitometría de las bandas a 21 KDa y  $\beta$ -Actina (Figura 54), las cuales pueden observarse en el Anexo XIX, de acuerdo a la media del FC obtenido (Tabla 30) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y de acuerdo a esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína BAX en las células expuestas a las drogas (Figura 55), se observó aumento significativo de 1.2160 con la droga DLPC y también aumento de 1.0014 con Antagonista LRH-1, pero no fue significativo. Comparados cada uno con su respectivo vehículo (Tabla 30) (Figura 55).

Comparando el efecto de ambas drogas en relación a la proliferación, Bcl-2 y BAX en las células Caco-2 y HepG-2. Teniendo como base que en el proceso de apoptosis existe una relación inversa entre las proteínas Bcl-2/BAX, siendo Bcl-2 una proteína antiapoptótica que como bien dice su nombre inhibe la apoptosis permitiendo la proliferación descontrolada y BAX una proteína proapoptótica que produce apoptosis por efecto de la ruptura de membrana celular. En el caso de Caco-2 con ambas drogas se obtuvo disminución significativa en expresión de BAX, sin embargo, no guarda relación con la expresión de Bcl-2, ya que ésta no presentaba diferencia significativa. Por lo tanto, aseguramos que el mecanismo que ejerce el receptor LRH-1 en estas células no es por apoptosis, sino por senescencia.

En HepG-2, usando DLPC al existir disminución en la proliferación y Bcl-2, y aumento en la expresión de BAX, sabiendo que Bcl-2/BAX mantienen una relación de que a menor cantidad de Bcl-2 y mayor cantidad de BAX expresados, existe la activación de muerte celular por apoptosis, entonces el mecanismo que sigue el receptor LRH-1 en células HepG-2 es por medio de la apoptosis

## CONCLUSIONES

1. La proliferación en células Caco-2 aumenta a concentraciones de 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu$ M con DLPC y disminuye a concentraciones de 1, 3, 10 y 30 $\mu$ M con Antagonista LRH-1. Por otro lado, en células HepG-2 la proliferación disminuye a concentración 30  $\mu$ M con DLPC y aumenta a concentraciones 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu$ M con Antagonista LRH-1.
2. La sobreexpresión de LRH-1 en células Caco-2 aumenta la proliferación de éstas, ayudando así a la propagación del cáncer colorrectal. Mientras que en células HepG-2 disminuye la proliferación de éstas, ayudando a la disminución del cáncer hepatocelular.
3. En células Caco-2 la sobreexpresión de Ciclina D1 aumenta la proliferación de éstas, sin embargo, la expresión de Bcl-2 no varía, mientras que la expresión de BAX disminuye con ambas drogas. Por otro lado, en células HepG-2 no existe variación en la expresión de Ciclina D1, en cambio la expresión de Bcl-2 disminuye y BAX incrementa.
4. El efecto producido por la expresión del receptor LRH-1 en células Caco-2 es en la regulación del ciclo celular (Ciclina D1), mientras que en células HepG-2 es por apoptosis (Bcl-2/BAX).

## SUGERENCIAS

1. Aplicar otras técnicas para la determinación de la proliferación celular, como el MTT, de tal manera que se asegure una reproducibilidad de los resultados obtenidos en esta investigación.
2. Extender los estudios expuestos realizando cuantificación por medio del ensayo de QPCR, para poder investigar una mayor gama de proteínas involucradas en el ciclo celular que probablemente son afectadas por el receptor LRH-1 en células Caco-2.
3. Ampliar los estudios relacionados a la apoptosis que se produce en las células HepG-2 por medio del ensayo de medición de caspasas.
4. Para determinar la influencia que tiene el receptor LRH-1 sobre las proteínas involucradas en el metabolismo del colesterol se podría realizar la cuantificación de Apolipoproteína A-1 (ApoA-1) y Apolipoproteína M (APOM) en células HepG-2. Por medio del ensayo de Western-Blot.
5. Expandir los estudios realizados en esta investigación a otras líneas celulares tanto de cáncer colorrectal como hepático para determinar si tienen el mismo comportamiento o parecido.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Bosetti C., Malvezzi M., Chatenoud L., et al. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol.* 2005; 16: 489-511.
2. Shin H.R., Oh J.K., Masuyer E., et al. Epidemiology of cholangiocarcinoma: an up- date focusing on risk factors. *Cancer Sci.* 2010; 101:579-585. incidence and trends. *Gastroenterology.* 2004; 127(5 Suppl 1):S5–S16.
3. Lee J.M., Lee Y.K., Mamrosh J.L., Busby S.A., Griffin P.R., Pathak M.C., et al. A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature.* 2011, 474:506–510.
4. Botrugno O.A., Fayard E., Annicotte J.-S., Haby C., Brennan T., Wendling O., et al. Synergy between LRH-1 and catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Molecular Cell.* 2004, 15:499–509.
5. Miki Y., Clyne C.D., Suzuki T., Moriya T., Shibuya R., Nakamura Y., et al. Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: possible regulator of in situ steroidogenesis. *Cancer Letters.* 2006; 244:24–33.
6. Petersen G.M., Amundadottir L., Fuchs C.S., Kraft P., Stolzenberg-Solomon R.Z., Jacobs K.B., Arslan A.A., et. al. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1 1q32.1 and 5p15.33. *Nature Genetics.* 2010; 42:224–228.
7. Reyes FJ, et al. (2Alpha,3beta)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 2006 Nov 27; 580(27):6302.
8. Takeuchi Y., McClure M.O., Pizzato M. Identification of Gammaretroviruses Constitutively Released from Cell Lines Used for Human Immunodeficiency Virus Research. 2008 Dec.
9. Alberts B., Bray D., Lewis J., Rafft M., et al. *Biología molecular de la célula.* 3 ed. Barcelona: Omega; 1996. p. 596-614.

10. Li S., Brown M. S. & Goldstein J. L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107:3441–3446.
11. Linscottsdirectory.com [Internet]. USA: Millipore; 2015 [Consultado: 29 de mayo 2016]. Disponible en: <http://www.linscottsdirectory.com/products/emd-millipore/LRH-1-Antagonist-4848737>.
12. Cajaraville G., Carreras M. J., Massó J., Tamés M. J. O. *Farmacia Hospitalaria Tomo II, Capítulo 14* [Libro electrónico]. España: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH); 2002 [Consultado: 28 de Mayo 2016]. Disponible en: <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP14.pdf>.
13. Ferreira E.J., Díaz J.A., Herrera A.A., García E. Cáncer de colon y recto. *Medicas UIS.* 2007; 20: 174-84.
14. Borràs J.M., Pareja L., Peris M. & Espinàs J.A. Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer colorrectal. *Med Clin.* 2008; 131(Supl 1):58-62.
15. Lazarus K.A., Wijayakumara D., Chand A.L., Simpson E.R., Clyne C.D. Therapeutic potential of Liver Receptor Homolog-1 modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 130(3- 5):138–146.
16. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas INEN [Homepage on the Internet]. Perú: Organismo Público Ejecutor del Sector Salud. Ministerio de Salud. Perú; c2015 [Consultado: 25 de Setiembre 2016]. Disponible en: <http://www.inen.sld.pe/portal/estadisticas/datos-epidemiologicos.html>.
17. Edwards B.K., Ward E., Kohler B.A., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 2010; 116:544-573.
18. Instituto Nacional del Cáncer [Homepage on the Internet]. Estadísticas de cáncer en los Estados Unidos. Informe electrónico sobre incidencia y mortalidad 1999–2013. Atlanta (GA): Departamento de Salud y Servicios Humanos, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades e Instituto Nacional del Cáncer; c2016 [Actualizado: 22 de Marzo 2017; Consultado: 14

- de Octubre 2016]. Disponible en:  
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>
19. Sociedad Española de Oncología Médica SEOM [Homepage on the internet]. Madrid: SEOM [Actualizado: 1 de Marzo 2017; Consultado: 14 de Octubre 2016]. Disponible en: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer>.
  20. American Society of Clinical Oncology [Homepage on the internet]. USA: ASCO, c2006 [Consultado: 14 de Octubre 2016]. Disponible en: <https://www.asco.org/>.
  21. Sangiovanni A., Prati G.M., Fasani P., Ronchi G., Romeo R., Manini M., et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology*. 2006; 43(6):1303.
  22. Perz J.F., Armstrong G.L., Farrington L.A., et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006; 45:529-538.
  23. El-Serag H.B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res*. 2007; 37(suppl 2):S88-S94.
  24. Altekruse S.F., McGlynn K.A., Reichman M.E. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1485-1491.
  25. World Health Organization. Vaccine-Preventable Diseases: Monitoring System 2009 Global Summary. WHO/UNICEF Coverage Estimates for 1980-2008, as of August 2009. Disponible en: [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/routine/immunization\\_coverage/en/index4.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/routine/immunization_coverage/en/index4.html). Accessed January 5, 2010.
  26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Implementation of newborn hepatitis B vaccination—worldwide, 2006 [Internet]. USA: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. c2008 [Consultado: 23 de Setiembre 2016]; 57:1249-1252. Disponible en:  
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5746a1.htm>
  27. Robinson-Rechavi M., Escriva G.H., Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. 2003; 116 (Pt 4): 585-6.

28. Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; 58 (4): 685-704.
29. Benoit G., Cooney A., Giguere V., Ingraham H., Lazar M., Muscat G., et al. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; 58 (4): 798-836.
30. Xie W., Evans R.M. Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 37739–37742.
31. Boerboom D. et al. Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process. *Endocrinology.* 2000; 141:4647–4656.
32. Fayard E., Auwerx J., Schoonjans K., LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends in Cell Biology.* 2004; 14:250–260.
33. Francis G.A. et al. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65:261–311.
34. Luo Y. et al. The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:24767–24773.
35. Schoonjans K. et al. Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Rep.* 2002; 3:1181–1187.
36. del Castillo-Olivares A. and Gil G. Role of FXR and FTF in bile acid-mediated suppression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase transcription. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:3587–3593.
37. Inokuchi A. et al. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:46822–46829.
38. Lu T.T. et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell.* 2000; 6:507–515.
39. Fayard E. et al. Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:35725–35731.

40. Krylova I.N., Sablin E.P., Moore J., Xu R.X., Waitt G.M., MacKay J.A., et al. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell*. 2005; 120:343–355.
41. Clyne C.D., Speed C.J., Zhou J., Simpson E.R.. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J. Biol. Chem*. 2002; 277:20591–20597.
42. Annicotte J.-S., Chavey C., Servant N., Teyssier J., Bardin A., Licznar A., et al. The nuclear receptor liver receptor homolog-1 is an estrogen receptor target gene. *Oncogene*. 2005; 24:8167–8175.
43. Benod C., Vinogradova M.V., Jouravel N., Kim G.E., Fletterick R.J., Sablin E.P. Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108:16927–16931.
44. Ortlund E.A., Lee Y., Solomon I.H., Hager J.M., Safi R., Choi Y., et al. Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2005; 12:357–363.
45. Li Y., Choi M., Cavey G., Daugherty J., Suino K., Kovach A., et al. Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. *Molecular Cell*. 2005; 17:491–502.
46. Lee J.M., Lee Y.K., Mamrosh J.L., Busby S.A., Griffin P.R., Pathak M.C., et al. A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature*. 2011; 474:506–510.
47. Yazawa T., Inaoka Y., Okada R., Mizutani T., Yamazaki Y., Usami Y., et al. PPAR- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Molecular Endocrinology*. 2010; 24:485–496.
48. Francis G.A., Fayard E., Picard F.d.r., Auwerx J. Nuclear Receptors and the control of Metabolism. *Annual Review of Physiology*. 2003; 65:261–311.
49. Ortlund E.A., Lee Y., Solomon I.H., Hager J.M., Safi R., Choi Y., et al. Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2005; 12:357–363.

50. Krylova I. N. et al. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell*. 2005; 120:343–355.
51. Becker-Andre M., Andre E., DeLamarter J.F., Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 194:1371–1379.
52. Li M., Xie Y.H., Kong Y.Y., Wu X., Zhu L., Wang Y., Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:29022–29031.
53. Benod C., Carlsson J., Uthayaruban R., Hwang P., Irwin J.J., Doak A.K., et al. Structure-based Discovery of Antagonists of Nuclear Receptor LRH-1. *J Biol Chem.* 2013 Jul 5; 288(27):19830-44.
54. Freshney R. I. *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. 5th ed. USA New York: Wiley Blackwell, 2005.
55. Langdon S. P. editor. *Methods in Molecular Medicine: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc., NJ, 2004. 88:360 pp.
56. Cultek. *Soluciones cultivos celulares. Protocolos y técnicas*. 2006 [Consultado: 18 de Abril 2016]. Disponible en: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-cultivos\\_celulares-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-cultivos_celulares-protocolos.pdf).
57. Knowles B.B., Aden D.P. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. US Patent. 1983; 4:393-133.
58. Stewart B., Chan O., Lu R., Reyner E., Schmid H., Hamilton H., et al. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res.* 1995; 12:693-699.
59. Anderle P., Niederer E., Rubas W., Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Wunderli-Allenspach H., et al. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci.* 1998; 87:757-762.
60. Hilgers A., Corandi A., Burton P. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across intestinal mucosa. *Pharm Res.* 1990; 7:902-910.

61. Abram F., et al. Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74:6848-58.
62. Karunasagar I., et al. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.* 1993; 61:162-9.
63. Olejnik-Schmidt A.K, et al. Expression of bacteriocin divercin AS7 in *Escherichia coli* and its functional analysis. *Ann. Microbiol.* 2014; 64:1197-1202.
64. American Type Culture Collection. USA: ATCC [Consultado: 27 de Mayo 2016]. Disponible en: <https://www.atcc.org/Support/Contact%20Us.aspx>
65. Cooper G.M. *The cell, a molecular approach.* Washington ASM Press and Sinauer Associated Inc. 1999; 1191-205.
66. Nashmyt K. Putting the cell cycle in order. *Science.* 1996; 277:2854-80.
67. Lomanto L.D., Ortiz O.C., Bretón C.P., Gómez A.L., Mesa V.C. El ciclo celular [Libro electrónico]. Colombia: Med UNAB; 2003 [Consultado: 3 de Octubre 2016]. Disponible en: [http://www.biologia.bio.br/curso/r616\\_ae\\_c1.pdf](http://www.biologia.bio.br/curso/r616_ae_c1.pdf).
68. Blow J. Preventing rereplication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor. *Cell Biol.* 1997; 122:143-52.
69. Celada A. Factores de transcripción y control de la expresión génica. *Investig Ciencia.* 1996; 179:179-85
70. Félix A.M., Karsenti E. La división celular. *Mundo Científico.* 1997; 154:123-30.
71. Duke R., Ojcius D., Ding-E Young J., Suicidio celular en la salud y en la enfermedad. *Investig Ciencia.* 1997; 245:21-7
72. Zarzov P., Decottignies A., Balldacci G., Nurse P. G1/S CDK is inhibited to restrain mitotic onset when DNA replication is blocked in fission yeast. *EMBO J.* 2002; 21:337-6
73. John P.C., Mews M., Moore R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasm.* 2001; 216:119-42.

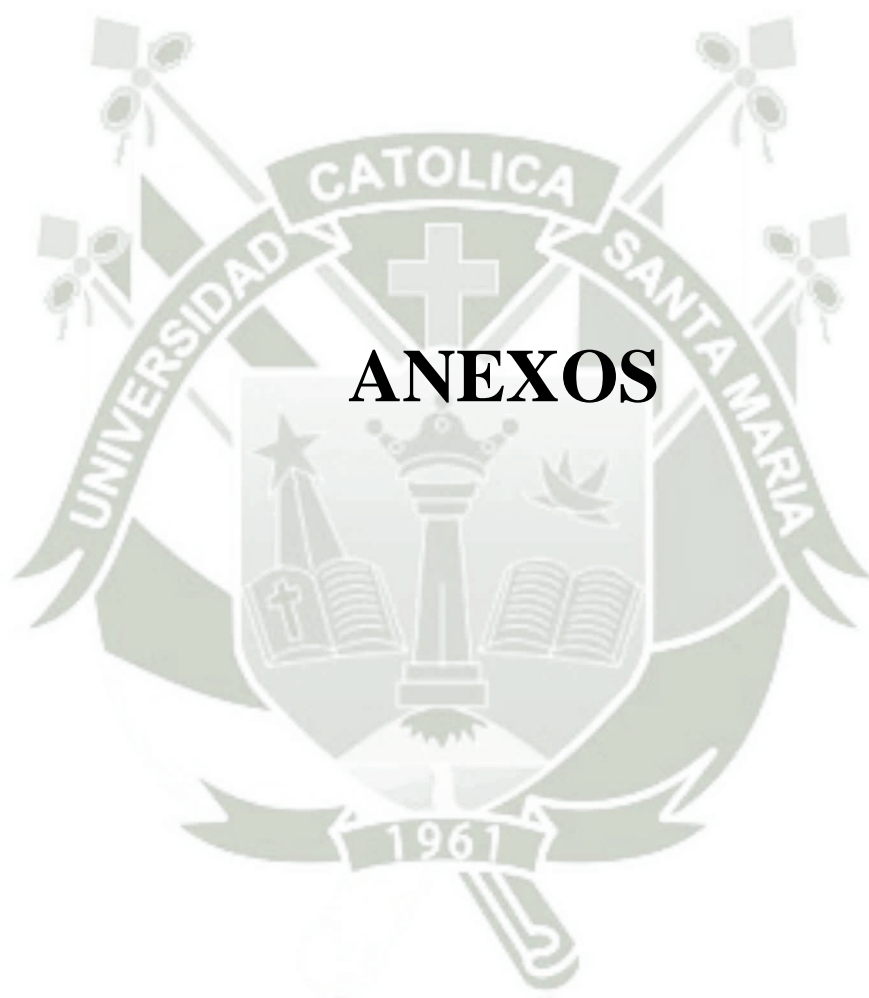
74. Bulavin D.V., Amundson S.A., Fornace A.J. P38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12:92-7.
75. Polager S., Kalma Y., Berkovich E., Ginsberg D. E2Fs up-regulate expressions of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene.* 2002; 21:437-46.
76. Castrillo J.L. Factores de transcripción específicos de tejido. *Investig Ciencia.* 1995; 186:160-9.
77. Xia H., Qi H., Li Y., et al. LATS1 tumor supresor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene.* 2002; 21:123-41
78. Lewin B. *Genes.* 5 ed. Oxford: McGraw-Hill, 2000; 2850-912.
79. Darzynkiewicz Z. Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Hematol Clin North Am.* 2002; 16:339-45.
80. Baba M., Hirai S., Yamada-Okabe H., Hamada K., Tabuchi H., Kabayashi K., et al. Loss of von Hippel-Lindau protein causes cell density dependent deregulation of Cyclin D1 expression through hypoxia inducible factor. *Oncogene.* 2003 Aug; 22:2728-38.
81. Sicinski P., Donaher J.L., Parker S.B., Li T., Fazeli A., Gardner H., et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell.* 1995; 82:621-630.
82. Huss R., Theis S., Deeg H.J. CDK-inhibitor independent cell cycle progression in an experimental haematopoietic stem cell leukaemia despite unaltered Rb-phosphorylation. *Br J Cancer.* 1999; 81:808-13
83. Lung J.C., Chu J.S., Yu J.C., Yue C.T., Lo Y.L., Shen C.Y., et al. Aberrant expression of cell-cycle regulator cyclin D1 in breast cáncer is related to chromosomal genomic instability. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Jul; 34(3):276-84.
84. Stewart Z.A., Westfall M.D., Pietenpol J.A. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:139-145.

85. Tsujimoto Y., Bashir M.M., Givol I., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' región of the bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:1329-1331.
86. Borner C. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem*. 1996; 271:12695-12698.
87. Crescenzi E., Palumbo G., Brady H.J. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J*. 2003; 375:263-274.
88. López N.D., López H.A., Conde J.P., Bucio L, Cárdenas M.C, Ventura J.L., et al. Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40:1161-1169.
89. Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26:1324-1337.
90. López N.D., Martínez C.G., Königsberg M. La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *REB*. 2005; 24:47-53.
91. Wei M.C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001; 292, 727-730.
92. Jurgensmeier J.M. et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:4997-5002.
93. Narita M. et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:14681-14686.
94. Alaminos M., Sanchez M.Q., Munoz J.A., Garcia J.M., Crespo P.V., Gonzalez M.A., et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol*. 2007; 211(3):692-8.
95. Barltrop J.A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 1991; 1:611-4.

96. Nahalanabis M., Al-Muayad H., Kulinski M.D., Altman D., Klapperich C.M. Cell lysis and DNA extraction of gram-positive and gram-negative bacteria from whole blood in a disposable microfluidic chip. *Lab on a Chip*. 2009; 9:2811.
97. Lee J.-G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.-W, Ko C. Microchip-based one step DNA extraction and real-time PCR in one chamber for rapid pathogen identification. *Lab Chip*. 2006; 6:886.
98. Thermo Scientific. M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Instructions). USA [Consultado: 14 de Junio 2016]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home.html>.
99. Smith, P.K., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985; 150:76-85
100. Brogdon W.G. Mosquito protein microassay-I, protein determination from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochemistry and Physiology*. 1984; 79:457-460.
101. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979 Sep; 76(9):4350-4354.
102. Taylor S.C., Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:361590.
103. Kurien B.T., Scofield R.H. Western blotting. *Methods*. 2006; 38(4):283-293.
104. Jensen E.C. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012 Mar; 295(3):369-371.
105. MacPhee D.J. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010 Mar-Apr; 61(2):171-177.
106. Kaufmann S.H., Ewing C.M., Shaper J.H. The erasable Western blot. *Anal Biochem*. 1987 Feb 15; 161(1):89-95.
107. Benod C., Vinogradova M. V., Jouravel N., Kim G. E., Fletterick R. J., Sablin E. P.. Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *J PNAS*. 2011 May. 23; 108(41):16927–16931.

108. Pan D. H., Chen F., Neimark E., Li X., Shneider B. L.. FTF and LRH-1, two related but different transcription factors in human Caco-2 cells: Their different roles in the regulation of bile acid transport. Journal Elsevier. (consult NLM: Journals referenced in the Science Direct databases <http://www.elsevier.com/locate/bba>); 2006 Jan. 26:31-37.
109. Venteclef N., Haroniti A., Tousaint J. K. , Talianidis I., and Delerive P.. Regulation of Anti-atherogenic Apolipoprotein M Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor LRH-1. The Journal of Biological Chemistry. 2008 Feb. 15; 283 (7):3694-3701.





**ANEXO I**

**DISEÑO DEL ORDEN Y CANTIDAD DE MUESTRA APLICADA EN POCILLOS DE GEL DE WESTERN-BLOT**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<b>CACO-2</b>					<b>HEPG-2</b>			
Ladder	Vehículo DLPC	DLPC	Vehículo Antagonista LRH-1	Antagonista LRH-1	Ladder	Vehículo DLPC	DLPC	Vehículo Antagonista LRH-1	Antagonista LRH-1
-----	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg	-----	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg
5 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	5 µL	40 µL	50 µL	40 µL	40 µL

## ANEXO II

### ABSORBANCIAS DE CÉLULAS CACO-2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES

	Blanco	Células/pocillo			
		5 x 10 <sup>3</sup>	10 x 10 <sup>3</sup>	15 x 10 <sup>3</sup>	20 x 10 <sup>3</sup>
ABSORBANCIA	0.157	0.343	0.369	0.511	0.620
	0.161	0.349	0.365	0.508	0.603
	0.162	0.361	0.378	0.568	0.583
	0.158	0.349	0.408	0.582	0.630
	0.161	0.360	0.391	0.479	0.635
<b>Promedio</b>	0.1598	0.3524	0.3822	0.5296	0.6142
<b>Desviación Estándar</b>	0.0022	0.0078	0.0175	0.0436	0.0213
<b>SEM</b>	0%	0%	1%	2%	1%

## ANEXO III

### ABSORBANCIAS DE CÉLULAS HEPG-2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES

	Blanco	Células/pocillo			
		5 x 10 <sup>3</sup>	10 x 10 <sup>3</sup>	15 x 10 <sup>3</sup>	20 x 10 <sup>3</sup>
ABSORBANCIA	0.238	0.413	0.503	0.569	0.626
	0.243	0.400	0.548	0.624	0.611
	0.238	0.399	0.586	0.585	0.700
	0.240	0.396	0.551	0.570	0.615
	0.244	0.415	0.542	0.565	0.627
<b>Promedio</b>	0.2406	0.4046	0.5460	0.5826	0.6358
<b>Desviación Estándar</b>	0.0028	0.0087	0.0296	0.0244	0.0365
<b>SEM</b>	0%	0%	1%	1%	2%

#### ANEXO IV

#### ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE MTS CON DLPC SOBRE CÉLULAS CACO-2

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 1</b>	0.169	0.381	0.442	0.429	0.402	0.419	0.366	0.344
	0.168	0.380	0.438	0.424	0.400	0.412	0.368	0.340
	0.165	0.375	0.436	0.423	0.398	0.413	0.368	0.340
	0.168	0.376	0.440	0.428	0.400	0.420	0.366	0.344
	0.165	0.380	0.438	0.426	0.402	0.417	0.365	0.344
<b>Promedio</b>	0.1670	0.3784	0.4388	0.4260	0.4004	0.4162	0.3666	0.3424
<b>Desviación Estándar</b>	0.0019	0.0027	0.0023	0.0025	0.0017	0.0036	0.0013	0.0022

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 2</b>	0.163	0.388	0.455	0.477	0.474	0.449	0.432	0.355
	0.165	0.382	0.454	0.475	0.459	0.441	0.422	0.351
	0.174	0.380	0.449	0.471	0.456	0.429	0.418	0.337
	0.171	0.386	0.450	0.473	0.471	0.437	0.428	0.341
	0.172	0.383	0.451	0.473	0.464	0.440	0.424	0.344
<b>Promedio</b>	0.1690	0.3838	0.4518	0.4738	0.4648	0.4392	0.4248	0.3456
<b>Desviación Estándar</b>	0.0047	0.0032	0.0026	0.0023	0.0077	0.0072	0.0054	0.0073

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 3</b>	0.152	0.407	0.460	0.550	0.496	0.502	0.504	0.393
	0.163	0.403	0.457	0.554	0.492	0.504	0.502	0.400
	0.166	0.397	0.446	0.552	0.488	0.490	0.494	0.399
	0.162	0.401	0.449	0.548	0.492	0.488	0.496	0.392
	0.157	0.400	0.452	0.549	0.490	0.494	0.498	0.395
<b>Promedio</b>	0.1600	0.4016	0.4528	0.5506	0.4916	0.4956	0.4988	0.3958
<b>Desviación Estándar</b>	0.0055	0.0037	0.0057	0.0024	0.0030	0.0071	0.0041	0.0036

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 4</b>	0.168	0.378	0.463	0.491	0.510	0.460	0.448	0.353
	0.161	0.372	0.467	0.500	0.514	0.458	0.452	0.357
	0.162	0.374	0.473	0.507	0.524	0.450	0.442	0.363
	0.167	0.380	0.469	0.498	0.520	0.452	0.438	0.359
	0.169	0.377	0.466	0.497	0.516	0.456	0.444	0.357
<b>Promedio</b>	0.1654	0.3762	0.4676	0.4986	0.5168	0.4552	0.4448	0.3578
<b>Desviación Estándar</b>	0.0036	0.0032	0.0037	0.0058	0.0054	0.0041	0.0054	0.0036

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 5</b>	0.168	0.360	0.500	0.462	0.446	0.444	0.437	0.367
	0.161	0.353	0.493	0.451	0.449	0.448	0.439	0.361
	0.160	0.340	0.496	0.450	0.444	0.456	0.429	0.361
	0.166	0.347	0.503	0.461	0.441	0.452	0.427	0.367
	0.167	0.349	0.499	0.458	0.446	0.451	0.431	0.365
<b>Promedio</b>	0.1644	0.3498	0.4982	0.4564	0.4452	0.4502	0.4326	0.3642
<b>Desviación Estándar</b>	0.0036	0.0074	0.0038	0.0056	0.0029	0.0045	0.0052	0.0030

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>PROMEDIO DE REPETICIONES</b>	0.2114	0.2718	0.2590	0.2334	0.2492	0.1996	0.1754
	0.2148	0.2828	0.3048	0.2958	0.2702	0.2558	0.1766
	0.2416	0.2928	0.3906	0.3316	0.3356	0.3388	0.2358
	0.2108	0.3022	0.3332	0.3514	0.2898	0.2794	0.1924
	0.1854	0.3338	0.2920	0.2808	0.2858	0.2682	0.1998
<b>Promedio</b>	0.2128	0.2967	0.3159	0.2986	0.2861	0.2684	0.1960
<b>Desviación Estándar</b>	0.0199	0.0236	0.0495	0.0460	0.0319	0.0499	0.0246
<b>SEM</b>	1%	1%	2%	2%	1%	2%	1%

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>% DE VIABILIDAD</b>	99.34	127.73	121.71	109.68	117.11	93.80	82.42
	100.94	132.89	143.23	139.00	126.97	120.21	82.99
	113.53	137.59	183.55	155.83	157.71	159.21	110.81
	99.06	142.01	156.58	165.13	136.18	131.30	90.41
	87.12	156.86	137.22	131.95	134.30	126.03	93.89
<b>Promedio</b>	100.00	139.42	148.46	140.32	134.45	126.11	92.11

**ANEXO V**

**ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE MTS CON ANTAGONISTA LRH-1 SOBRE CÉLULAS CACO-2**

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>3 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>
<b>REPETICIÓN 1</b>	0.182	0.595	0.514	0.529	0.477	0.449	0.453	0.405
	0.175	0.592	0.511	0.516	0.480	0.447	0.452	0.410
	0.172	0.581	0.498	0.511	0.485	0.437	0.443	0.403
	0.180	0.584	0.501	0.524	0.482	0.439	0.444	0.398
	0.181	0.590	0.505	0.518	0.480	0.442	0.450	0.403
<b>Promedio</b>	0.1780	0.5884	0.5058	0.5196	0.4808	0.4428	0.4484	0.4038
<b>Desviación Estándar</b>	0.0043	0.0058	0.0067	0.0070	0.0029	0.0051	0.0046	0.0043

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>3 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>
<b>REPETICIÓN 2</b>	0.182	0.525	0.486	0.486	0.484	0.479	0.429	0.345
	0.176	0.522	0.495	0.493	0.476	0.468	0.422	0.343
	0.174	0.509	0.498	0.496	0.474	0.469	0.425	0.339
	0.180	0.512	0.489	0.489	0.482	0.480	0.432	0.341
	0.180	0.515	0.490	0.491	0.480	0.475	0.425	0.344
<b>Promedio</b>	0.1784	0.5166	0.4916	0.4910	0.4792	0.4742	0.4266	0.3424
<b>Desviación Estándar</b>	0.0033	0.0067	0.0048	0.0038	0.0041	0.0055	0.0039	0.0024

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 3</b>	0.179	0.594	0.518	0.494	0.504	0.491	0.519	0.380
	0.180	0.602	0.511	0.496	0.512	0.485	0.515	0.379
	0.175	0.604	0.506	0.502	0.510	0.469	0.503	0.370
	0.178	0.596	0.513	0.500	0.502	0.475	0.507	0.371
	0.174	0.598	0.510	0.496	0.508	0.481	0.510	0.374
<b>Promedio</b>	0.1772	0.5988	0.5116	0.4976	0.5072	0.4802	0.5108	0.3748
<b>Desviación Estándar</b>	0.0026	0.0041	0.0044	0.0033	0.0041	0.0086	0.0065	0.0045

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 4</b>	0.183	0.523	0.508	0.487	0.559	0.461	0.435	0.343
	0.174	0.516	0.499	0.496	0.552	0.456	0.431	0.337
	0.173	0.517	0.500	0.499	0.553	0.447	0.421	0.329
	0.179	0.524	0.509	0.490	0.560	0.452	0.425	0.335
	0.182	0.521	0.503	0.492	0.554	0.455	0.427	0.337
<b>Promedio</b>	0.1782	0.5202	0.5038	0.4928	0.5556	0.4542	0.4278	0.3362
<b>Desviación Estándar</b>	0.0045	0.0036	0.0045	0.0048	0.0036	0.0052	0.0054	0.0050

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>REPETICIÓN 5</b>	0.173	0.535	0.569	0.531	0.455	0.499	0.460	0.390
	0.177	0.527	0.566	0.530	0.449	0.488	0.455	0.394
	0.179	0.529	0.557	0.519	0.447	0.483	0.452	0.402
	0.178	0.537	0.560	0.520	0.453	0.494	0.457	0.398
	0.175	0.534	0.562	0.524	0.452	0.492	0.455	0.395
<b>Promedio</b>	0.1764	0.5324	0.5628	0.5248	0.4512	0.4912	0.4558	0.3958
<b>Desviación Estándar</b>	0.0024	0.0042	0.0048	0.0055	0.0032	0.0061	0.0029	0.0045

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>PROMEDIO DE REPETICIONES</b>	0.4104	0.3278	0.3416	0.3028	0.2648	0.2704	0.2258
	0.3382	0.3132	0.3126	0.3008	0.2958	0.2482	0.1640
	0.4216	0.3344	0.3204	0.3300	0.3030	0.3336	0.1976
	0.3420	0.3256	0.3146	0.3774	0.2760	0.2496	0.1580
	0.3560	0.3864	0.3484	0.2748	0.3148	0.2794	0.2194
<b>Promedio</b>	0.3736	0.3375	0.3275	0.3172	0.2909	0.2762	0.1930
<b>Desviación Estándar</b>	0.0394	0.0284	0.0164	0.0389	0.0203	0.0347	0.0311
<b>SEM</b>	2%	1%	1%	2%	1%	2%	1%

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>% DE VIABILIDAD</b>	109.84	87.73	91.42	81.04	70.87	72.37	60.43
	90.51	83.82	83.66	80.51	79.17	66.43	43.89
	112.84	89.50	85.75	88.32	81.09	89.28	52.89
	91.53	87.14	84.20	101.01	73.87	66.80	42.29
	95.28	103.42	93.24	73.55	84.25	74.78	58.72
<b>Promedio</b>	100.00	90.32	87.66	84.88	77.85	73.93	51.64

## ANEXO VI

### ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE MTS CON DLPC SOBRE CÉLULAS HEPG-2

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 1</b>	0.252	0.671	0.642	0.551	0.627	0.714	0.619	0.607
	0.259	0.667	0.632	0.548	0.633	0.718	0.626	0.615
	0.260	0.659	0.638	0.539	0.637	0.702	0.631	0.617
	0.259	0.663	0.648	0.542	0.631	0.698	0.624	0.609
	0.253	0.667	0.642	0.544	0.633	0.706	0.626	0.611
<b>Promedio</b>	0.2566	0.6654	0.6404	0.5448	0.6322	0.7076	0.6252	0.6118
<b>Desviación Estándar</b>	0.0038	0.0046	0.0059	0.0048	0.0036	0.0083	0.0043	0.0041

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 2</b>	0.253	0.644	0.632	0.652	0.641	0.670	0.623	0.594
	0.262	0.640	0.625	0.646	0.648	0.677	0.631	0.587
	0.263	0.628	0.628	0.646	0.649	0.680	0.637	0.586
	0.258	0.632	0.635	0.652	0.642	0.673	0.629	0.593
	0.254	0.635	0.632	0.650	0.646	0.674	0.632	0.591
<b>Promedio</b>	0.2580	0.6358	0.6304	0.6492	0.6452	0.6748	0.6304	0.5902
<b>Desviación Estándar</b>	0.0045	0.0063	0.0039	0.0030	0.0036	0.0038	0.0051	0.0036

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>REPETICIÓN 3</b>	0.260	0.644	0.685	0.696	0.620	0.711	0.653	0.610
	0.252	0.637	0.692	0.689	0.617	0.709	0.657	0.601
	0.252	0.638	0.689	0.690	0.610	0.699	0.673	0.598
	0.258	0.645	0.682	0.697	0.613	0.701	0.669	0.607
	0.259	0.640	0.686	0.694	0.616	0.706	0.664	0.603
<b>Promedio</b>	0.2562	0.6408	0.6868	0.6932	0.6152	0.7052	0.6632	0.6038
<b>Desviación Estándar</b>	0.0039	0.0036	0.0038	0.0036	0.0038	0.0051	0.0083	0.0048

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>REPETICIÓN 4</b>	0.261	0.655	0.635	0.609	0.575	0.681	0.611	0.552
	0.255	0.663	0.629	0.596	0.578	0.686	0.602	0.555
	0.259	0.667	0.631	0.589	0.575	0.687	0.597	0.546
	0.261	0.659	0.637	0.602	0.572	0.682	0.606	0.543
	0.263	0.663	0.634	0.597	0.577	0.685	0.603	0.550
<b>Promedio</b>	0.2598	0.6614	0.6332	0.5986	0.5754	0.6842	0.6038	0.5492
<b>Desviación Estándar</b>	0.0030	0.0046	0.0032	0.0074	0.0023	0.0026	0.0052	0.0048

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>3 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>
<b>REPETICIÓN 5</b>	0.254	0.644	0.669	0.614	0.731	0.751	0.656	0.552
	0.257	0.633	0.663	0.603	0.724	0.749	0.645	0.550
	0.262	0.638	0.661	0.608	0.709	0.739	0.648	0.540
	0.260	0.649	0.667	0.619	0.716	0.741	0.659	0.542
	0.259	0.643	0.663	0.612	0.721	0.746	0.653	0.547
<b>Promedio</b>	0.2584	0.6414	0.6646	0.6112	0.7202	0.7452	0.6522	0.5462
<b>Desviación Estándar</b>	0.0030	0.0061	0.0033	0.0061	0.0083	0.0051	0.0057	0.0051

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>3 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>
<b>PROMEDIO DE REPETICIONES</b>	0.4088	0.3838	0.2882	0.3756	0.4510	0.3686	0.3552
	0.3778	0.3724	0.3912	0.3872	0.4168	0.3724	0.3322
	0.3846	0.4306	0.4370	0.3590	0.4490	0.4070	0.3476
	0.4016	0.3734	0.3388	0.3156	0.4244	0.3440	0.2894
	0.3830	0.4062	0.3528	0.4618	0.4868	0.3938	0.2878
<b>Promedio</b>	0.3912	0.3933	0.3616	0.3798	0.4456	0.3772	0.3224
<b>Desviación Estándar</b>	0.0133	0.0249	0.0560	0.0533	0.0275	0.0243	0.0320
<b>SEM</b>	1%	1%	3%	2%	1%	1%	1%

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>% DE VIABILIDAD</b>	104.51	98.12	73.68	96.02	115.30	94.23	90.81
	96.58	95.20	100.01	98.99	106.55	95.20	84.93
	98.32	110.08	111.72	91.78	114.79	104.05	88.86
	102.67	95.46	86.61	80.68	108.50	87.94	73.99
	97.91	103.84	90.19	118.06	124.45	100.67	73.58
<b>Promedio</b>	100.00	100.54	92.44	97.11	113.92	96.42	82.43

## ANEXO VII

### ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE MTS CON ANTAGONISTA LRH-1 SOBRE CÉLULAS HEPG-2

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>3 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>
<b>REPETICIÓN 1</b>	0.251	0.626	0.895	0.787	0.796	0.727	0.702	0.675
	0.243	0.616	0.890	0.796	0.786	0.717	0.689	0.664
	0.239	0.612	0.881	0.795	0.784	0.715	0.682	0.661
	0.245	0.622	0.886	0.786	0.794	0.725	0.695	0.672
	0.247	0.620	0.890	0.790	0.788	0.722	0.690	0.669
<b>Promedio</b>	0.2450	0.6192	0.8884	0.7908	0.7896	0.7212	0.6916	0.6682
<b>Desviación Estándar</b>	0.0045	0.0054	0.0052	0.0045	0.0052	0.0051	0.0074	0.0057

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.3 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>3 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>
<b>REPETICIÓN 2</b>	0.258	0.657	0.812	0.770	0.786	0.713	0.658	0.649
	0.255	0.649	0.820	0.762	0.777	0.702	0.649	0.638
	0.245	0.647	0.822	0.762	0.774	0.697	0.650	0.641
	0.254	0.655	0.814	0.770	0.783	0.708	0.659	0.652
	0.249	0.650	0.818	0.765	0.779	0.704	0.653	0.646
<b>Promedio</b>	0.2522	0.6516	0.8172	0.7658	0.7798	0.7048	0.6538	0.6452
<b>Desviación Estándar</b>	0.0052	0.0042	0.0041	0.0040	0.0048	0.0061	0.0045	0.0057

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 3</b>	0.255	0.681	0.851	0.833	0.812	0.720	0.713	0.591
	0.249	0.675	0.840	0.821	0.803	0.712	0.700	0.590
	0.248	0.663	0.841	0.817	0.804	0.710	0.699	0.581
	0.252	0.669	0.852	0.829	0.813	0.718	0.712	0.582
	0.253	0.672	0.848	0.824	0.807	0.713	0.708	0.584
<b>Promedio</b>	0.2514	0.6720	0.8464	0.8248	0.8078	0.7146	0.7064	0.5856
<b>Desviación Estándar</b>	0.0029	0.0067	0.0056	0.0063	0.0045	0.0042	0.0066	0.0046

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
	0.246	0.611	0.892	0.811	0.737	0.673	0.649	0.674
	0.249	0.602	0.889	0.802	0.726	0.667	0.639	0.663
	0.250	0.589	0.878	0.797	0.721	0.653	0.651	0.660
	0.251	0.598	0.881	0.806	0.732	0.659	0.661	0.671
	0.247	0.601	0.884	0.802	0.727	0.664	0.652	0.665
<b>Promedio</b>	0.2486	0.6002	0.8848	0.8036	0.7286	0.6632	0.6504	0.6666
<b>Desviación Estándar</b>	0.0021	0.0079	0.0057	0.0052	0.0061	0.0076	0.0079	0.0058

	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>REPETICIÓN 5</b>	0.256	0.624	0.813	0.789	0.743	0.646	0.664	0.624
	0.253	0.614	0.806	0.790	0.738	0.654	0.657	0.617
	0.244	0.612	0.805	0.783	0.735	0.658	0.660	0.614
	0.253	0.622	0.812	0.782	0.740	0.650	0.667	0.621
	0.249	0.619	0.810	0.785	0.737	0.654	0.660	0.620
<b>Promedio</b>	0.2510	0.6182	0.8092	0.7858	0.7386	0.6524	0.6616	0.6192
<b>Desviación Estándar</b>	0.0046	0.0051	0.0036	0.0036	0.0030	0.0046	0.0039	0.0038

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 µM</b>	<b>0.3 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>
<b>PROMEDIO DE REPETICIONES</b>	0.3742	0.6434	0.5458	0.5446	0.4762	0.4466	0.4232
	0.3994	0.5650	0.5136	0.5276	0.4526	0.4016	0.3930
	0.4206	0.5950	0.5734	0.5564	0.4632	0.4550	0.3342
	0.3516	0.6362	0.5550	0.4800	0.4146	0.4018	0.4180
	0.3672	0.5582	0.5348	0.4876	0.4014	0.4106	0.3682
<b>Promedio</b>	0.3826	0.5996	0.5445	0.5192	0.4416	0.4231	0.3873
<b>Desviación Estándar</b>	0.0274	0.0393	0.0223	0.0340	0.0321	0.0257	0.0369
<b>SEM</b>	1%	2%	1%	2%	1%	1%	2%

	<b>Vehículo</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.3 μM</b>	<b>1 μM</b>	<b>3 μM</b>	<b>10 μM</b>	<b>30 μM</b>
<b>% DE VIABILIDAD</b>	97.80	168.17	142.66	142.34	124.46	116.73	110.61
	104.39	147.67	134.24	137.90	118.30	104.97	102.72
	109.93	155.51	149.87	145.43	121.07	118.92	87.35
	91.90	166.28	145.06	125.46	108.36	105.02	109.25
	95.97	145.90	139.78	127.44	104.91	107.32	96.24
<b>Promedio</b>	100.00	156.71	142.32	135.71	115.42	110.59	101.23

### ANEXO VIII

#### ABSORBANCIAS DE ALBÚMINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

	Albúmina ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	2000	1000	500	250	125	62.5	0
ABSORBANCIA	1.824	1.091	0.614	0.348	0.207	0.136	0.082
	1.818	1.053	0.613	0.386	0.212	0.145	0.087
	1.845	1.124	0.643	0.372	0.219	0.138	0.084
<b>Promedio</b>	1.829	1.089	0.623	0.369	0.213	0.140	0.084
<b>Desviación Estándar</b>	0.0142	0.0355	0.0170	0.0192	0.0060	0.0047	0.0025
<b>SEM</b>	1%	2%	1%	1%	0%	0%	0%

### ANEXO IX

#### ABSORBANCIAS Y CANTIDAD DE PROTEÍNAS EN CELULAS CACO-2 POST-TRATAMIENTO

	Vehículo DLPC	DLPC	Vehículo Antagonista LRH-1	Antagonista LRH-1
ABSORBANCIA	0.340	0.318	0.365	0.349
	0.324	0.321	0.381	0.344
	0.339	0.320	0.373	0.340
<b>Promedio</b>	0.334	0.320	0.373	0.344
<b>Desviación Estándar</b>	0.0090	0.0015	0.0080	0.0045
<b>SEM</b>	1%	0%	0%	0%
<b>Proteínas (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	236.56	219.88	280.53	247.93
<b>Proteínas Total</b>	2365.63	2198.85	2805.32	2479.34

### ANEXO X

#### ABSORBANCIAS DE ALBÚMINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

	Albúmina (µg/mL)						
	2000	1000	500	250	125	62.5	0
ABSORBANCIA	1.790	1.031	0.526	0.348	0.212	0.164	0.081
	1.776	1.102	0.520	0.364	0.211	0.141	0.082
	1.769	1.075	0.499	0.368	0.206	0.140	0.081
<b>Promedio</b>	1.778	1.069	0.515	0.360	0.210	0.148	0.081
<b>Desviación Estándar</b>	0.0107	0.0358	0.0142	0.0106	0.0032	0.0136	0.0006
<b>SEM</b>	1%	2%	1%	1%	0%	1%	0%

### ANEXO XI

#### ABSORBANCIAS Y CANTIDAD DE PROTEÍNAS EN CELULAS HEPG-2 POST-TRATAMIENTO

	Vehículo DLPC	DLPC	Vehículo Antagonista LRH-1	Antagonista LRH-1
ABSORBANCIA	0.256	0.216	0.265	0.268
	0.251	0.213	0.258	0.247
	0.257	0.205	0.246	0.246
<b>Promedio</b>	0.255	0.211	0.256	0.254
<b>Desviación Estándar</b>	0.0032	0.0057	0.0096	0.0124
<b>SEM</b>	0%	0%	1%	1%
<b>Proteínas (µg/mL)</b>	167.77	117.24	169.72	166.61
<b>Proteínas Total</b>	838.87	586.20	848.59	833.04

## ANEXO XII

### DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE LRH-1 EN CÉLULAS CACO-2

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>LRH-1</b>	19700	20600	17400	11300
	20800	14300	16500	13870
	51200	52360	48000	35500
	13800	12300	14800	12300
	59600	62820	63100	46100
	44300	39070	33900	28120
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	81800	95100	105000	102000
	76600	71300	70400	80000
	49100	52900	53300	52600
	26200	24600	26200	28300
	60400	69200	92700	85400
	55700	55200	67800	68400
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	0.8994	1.0000	0.6685
	1.0000	0.7386	1.0000	0.7397
	1.0000	0.9492	1.0000	0.7494
	1.0000	0.9493	1.0000	0.7694
	1.0000	0.9200	1.0000	0.7930
	1.0000	0.8899	1.0000	0.8222
<b>Promedio</b>	1.0000	0.8911	1.0000	0.7571
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0786	0.0000	0.0527
<b>Error</b>	0%	3%	0%	2%

### ANEXO XIII

#### DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE LRH-1 EN CÉLULAS HEPG-2

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>LRH-1</b>	21500	29900	24600	29690
	27500	33400	24100	15000
	81400	95800	88600	79000
	20900	21000	17500	15900
	89400	127000	131000	128300
	47300	58000	71100	63200
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	103000	105000	78000	95900
	62500	61500	52200	36700
	48700	45900	54400	58700
	28500	24000	25400	23300
	61800	70800	55000	58500
	55700	51400	56500	50600
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	1.3642	1.0000	0.9816
	1.0000	1.2343	1.0000	0.8853
	1.0000	1.2487	1.0000	0.8263
	1.0000	1.1932	1.0000	0.9905
	1.0000	1.2400	1.0000	0.9208
	1.0000	1.3288	1.0000	0.9925
<b>Promedio</b>	1.0000	1.2682	1.0000	0.9328
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0646	0.0000	0.0678
<b>Error</b>	0%	2%	0%	2%

**ANEXO XIV**

**DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE CICLINA D1 EN CÉLULAS CACO-2**

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>CICLINA D1</b>	9910	11800	8940	4660
	1270	1120	1230	680
	8470	7730	5440	2540
	14300	10500	17700	9910
	12500	9750	11200	5740
<b>β-Actina</b>	81800	95100	105000	102000
	76600	71300	70400	80000
	76600	71300	70400	80000
	103000	79900	111000	113000
	61200	57100	67000	66400
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	1.0242	1.0000	0.5366
	1.0000	0.9474	1.0000	0.4865
	1.0000	0.9805	1.0000	0.4109
	1.0000	0.9466	1.0000	0.5500
	1.0000	0.8360	1.0000	0.5171
<b>Promedio</b>	1.0000	0.9469	1.0000	0.5002
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0696	0.0000	0.0553
<b>Error</b>	0%	3%	0%	2%

**ANEXO XV**

**DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE CICLINA D1 EN CÉLULAS HEPG-2**

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>CICLINA D1</b>	88100	79400	76700	93810
	13400	10000	14000	9350
	58400	54800	67400	47900
	29100	31100	42400	28300
	29400	27400	36900	31600
<b>β-Actina</b>	103000	105000	78000	95900
	62500	61500	52200	36700
	62500	61500	52200	36700
	95600	87800	89000	71700
	63700	61100	69500	64200
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	0.8841	1.0000	0.9948
	1.0000	0.7584	1.0000	0.9499
	1.0000	0.9536	1.0000	1.0108
	1.0000	1.1637	1.0000	0.8285
	1.0000	0.9716	1.0000	0.9271
<b>Promedio</b>	1.0000	0.9463	1.0000	0.9422
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.1476	0.0000	0.0719
<b>Error</b>	0%	6%	0%	3%

**ANEXO XVI**

**DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE BCL-2 EN CÉLULAS CACO-2**

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>BCL-2</b>	67000	49890	74500	68200
	57000	46340	51700	50100
<b>β-Actina</b>	103000	79900	111000	113000
	61200	57100	67000	66400
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	0.9599	1.0000	0.8992
	1.0000	0.8714	1.0000	0.9778
<b>Promedio</b>	1.0000	0.9156	1.0000	0.9385
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0626	0.0000	0.0556
<b>Error</b>	0%	6%	0%	6%

**ANEXO XVII**

**DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE BCL-2 EN CÉLULAS HEPG-2**

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>BCL-2</b>	882	540	99.6	78
	1110	780	1090	1060
<b>β-Actina</b>	95600	87800	89000	71700
	63700	61100	69500	64200
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	0.6666	1.0000	0.9721
	1.0000	0.7326	1.0000	1.0528
<b>Promedio</b>	1.0000	0.6996	1.0000	1.0124
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0466	0.0000	0.0570
<b>Error</b>	0%	5%	0%	6%

**ANEXO XVIII**

**DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE BAX EN CÉLULAS CACO-2**

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>BAX</b>	1880	1180	1310	970
	1400	720	978	860
<b>β-Actina</b>	60400	69200	92700	85400
	55700	55200	67800	68400
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	0.5478	1.0000	0.8038
	1.0000	0.5189	1.0000	0.8716
<b>Promedio</b>	1.0000	0.5334	1.0000	0.8377
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0204	0.0000	0.0480
<b>Error</b>	0%	2%	0%	5%

**ANEXO XIX**

**DENSITOMETRÍA DE MANCHAS DE BAX EN CÉLULAS HEPG-2**

	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
<b>BAX</b>	4660	6620	7270	7390
	4200	4620	6270	5880
<b>β-Actina</b>	61800	70800	55000	58500
	55700	51400	56500	50600
	<b>Vehículo</b>	<b>DLPC</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Antagonista LRH-1</b>
	1.0000	1.2400	1.0000	0.9557
	1.0000	1.1920	1.0000	1.0471
<b>Promedio</b>	1.0000	1.2160	1.0000	1.0014
<b>Desviación Estándar</b>	0.0000	0.0339	0.0000	0.0647
<b>Error</b>	0%	3%	0%	6%